



ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

ANALES 2019

CONSEJO DIRECTIVO

ASUNCIÓN DE NUEVAS AUTORIDADES

El 25 de abril tuvo lugar la Asamblea Ordinaria convocada para proceder a la elección de los miembros que cesan su mandato, siendo elegidos por un período de dos años: Vicepresidente, Prosecretario, Protesorero, un Vocal Titular y un Vocal Suplente y por un año: tres Revisores de Cuentas.

El Consejo Directivo quedó constituido de la siguiente manera:

Presidente:	Acad. Horacio J.G. Mato
Vicepresidente:	Acad. Marta M. Salseduc
Secretario General:	Acad. Manuel R. Limeres
Prosecretario:	Acad. Néstor Caffini
Tesorero:	Acad. Osvaldo Cascone
Protesorero:	Acad. Virginia Martino
Vocales Titulares:	Acad. Juan P.F.C. Rossi Acad. Francisco J. Stefano
Vocales Suplentes:	Acad. Roberto Coco Acad. Rolando Rossi
Revisores de Cuentas:	Acad. Miguel D' Aquino Acad. Marco Pizzolato Acad. Miguel Caso

El Consejo Directivo realizó durante este período diez (10) reuniones y el Claustro Académico se reunió en nueve (9) oportunidades. La nómina de las Comisiones y la composición de las Secciones figuran como anexos I y II.

NUEVOS ACADÉMICOS

ACADÉMICOS

El 28 de noviembre de 2019 el claustro de Académicos Titulares voto la designación como Académico Titular del Dr. Carlos Chiale.

ACTOS DE INCORPORACIÓN DE ACADÉMICOS CORRESPONDIENTES

El 11 de julio de 2019 en el Museo de Farmacobotánica de Facultad de Farmacia y Bioquímica -UBA se realizó la sesión pública de incorporación como Académico Correspondiente del Dr. Carlos A. Fossati quien fue presentado por la Académica Silvia Hajos. El Dr. Fossati disertó sobre el tema “De anticuerpos monoclonales y algo más”.

El 29 de agosto de 2019 en el Museo de Farmacobotánica de Facultad de Farmacia y Bioquímica -UBA se realizó la sesión pública de incorporación como Académica Correspondiente de la Dra. Nilda Fink quien fue presentado por la Académica Regina Wikinski. La Dra. Fink disertó sobre el tema “Experiencia en Bioquímica Clínica y Etica”.

ACADÉMICOS EMÉRITO

El 28 de noviembre de 2019 el claustro de Académicos Titulares voto la designación de la Acad. Regina Wikinski quien por razones de edad y de condiciones de salud presentó su renuncia como miembro Titular.

ACADÉMICOS TITULARES

ACADÉMICOS CORRESPONDIENTES EN EL EXTERIOR

El 25 de julio de 2019 el claustro de Académicos Titulares voto la designación como Académicos Correspondientes por España de los Dres. Bartolomé Ribas Ozonas de la Real Academia Nacional de Farmacia de España y de Antonio María Rabasco Álvarez y Alberto Ramos Cormenzana, ambos de la Academia Iberoamericana de Farmacia.

El 16 de octubre de 2019, en el marco del VIII ENCUENTRO INTERNACIONAL DE LA ASOCIACIÓN IBEROAMERICANA DE ACADEMIAS DE FARMACIA, el Dr. Nacuccio entregó medalla y diplomas correspondientes a los Dres. Bartolomé Ribas Ozonas y de Antonio María Rabasco Álvarez y Alberto Ramos Cormenzana

El 22 de agosto de 2019 el claustro de Académicos Titulares voto la designación como académico correspondiente por España del Dr. Ángel Montero Carcaboso

En la reunión del claustro de Académicos Titulares se decide que el Acad. Nacucchio será quien entregue las medallas y diplomas a los nuevos académicos correspondientes, tanto en Granada como en Barcelona. Se ha recibido una nota del Dr. Jaume Pérez Payarols, Director de Innovación e Investigación del Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona, quien ofrece las instalaciones del hospital para el acto de incorporación del Acad. Ángel Montero Carcaboso.

En la reunión de claustro del 28 de noviembre de 2019 se recibe una nota publicada en la Revista del Hospital Saint Joan de Deu de Barcelona de Barcelona, en la que se documenta la ceremonia de entrega del diploma y medalla de Acad. Correspondiente al Dr. Ángel Montero Carcaboso por parte del Acad. Nacucchio.

AUSPICIOS A REUNIONES CIENTIFICAS

El claustro académico ha otorgado los auspicios solicitados por

- El Colegio Oficial de Farmacéuticos y Bioquímicos de la Capital Federal para el Segundo Congreso Interdisciplinario “El equipo de salud comprometido con el paciente y la comunidad. Aprendiendo del error”, que está dirigido a profesionales de salud de distintas disciplinas y que tendrá lugar los días 16 al 18 de mayo del corriente año.
- El Colegio de Farmacéuticos de la Pcia. de Bs. Aires para el II Congreso de Preparaciones en Farmacia, que tendrá lugar en La Plata los días 7 y 8 de junio.
- la Asociación Argentina de Microbiología, para el XV Congreso Argentino de Microbiología (CAM 201) que se llevará a cabo entre el 25 y el 27 de septiembre del corriente año, conjuntamente con el V Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos y el V Congreso Latinoamericano de Microbiología.

DONACIONES PARA LA BIBLIOTECA

Se ha recibido en donación para la biblioteca de la Academia un ejemplar del libro “Tópicos de Tecnología Farmacéutica, Volumen 1”, del que son compiladores los Académicos Nacucchio y Manzo.

En su nota, los Académicos Nacucchio y Manzo recuerdan que la última obra de esta naturaleza en idioma castellano data de hace 39 años.

PREMIOS

La Comisión Evaluadora presidida por la Académica Virginia Martino e integrada la Dra. Mariel Marder, los Académicos Carlos Gaozza y Mario Los y el Dr. Norberto Zwirner otorgó el premio Academia 2018 al trabajo **“Efecto antiinflamatorio de rizomas de una planta argentina de uso medicinal (*Smilax campestris*) en macrófagos humanos”**, de Luciana S. Salaverry y colaboradores. Luciana S. Salaverry; Tomás Lombardo, Cecilia Beatriz Dobrecky, Sabrina Andrea Flor; Cecilia Parrado; Franco Mangone; Ana Z. Rugna; Teresa Gentile; Guillermo Blanco; Andrea Canellada; Estela Rey-Roldán.

El 15 de agosto de 2019, en el marco de la Jornada Científica “Vacunas y Vacunaciones”, se hizo entrega de los diplomas correspondientes.

La Comisión Evaluadora del Premio **“Juan A. Domínguez”** integrada por los Académicos Mario Los y Marcelo Nacucchio y la Dra. Laura Bakás de la Facultad de Cs. Exactas de la UNLP otorgó el premio al trabajo titulado **“Desarrollo de nanopartículas porosas para aplicaciones en nanomedicina”**, cuyos autores son R. Mitarrotonda, I. Tapia, E. Giorgi, M. De Marzi, G. Fiszman y M. Desimone

El 5 de diciembre de 2019 se realizó la entrega del premio Juan A. Domínguez y en esa oportunidad se llevó a cabo el brindis de fin de año.

FALLECIMIENTO ACAD. TITULAR, DR. ROBERTO COCO

El día 26 de octubre falleció el Dr. Roberto Coco, Académico Titular de nuestra Institución.

El Dr. Coco fue un reconocido investigador, docente y referente en el campo de la Genética Clínica, a nivel nacional e internacional. Como Bioquímico fue pionero en nuestro medio en la creación de un Laboratorio de Genética en el Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE) en el Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, en 1970. A partir de 1989 se desempeñó como Director Asociado (Miembro Fundador) del Centro Fecunditas de Medicina Reproductiva, afiliado a la UBA. A nivel docente realizó una intensa actividad de post grado, en especial como Director de la Maestría en Embriología Clínica de la Universidad de Buenos Aires y como Director de Tesis Doctorales y Tesinas. Formador de numerosos discípulos en el país y en el extranjero. Trabajador incansable y un gran defensor de la Profesión Bioquímica. Por sobre todos estos logros científico-profesionales, fue una muy buena persona. Su ausencia deja un vacío muy importante entre sus familiares, colegas y amigos.

PUBLICACIONES

Revista Farmacéutica 161 nº2 (2019 versión electrónica).

Anales de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica (Año 2018) versión electrónica.

ACTO DE FIN DE AÑO

El 5 de diciembre tuvo lugar, en la sede de nuestra Academia, el brindis de Fin de Año.

ENTIDADES COOPERADORAS DE LA ACADEMIA

Entidades Cooperadoras que apoyan económicamente a la Academia, permitiendo así su normal funcionamiento.

- Laboratorios ROEMMERS S.A.
- Laboratorios BAGO S.A.
- Laboratorio CASASCO
- COLEGIO OFICIAL DE FARMACEUTICOSY BIOQUIMICOS DE CAPITAL FEDERAL (COFYBI)
- COLEGIO DE FARMACEUTICOS DE LA PCIA. DE BUENOS AIRES (COLFARMA)
- CÁMARA INDUSTRIAL DE LABORATORIOS FARMACÉUTICOS ARGENTINOS (CILFA)
- MINISTERIO DE EDUCACION DE LA NACION

ANEXO I MIEMBROS

ACADÉMICOS TITULARES

Acad. Dra. María Cristina Añón
Acad. Dr. Carlos M. Baratti
Acad. Dra. Mirta J. Biscoglio
Acad. Dr. Alberto A. Boveris
Acad. Dr. Nestor O. Caffini
Acad. Dr. Clyde N. Carducci
Acad. Dr. Ricardo A. Caro
Acad. Dr. Osvaldo Cascone
Acad. Dr. Miguel A. Caso
Acad. Dr. Roberto Coco †
Acad. Dr. Miguel D' Aquino
Acad. Dr. Alberto Diaz
Acad. Dr. Tomás de Paoli
Acad. Dr. Jorge Errecalde
Acad. Dr. Carlos H. Gaozza
Acad. Dr. Hector I. Giuliani
Acad. Dr. Carlos A. Gotelli
Acad. Dr. Alberto Gurni
Acad. Dr. Gabriel O. Gutkind
Acad. Dra. Silvia Hajos
Acad. Dr. Manuel Limeres
Acad. Dr. Mario A. Los
Acad. Dra. Virginia Martino
Acad. Dr. Horacio José Gabriel Mato
Acad. Dr. Marcelo C. Nacucchio
Acad. Dra. María Luz Pita Martín de Portela
Acad. Dr. Marco Pizzolato
Acad. Dr. Edgardo Poskus
Acad. Dr. Otmaro E. Roses
Acad. Dr. Juan Pablo F.C. Rossi.
Acad. Dr. Rolando Rossi
Acad. Dr. Alfredo Salibian
Acad. Dra. Marta M. Salseduc
Acad. Dr. Francisco J.E. Stefano
Acad. Dra. Norma Sterin de Speziale
Acad. Dr. Marcelo Wagner

ANEXO II

ACADEMICOS CORRESPONDIENTES

ARGENTINA

Acad. Dr. Daniel A. Allemandi
Acad. Dr. Carlos Bregni
Acad. Dr. Marcelo O. Cabada
Acad. Dr. Oscar H. Fay
Acad. Dr. Raul C. Fazio
Acad. Dra. Nilda Fink
Acad. Dr. Carlos Fossati
Acad. Dra. Silvia Gold
Acad. Dr. Ruben H. Manzo
Acad. Dra. María Luz A. Martinez
Acad. Dra. Nélide Mondelo
Acad. Dr. Aldo D. Mottino
Acad. Dra. Elsa M. Nadalin
Acad. Dr. Jorge O. Nicolini
Acad. Dr. Otto A. Orsingher
Acad. Dra. Ana Maria Pechen D'Angelo
Acad. Dra. Gabriela Del Valle Perdigón
Acad. Dra. Clelia M. Riera
Acad. Dr. Víctor Romanowski
Acad. Dr. Marcelo D. Squassini
Acad. Dr. Daniel O. Sordelli
Acad. Dr. Alejandro Vila
Acad. Dra. María Guillermina Volonté

ALEMANIA

Acad. Dr. Pablo Steinberg

BRASIL

Acad. Dr. Aluísio Pimenta
Acad. Dr. Caio Romero Cavalcanti

CHILE

Acad. Dr. Aquiles Arancibia Orrego
Acad. Dr. Marco A. Montes Guyot
Acad. Dr. Rosa I. Morán Gana
Acad. Dra. Wanda Quilhot Palma

COLOMBIA

Acad. Dr. Fleming Martíne Rodríguez

CUBA

Acad. Dr. Ricardo Galvis
Acad. Dr. Héctor Zayas Bazan Y Perdomo

ANEXO II

ACADEMICOS CORRESPONDIENTES

ECUADOR

Acad. Dr. Julio F. Araoz

Acad. Dr. Eduardo Goetchel

ESPAÑA

Acad. Dr. Tomás Adzet Porredón

Acad. Dr. María del Carmen Francés Causapé

Acad. Dr. Eduardo Mariño Hernández

Acad. Dr. Antonio Monge Vega

Acad. Dr. Angel Montero Carcaboso

Acad. Dr. Antonio María Rabasco Alvarez

Acad. Dr. Alberto Ramos Cormenzana

Sacad. Dr. Bartolome Ribas Ozonas

Acad. Dr. Miguel Ylla Catalá Genis

Acad. Dr. Francisco Zaragoza García

ESTADOS UNIDOS

Acad. Dr. Jorge R. Barrio

Acad. Dr. Jorge D. Brioini

Acad. Dr. Marcel E. Nimni

FRANCIA

Acad. Dr. Jean Marc Aïache

Acad. Dr. Paul Fleury

Acad. Dr. Carlos Soto

ITALIA

Acad. Dr. Stefano Govoni

MEXICO

Acad. Dr. Pedro Joseph Nathan

PANAMA

Acad. Dr. Ceferino Sánchez

PARAGUAY

Acad. Dr. Luis H. Berganza

PERU

Acad. Dr. José Amiel Pérez

ANEXO II

URUGUAY

Acad. Dr. Jorge Ares Pons
Acad. Dr. Cayetano Cano Marotta
Acad. Dr. Cosme de los Santos Carvallido
Acad. Dr. Pietro Fagiolino
Acad. Dra. Raquel Lombardo de Bertolaza
Acad. Dr. Justo Emilio Menes
Acad. Dr. Patrick Moyna
Acad. Dr. Anibal Alberto Olmos Ferreira
Acad. Dr. Oscar Polla Bermudez
Acad. Dr. Joaquin E. Royer Meicoso

VENEZUELA

Acad. Dr. José Luis Andrade

ACADEMICOS EMERITOS

Acad. Dr. Sem M. Albonico
Acad. Dr. Arnaldo L. Bandoni
Acad. Dr. Rodolfo Brenner †
Acad. Dr. Mateo Chekherdemian
Acad. Dr. Alfredo A. Hager
Acad. Dr. Ronaldo Meda
Acad. Dr. Modesto C. Rubio
Acad. Dra. Regina L. W. de Wikinski

ACADEMICOS HONORARIOS

ARGENTINA

Acad. Dr. Juan Carlos Bagó
Acad. Dr. Juan Modesto Dellacha
Acad. Dr. Ramón de Torres

BRASIL

Acad. Dr. Evaldo De Oliveira

ESPAÑA

Acad. Dr. Benito del Castillo García
Acad. Dr. Federico Mayor Zaragoza
Acad. Dra. María Teresa Miras Portugal

ITALIA

Acad. Dr. Rodolfo Paoletti

ANEXO III

SECCIONES

- A) SECCIÓN CIENCIAS BIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS, BIOFÍSICAS Y NATURALES (12 miembros)
- B) SECCIÓN CIENCIAS APLICADAS A LA SALUD (12 miembros)
- C) SECCIÓN CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y FARMACOLÓGICAS (12 miembros)

SECCION A: CIENCIAS BIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS, BIOFÍSICAS Y NATURALES

Acad. Dr. María Cristina Añón
Acad. Dr. Mirtha Biscoglio
Acad. Dr. Alberto A. Boveris
Acad. Dr. Néstor O. Caffini (**Coordinador Alterno**)
Acad. Dr. Osvaldo Cascone
Acad. Dra. Nilda Fink
Acad. Dr. Carlos Fossati
Acad. Dr. Silvia Hajos
Acad. Dr. María L. Pita Martín de Portela
Acad. Dr. Edgardo Poskus
Acad. Dr. Otmaro E. Roses
Acad. Dr. Víctor Romanowski (Correspondiente)
Acad. Dr. Juan Pablo F.C. Rossi (**Coordinador**)
Acad. Dr. Rolando Rossi
Acad. Dr. Alfredo Salibian
Acad. Dra. Norma Sterin de Speziale
Acad. Dr. Regina L.W. de Wikinski

SECCION B: CIENCIAS APLICADAS A LA SALUD

Acad. Dr. Ricardo A. Caro
Acad. Dr. Roberto Coco (**Coordinador alternativo**) †
Acad. Dr. Miguel D' Aquino
Acad. Dr. Tomas De Paoli
Acad. Dr. Héctor I. Giuliani
Acad. Dra. Silvia Gold
Acad. Dr. Carlos A. Gotelli
Acad. Dr. Manuel R. Limeres
Acad. Dra. María Luz Martinez
Acad. Dr. Horacio J. G. Mato
Acad. Dr. Marco Pizzolato
Acad. Dr. Marcelo Squassini (Correspondiente)
Acad. Dr. Francisco J. E. Stefano (**Coordinador**)
Acad. Dr. Marcelo Wagner

SECCION C: CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y FARMACOLÓGICAS

Acad. Dr. Carlos M. Baratti
Acad. Dr. Clyde N. Carducci
Acad. Dr. Miguel A. Caso
Acad. Dr. Alberto Diaz
Acad. Dr. Jorge Errecalde
Acad. Dr. Carlos H. Gaozza
Acad. Dr. Alberto Gurni
Acad. Dr. Gabriel O. Gutkind
Acad. Dr. Mario A. Los
Acad. Dra. Virginia Martino (**Coordinador alterna**)
Acad. Nélica Mondelo
Acad. Dr. Marcelo C. Nacucchio
Acad. Dr. Marta M. Salseduc (**Coordinador**)

ANEXO III

COMISIONES 2019

(Por orden alfabético)

- **REUNIONES CIENTÍFICAS, CURSOS Y CONFERENCIAS**

Acad. Maria C. Añon, Acad. Carlos M. Baratti (Coordinador), Acad. Alberto Diaz, Acad. Silvia Hajos, Acad. Marcelo Nacucchio, Acad. Edgardo Poskus y Acad. Dr. Rolando Rossi.

- **PUBLICACIONES, BIBLIOTECA Y CANJE**

Acad. Alberto Gurni (Coordinador Alterno), Acad. Gabriel Gutkind, Acad. Silvia Hajos, Acad. Dr. Mario Los, Acad. Virginia Martino, Acad. Marcelo C. Nacucchio, Acad. María Luz Pita Martín. Acad. Dr. Marco Pizzolato Acad. Marta Salseduc. y Dr. Marcelo Wagner (Coordinador),

- **VINCULACIONES Y RELACIONES PÚBLICAS**

Acad. Mirta Biscoglio, Acad. Miguel A. Caso (Coordinador), Acad. Miguel D´Aquino, Acad. Manuel R. Limeres Acad. Dra. María Luz Martinez y Acad. Marcelo Squassini.

- **EDUCACIÓN FARMACÉUTICA Y BIOQUÍMICA Y ÉTICA**

Acad. Maria C. Añon, Acad. Nestor Caffini, Acad. Dr. Ricardo Caro, Acad. Roberto Coco, Acad. Tomás Di Paoli, Acad. Carlos Gaozza, Acad. Norma Sterin de Speziale y Acad. Regina Wikinski (Coordinadora).

- **PREMIOS Y DISTINCIONES**

Acad. Clyde N. Carducci, Acad. Alberto Diaz, Acad. Dr. Mario Los, Acad. Virginia Martino (Coordinador), Acad. Rolando Rossi, Acad. Alfredo Salibián y Acad. Norma Sterin de Speziale.

- **ESTATUTO Y REGLAMENTO**

Acad. Carlos Baratti, Miguel D´Aquino, Acad. Tomás Di Paoli, Acad. Manuel R. Limeres (Coordinador), Acad. Juan Pablo Rossi y Acad. Marta Salseduc.



Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica

La Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica tiene el agrado de invitar a Ud. a la Conferencia que pronunciará la Acad. Ana Pechén acerca del tema "Vaca Muerta: La explotación de los recursos hidrocarburíferos no convencionales en Argentina. Desafíos y oportunidades". La misma se celebrará el Jueves 23 de mayo de 2019 a las 14:00 hs., en la Sala de conferencias "Pbro. Antonio Sáenz" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica – UBA. Junín 956 PP C.A.B.A.

Saludamos a Usted con alta consideración.

Acad. Manuel Limeres
Secretario

Acad. Gabriel Mato
Presidente



*Academia Nacional
de Farmacia y Bioquímica*

VACA MUERTA: GAS Y PETRÓLEO PARA ARGENTINA



CONFERENCIA

Resumen

Las proyecciones de la Agencia Internacional de Energía (IAE) sobre la demanda energética mundial señalan que el consumo crecerá un 25 % en los próximos 20 años. Se calcula que, si bien las energías renovables y la generación nuclear serán las que más crecerán, no alcanzarán, en ese plazo, para reemplazar a los combustibles fósiles, los que seguirán siendo las fuentes principales de energía con una participación del 80% en la matriz global. En ese contexto, la aparición de nuevas tecnologías que permiten explotar los reservorios no convencionales de hidrocarburos constituye una alternativa apropiada y factible de desarrollar en términos de costo/beneficio para los próximos años.

La cuenca neuquina es considerada una de las más interesantes de estudiar porque tan solo el potencial de Vaca Muerta es de 307,7 TCF (trillones de pie cúbicos) de gas y 16,2 BBO (billones de barriles o miles de millones de barriles) de petróleo, constituyendo la segunda y cuarta reserva mundial de estos hidrocarburos. La extracción de estos recursos requiere de operaciones más sofisticadas y complejas que las que se emplean en los reservorios convencionales, incluyendo perforaciones horizontales y estimulación hidráulica. Este proceso demanda grandes volúmenes de agua, agentes de sostén como arenas especiales, diversos químicos y una red de cañerías que permite coleccionar el fluido y transportarlo.

En el proceso se genera un importante volumen de agua de producción que retorna a la superficie con un alto contenido de sólidos disueltos y varios compuestos orgánicos e inorgánicos de origen geogénicos. Entre estos predominan algunos compuestos halogenados como cloruros, bromuros, fluoruros; estroncio y bario, algunos elementos radioactivos naturales y aditivos que se utilizan en la fractura, Este “flowback” y agua de producción debe ser tratado, pudiendo ser reutilizado o reinyectado en unidades geológicas profundas. La disposición de estos fluidos posee normas estrictas y la presión sobre las empresas para que las reutilicen y reduzcan su volumen ha aumentado, al igual que los controles sobre las mismas con el objeto de minimizar la disposición de grandes volúmenes en sumideros y reducir el riesgo de sismicidad.

La comparación de las condiciones que corresponden a los reservorios no convencionales operados en Estados Unidos con las presentes en Vaca Muerta es fundamentalmente diferente. La profundidad y espesor de la roca generadora, situadas a más de 3000 m, hace poco probable la migración de metano u otros hidrocarburos volátiles a los escasos o nulos acuíferos poco profundos existentes en esta región semiárida. También la calidad de las rocas y geología del lugar son particularmente diferentes. Por otra parte

no existen en las proximidades de las locaciones poblaciones con un número sustantivo de habitantes estando la mayoría de las explotaciones aisladas en la meseta patagónica, mientras que en Estados Unidos se estima que 9.400.000 personas viven a una distancia inferior a 1,6 Km de las locaciones.

Si bien existen indicios de posibles efectos nocivos sobre la salud, no hay a la fecha, estudios epidemiológicos suficientes que permitan caracterizar de manera concluyente estas observaciones. Los mayores impactos son los provenientes de la contaminación del aire, del agua, del tráfico intenso de vehículos pesados, el exceso de ruido y el estrés psicosocial asociado a los cambios de las costumbres de las comunidades aledañas. Los registros de efectos sobre la salud de los trabajadores de la industria son también limitados, pero en general se los asocia con el riesgo de accidentes por el uso de equipamiento pesado, la inhalación de finas partículas de arenas y sílice que pueden producir enfermedades del pulmón o la exposición a algún derrame de los químicos utilizados en el proceso.

Sin duda, la explotación de los hidrocarburos no convencionales se incrementará en Neuquén, en el país y en el mundo en las próximas décadas. Para controlar el impacto ambiental que la misma produce es imprescindible conocer las variaciones regionales existentes y la tecnología aplicada, poniendo en valor las diversas estrategias desarrolladas en el mundo para minimizar los impactos sobre el medio ambiente y el ecosistema económico, político y social.



Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica

Buenos Aires, junio de 2019

La **ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA** tiene el agrado de invitar a Usted a la **Jornada Científica**, organizada por la Sección Ciencias Farmacéuticas y Farmacológicas, **“Tecnología Farmacéutica y Biofarmacia en la Universidad Nacional de Córdoba”** que se realizará el 27 de junio próximo, de 14:00 a 18:00 horas en su sede Facultad de Farmacia y Bioquímica, Salón de Conferencias “Pbro. Antonio Sáenz”, Junín 956, Buenos Aires.

Esperamos contar con su presencia y saludamos a Usted con nuestra más distinguida consideración.

Acad. Manuel Limeres
Secretario

Acad. Gabriel Mato
Presidente

PROGRAMA

14:00 – 14:30	Dr. Rubén Manzo - Presentación: Breve historia del desarrollo del grupo (objetivos y metas). Descripción de las principales líneas de investigación y desarrollo
14:30 – 15:00	Dra. María Eugenia Olivera - Prof. Asociada UNC - Investigadora Independiente UNITEFA/CONICET - “Plataforma tecnológica basada en polielectrolitos portadores y derivados farmacéuticos.”
15:00 – 15:30	Dr. Santiago Palma - Prof. Asociado UNC - Investigador Principal UNITEFA/CONICET - “Nanocristales como estrategia para mejorar la biodisponibilidad en formulaciones para la vía oral.”
15:30 – 15:45	Intervalo
16:00 – 16:30	Dr. Daniel Allemandi - Prof. Titular UNC - Investigador Principal UNITEFA/CONICET - “Alternativas tecnológicas para el desarrollo de nuevos adyuvantes para vacunas.”
16:30 – 17:00	Dr. Álvaro F. Jiménez Kairuz - Prof. Adjunto UNC - Investigador Independiente UNITEFA/CONICET - “Desarrollo de sistemas portadores interpolielectrolitos.”
17:00 – 17:30	Dra. Fabiana Alovero - Prof. Adjunta UNC - Investigadora Adjunta UNITEFA/CONICET - “Contribuciones farmacotécnicas a la eficacia de antimicrobianos frente a microorganismos resistentes.”

Dr. Rubén H. Manzo

Presentación del equipo de trabajo en tecnología farmacéutica y biofarmacia.

Breve historia del desarrollo del grupo (objetivos y metas). Descripción de las principales líneas de investigación y desarrollo. Equipamiento disponible. Difusión de resultados (publicaciones, patentes, convenios). Formación de RRHH. Impacto internacional, nacional y regional de la actividad del grupo.

Rubén H. Manzo es Farmacéutico, Bioquímico, Dr. En Farmacia. Profesor Emérito del Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Académico Correspondiente de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica y de la Real Academia de Farmacia de España. Vocal de la Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina. Se ha desempeñado como profesor de la Asignatura Farmacotecnia I hasta el año 2014. Ha dictado cursos de pos-grado en diversas universidades argentinas, de América y Europa. Ha dirigido el grupo de investigación en Farmacotecnia y Tecnología Farmacéutica, que forma parte de la Unidad Ejecutora de CONICET denominada UNITEFA (unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica) habiendo dirigido 14 tesis doctorales y 2 de maestría y publicado 114 artículos científicos originales en revistas especializadas de difusión internacional y varios capítulos en libros especializados. Ha patentado moléculas de antimicrobianos fluoroquinolónicos, nuevos derivados farmacéuticos y productos derivados del aceite de jojoba.

Dra. María Eugenia Olivera

“Nanoestructuras inteligentes. Plataforma tecnológica basada en polielectrolitos portadores y derivados farmacéuticos.”

Durante las últimas décadas, los polielectrolitos se convirtieron en uno de los temas más atractivos de la investigación científica debido a su gran potencial en el área de la tecnología farmacéutica. Los polielectrolitos son polímeros con grupos funcionales ionizables capaces de establecer interacciones no covalentes con fármacos de carga opuesta para formar complejos polielectrolito-fármacos (PE-F). Los complejos PE-F pueden ser obtenidos tanto en dispersiones acuosas como en forma sólida, se comportan como reservorios de los F que se incorporan y permiten modular su liberación. Además, tienen la capacidad de interactuar con las membranas biológicas mediante bioadhesión o modificación de la permeabilidad. Estas propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas únicas han sido explotadas para el desarrollo de sistemas de liberación modificada de fármacos para diversas vías de administración, cuyas aplicaciones han sido exploradas en investigaciones básicas, en ensayos preclínicos y en estudios clínicos controlados, conformando equipos multidisciplinarios ad hoc. En esta presentación se proporcionará una revisión actualizada de los complejos PE-F abarcando su clasificación, caracterización y aplicaciones terapéuticas.

La Dra. Olivera es Profesora Asociada en la Facultad de Ciencias Químicas, UNC y responsable de la Asignatura Farmacotecnia 1. Es Investigadora Independiente del CONICET en el área de Tecnología Farmacéutica y Biofarmacia y CATEGORÍA I del Programa de Incentivos a Docentes-Investigadores del Ministerio de Educación. Se graduó como Farmacéutica en la FCQ-UNC donde también realizó su Doctorado, bajo la dirección del Dr. Rubén H. Manzo. Es autora de varios capítulos de libro en el área de la Tecnología Farmacéutica y la Biofarmacia y ha publicado numerosos artículos científicos en revistas de impacto internacional. Ha obtenido patentes de invención sobre la obtención de nuevos derivados farmacéuticos de utilidad en medicina humana y veterinaria.

Varios de sus trabajos han sido premiados en reuniones científicas nacionales e internacionales incluyendo el *Techconnect Global Innovation Awardee* (Washington, USA, en 2013 y 2014). Ha dictado conferencias y cursos en reuniones científicas nacionales e internacionales y se ha desempeñado como profesora visitante en otras universidades del país y del extranjero. En el ámbito académico y administrativo ha ocupado varias posiciones,

incluyendo la dirección del Departamento de Ciencias Farmacéuticas, la codirección del Centro de Información de Medicamentos de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC y la dirección del Programa de la Universidad Nacional de Córdoba para la Evaluación de la Biodisponibilidad/ Bioequivalencia de medicamentos. También ha sido Consejera en la misma facultad y consiliaria del Honorable Consejo Superior. Desde 2005 lideró el proyecto que llevó a creación de la Especialización en Farmacia Hospitalaria como carrera de posgrado en la UNC, primera de su tipo en el ámbito nacional, la cual ha dirigido desde su creación hasta la fecha, conduciendo los procesos de acreditación y el dictado de 3 cohortes consecutivas. Ha dirigido 8 Tesis de Doctorado y Maestría en la Facultad de Ciencias Químicas-UNC y en la de Ciencias Médicas-UNC. Paralelamente ha dirigido varios trabajos de especialización en Farmacia Hospitalaria. Ha recibido numerosos subsidios de investigación financiados por CONICET, ANPCyT, el Ministerio de Salud de la Nación, la SECyT de la UNC. Es miembro de la Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina y es asesora del Ministerio de Salud de Córdoba y del Colegio de Farmacéuticos de Córdoba en el área de Farmacovigilancia, Formulaciones Magistrales y Buenas Prácticas Farmacéuticas. Es Miembro de la Conferencia Iberoamericana de Facultades de Farmacia, COIFFA.

Dr. Santiago Palma

“Nanocristales como estrategia para mejorar la biodisponibilidad en formulaciones para la vía oral.”

Los nanocristales (NC) son descritos como una herramienta útil para aumentar la biodisponibilidad de fármacos debido a que es posible obtener partículas con tamaños por debajo de $1\mu\text{m}$ y con capacidad para redispersarse fácilmente en entornos acuosos. La característica clave de los NCs es la gran área de superficie obtenida lo que conduce a una saturación más rápida de la capa de disolución, con el consiguiente aumento en la velocidad de disolución. Estas ventajas, además de la simplicidad de la formulación y la facilidad de escalado, ha atraído notablemente la atención de la industria farmacéutica, lo cual se refleja en el lanzamiento al mercado de seis productos farmacéuticos con licencia, y otros cuatro en la etapa de estudios pre-clínicos. En la presentación se mostrarán algunos resultados obtenidos con el uso de nanocristales para aplicaciones específicas en medicina humana y veterinaria. En particular, se describirá la obtención de nanocristales redispersables mediante un proceso simple, altamente reproducible y escalable.

Santiago Daniel Palma es Farmacéutico/Bioquímico y Doctor en Ciencias Químicas por la Universidad Nacional de Córdoba (UNC), Argentina. Actualmente es Profesor Asociado de la misma Universidad e Investigador Principal del CONICET. Realizó una estancia posdoctoral en la Università degli Studi di Firenze (Italia) durante el año 2005. Su proyecto de Investigación está relacionado al diseño, desarrollo y evaluación de Plataformas nanotecnológicas de liberación de fármacos en el marco del cual ha dirigido y codirigido más de 10 Tesis Doctorales. Ha publicado más de 100 trabajos científicos en revistas internacionales y es coautor de 9 Patentes de Invención. Es miembro titular de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE) y la Asociación Argentina de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO). Ha sido Director del Departamento de Ciencias Farmacéuticas y del Centro de Información de Medicamentos (CIME) de la Universidad Nacional de Córdoba.

Dr. Daniel Allemandi

“Alternativas tecnológicas para el desarrollo de nuevos adyuvantes para vacunas.”

Las vacunas han permitido el control e inclusive la erradicación de numerosas enfermedades que han amenazado la salud de la población. Actualmente su uso no se limita solamente al tratamiento profiláctico sino que también están siendo utilizadas como agentes terapéuticos en alergia, enfermedades autoinmunes y cáncer. Tradicionalmente, las vacunas han sido desarrolladas utilizando como antígenos los agentes patógenos muertos o atenuados. Sin embargo, actualmente las nuevas vacunas se diseñan utilizando fragmentos denominados “subunidades”. Estos fragmentos o subunidades se obtienen de forma más pura, con menores efectos adversos mediante procesos de elaboración más simples. Desafortunadamente, la alta pureza de estos antígenos lleva a que tengan mucho menor poder inmunogénico. En este contexto, normalmente la formulación de vacunas tiene implícito el uso de los denominados “adyuvantes”, que producen una estimulación adicional potenciando el efecto inmunológico. Los adyuvantes inmunológicos comprenden un grupo muy numeroso y heterogéneo de sustancias, las cuales pueden ser divididas en dos subgrupos: i) potenciadores inmunológicos y ii) vehículos o sistemas de liberación del antígeno.

Entre los primeros se pueden mencionar lipopéptidos, saponinas, fragmentos de ADN, entre otros; y ejercen su acción mediante la interacción directa con receptores específicos. Entre los segundos se incluye sistemas de distintas características, tales como sales de aluminio, emulsiones, complejos lipídicos y sistemas nanoparticulados; y pueden incrementar la respuesta a través de múltiples mecanismos, dependiendo de las características particulares de cada sistema.

En esta presentación se abordarán aspectos tales como la evolución y las características los distintos adyuvantes utilizados y actualmente bajo estudio, incluyendo los nuevos sistemas nanoparticulados. Se presentarán resultados de investigaciones realizadas relacionadas al desarrollo de un sistema adyuvante basado en cristales líquidos.

Daniel A. Allemandi es farmacéutico (1985), doctor en ciencias químicas (1992). Se desempeña como Profesor Titular (DE) del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba e Investigador Principal CIC-CONICET. Se desempeña como Director de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica UNITEFA UNC-CONICET. Es responsable del Dictado de la asignatura FARMACOTECNIA II. Es Miembro de la Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina. Ha dirigido seis tesis de doctorado y es autor y co-autor de más de 95 artículos científicos. Es Co-titular de 5 patentes de invención e Investigador responsable de diversos servicios a terceros y convenios de desarrollo a empresas del medio.

Dr. Álvaro F. Jiménez Kairuz

“Desarrollo de sistemas portadores micro y nanoparticulados basados en polímeros biocompatibles para aplicación tópica y peroral. “

La presentación se focalizará en los avances que se han tenido en los últimos años en cuanto al desarrollo de sistemas portadores de fármacos con reconocida utilidad, basados en la interacción iónica entre polielectrolitos polímeros biocompatibles naturales o de semisíntesis y estos. Se resaltarán la flexibilidad que posee esta plataforma tecnológica para obtener diferentes formas farmacéuticas (dispersiones, hidrogeles, films bioadhesivos, micropartículas y polvos) con una amplia variedad de aplicaciones terapéuticas para optimizar la acción farmacológica de antibióticos y antiparasitarios de uso tópico o peroral. Se resalta el trabajo interdisciplinario que se viene realizando junto a investigadores de otras áreas de la ciencia con el fin de obtener nuevos materiales inteligentes y la evaluación preclínica in vitro e in vivo, garantizando así todas las etapas del desarrollo de productos innovadores con utilidad farmacoterapéutica.

Álvaro Federico Jiménez Kairuz. Graduado de Farmacéutico en 1997 y Dr. en Ciencias Químicas en 2004. Se desempeña desde 2009 y 2017 como Profesor Adjunto del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la FCQ-UNC e investigador Independiente del CONICET, respectivamente. Su producción científica ha recibido numerosos premios y menciones y se focaliza al área de la Tecnología Farmacéutica, colaborando interdisciplinariamente con diferentes grupos nacionales y extranjeros. Es autor de 40 artículos originales, más de 80 presentaciones a reuniones científicas nacionales e internacionales y coautor de 3 capítulos de libro. Participa en la dirección de subsidios a la investigación y posee convenios y vinculación con el sector productivo de bienes y servicios.

Dra. Fabiana Alovero**“Contribuciones farmacotécnicas a la eficacia de antimicrobianos frente a microorganismos resistentes.”**

La disminución de la eficacia de los antimicrobianos (ATM) disponibles en terapéutica por el desarrollo de resistencia a esos fármacos, conduce a considerar enfoques alternativos para el control de infecciones. Se presentarán avances obtenidos en el desarrollo de 1 proyecto destinado a desarrollar alternativas para atenuar la problemática mundial de falta de eficacia de ATM, estudiando los efectos de polímeros seleccionados sobre *P.aeruginosa* y *S.aureus*, tal que combinando diferentes mecanismos de acción conduzcan a potenciar su eficacia y/o modificar propiedades fisicoquímicas y/o biofarmacéuticas desfavorables de esos ATM mediante el desarrollo de sistemas portadores con potencial utilización en el diseño de sistemas farmacoterapéuticos para la vía tópica, recuperando la utilidad de ATM conocidos o generando nuevas opciones terapéuticas. En el mismo contexto, se aborda la evaluación de agentes fotosensibilizadores y la I+D de sistemas portadores de los mismos para aplicación en terapia fotodinámica antimicrobiana.

Fabiana del Luján Alovero. Microbióloga – UNRC (1991), Doctora en Ciencias Químicas – UNC (1997). Profesora Adjunta (DE) en Departamento de Ciencias Farmacéuticas. FCQ-UNC. e Investigador Adjunto CONICET. Responsable del dictado de Microbiología General y Farmacéutica y Análisis Farmacéutico II. Directora Alterna de la Especialización en Esterilización - UNC. Directora, Coordinadora y docente de cursos de Doctorado, Actualización Profesional y Especialización. Docente- Investigador Categoría I. Área Ingeniería de procesos y Biotecnología, Subdisciplina: Cs. Médicas. Área de Especialización: Microbiología Farmacéutica/controles de calidad biológicos. Sistemas portadores de antimicrobianos y agentes fotosensibilizadores. Mecanismo de acción y resistencia antimicrobiana. Directora de becas doctorales de CONICET, de Tesis Doctorales, de Maestría y de Especialización. Directora/Co-responsable de subsidios de SECyT-UNC, FONCyT, CONICET. Responsable Técnica de una de las áreas proyecto FONTAR y de STAN-CONICET. Autora/co-autora de Publicaciones en Int J Antimicrob Agents, Antimicrob Agents & Chemother, Int J Pharm, Eur J Med Chem, FEMS Microbiol Lett, Dyes and Pigments, Materials Science and Engineering, Carbohydrate Polymers; numerosos *proceedings* en revistas especializadas, presentaciones en Congresos Nacionales e Internacionales y capítulos de libros.



*Academia Nacional
de Farmacia y Bioquímica*

Buenos Aires, julio de 2019

*La **ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA** tiene el agrado de invitar a Usted a la Jornada Científica, organizada por la Sección Ciencias Biológicas, Bioquímicas, Biofísicas y Naturales, “**Vacunas y Vacunaciones**” que se realizará el 15 de agosto próximo, de 09:00 a 18:00 horas en su sede Facultad de Farmacia y Bioquímica, Salón de Conferencias “Pbro. Antonio Sáenz”, Junín 956, Buenos Aires.*

Esperamos contar con su presencia y saludamos a Usted con nuestra más distinguida consideración.

Acad. Manuel Limeres
Secretario

Acad. Gabriel Mato
Presidente



Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica

JORNADA CIENTÍFICA

Sección Ciencias Biológicas, Bioquímicas, Biofísicas y Naturales

“Vacunas y Vacunaciones”*

Jueves 15 de agosto de 2019

Sala de Conferencias de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Junín 956, CABA

Coordinación General: Prof. Dra. Silvia Hajos - Prof. Dra. Silvia González Ayala - Prof. Dr. Carlos Fossati

¿Qué son las vacunas?

¿Para qué sirven?

¿Siempre nos tenemos que vacunar?

¿Se debe cumplir con el calendario nacional obligatorio?



¿Por qué resurgen brotes de sarampión y otras patologías que se consideraban erradicadas a nivel mundial?

Una vacuna es una preparación biológica que va a conferir inmunidad contra una patología determinada. Esta contiene un microorganismo, una parte o un producto derivado del mismo, el que va a estimular la respuesta inmune del individuo para prevenir la enfermedad. El sistema inmune reconoce a este agente como extraño y genera una respuesta que tiene memoria y va a reconocer al patógeno cuando el sujeto vacunado se vea expuesto a una infección posterior por dicho microorganismo.

Existen diferentes tipos de vacunas: a microorganismos vivos atenuados, a microorganismos enteros inactivados (virales o bacterianos) a Polisacáridos, a Proteínas purificadas, Conjugadas, Recombinantes, a ADN, etc. Negarse a la vacunación acarrea un riesgo sanitario y económico sumamente alto.

Durante esta Jornada se realizará una breve introducción al funcionamiento de la respuesta inmune, la respuesta generada por la vacunación y una revisión de algunas de las principales vacunas propuestas dentro del calendario de vacunación obligatorio y/o recomendadas, tanto para niños como para adolescentes y adultos, con énfasis en los problemas y perjuicios que produce la negación a la vacunación. Para ello contaremos con la palabra fundamentada de reconocidos especialistas en cada uno de los temas a desarrollar.

PROGRAMA	
09:00 – 09:20	Inscripción
09:20 – 09:30	Inauguración
09:30 – 10:00	Prof. Dra. Elida Álvarez (FFyB – CONICET) - “Aspectos básicos de la Respuesta Inmune.”
10:00 – 10:30	Prof. Dr. Emilio Malchiodi (FFyB – CONICET) - “Aspectos básicos sobre Vacunas de uso humano. Vacunas bacterianas actuales y nuevos desarrollos.”
10:30 – 11:00	Prof. Dra. Lucía Cavallaro (FFyB - Presidenta SAV) - “Aspectos básicos sobre Vacunas de uso humano. Vacunas virales.”
11:00 – 11:20	Intervalo
11:20 – 12:00	Dra. Carla Vizzotti (Presidenta SAVE - Directora CEPyCET) - “Criterios para la inclusión de Vacunas al Calendario Nacional
12:00 – 12:40	Prof. Dr. Eduardo L. López (Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, Facultad de Medicina - UBA, Universidad de El Salvador) - “Vacunas: Estado, dudas y rechazos a las vacunas.”
14:00 – 15:30	<p>Mesa Redonda: “Vacunación de niños y adolescentes”: □</p> <p>Dra. María M. Contrini (SADIP, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez) - “Vacunas con componente Pertussis acelular”</p> <p>Dra. Silvina Neyro (DiCEI, Hospital de Niños Dr. R Gutiérrez, SADI, SADIP) - “Vacuna Meningocócica”</p> <p>Dra. Hebe Vázquez (Centros Stambouliau, Helios Salud) - “Vacuna contra HPV”</p>
15:30 – 15:50	Intervalo
15:50 – 17:30	<p>Mesa Redonda: “Vacunación del adulto”:</p> <p>Dra. Miriam Rozenek (Hospital Italiano Buenos Aires, SADI) - “Vacuna Neumocócica” -</p> <p>Dr. Pablo Bonvehí (CEMIC - VACUNAR) - “Influenza”</p> <p>Dr. Daniel Stecher (Hospital de Clínicas de la Universidad de Buenos Aires) - “dT y Hepatitis B”</p>
17:30	Cierre y discusión
17:40	Entrega Premios ANFyB 2018

CONFERENCIAS**Resúmenes****Prof. Dra. Elida Álvarez****“Aspectos básicos de la Respuesta Inmune.”**

Para entender cómo y por qué ocurre la protección otorgada por la aplicación de las vacunas frente a los microorganismos patógenos, debemos entender como el sistema inmune ayuda a nuestro organismo a combatir una infección. El sistema inmune está constituido por un conjunto de células y factores que actúan de manera altamente coordinada para alcanzar tal protección mediante mecanismos específicos y la generación de memoria inmunológica. Por ello cuando un organismo cuenta con inmunidad es capaz de identificar a los microorganismos infecciosos que llegan a penetrar en nuestro cuerpo, responder adecuadamente para reducir la amenaza, eliminando las sustancias nocivas y los microorganismos infecciosos, mediante el desarrollo de un proceso inflamatorio junto con el accionar de la inmunidad celular y la producción de anticuerpos como respuestas biológicas que permiten combatir estos peligros.

La Dra. Álvarez es Profesora Titular de la Cátedra de Inmunología en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA e investigadora Principal en el IDEHU UBA-CONICET.

Prof. Dr. Emilio Malchiodi**“Aspectos básicos sobre Vacunas de uso humano. Vacunas bacterianas actuales y nuevos desarrollos.”**

Las vacunas bacterianas actuales utilizan como antígeno inmunizante bacterias atenuadas, muertas, o fracciones de estas, lo que incluye polisacáridos de membrana o toxoides. Los nuevos desarrollos incluyen proteínas recombinantes y/o su DNA codificante, a lo que se suma el empleo de nuevos adyuvantes que orientan la respuesta inmune generando efectores más eficientes para combatir la infección.

El Dr. Malchiodi es Bioquímico y Dr. en Inmunología de la Universidad de Buenos Aires. Su Tesis de Doctorado fue sobre el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Completó estudios postdoctorales en la Universidad de Maryland, trabajando en biofísica y determinación de la estructura tridimensional de proteínas de interés inmunológico mediante cristalografía de rayos X. Actualmente es Profesor y Catedrático de Inmunología en la Universidad de Buenos Aires, Investigador Superior CONICET y Director del Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral Prof. Dr. R.A. Margni (UBA-CONICET). Actualmente está desarrollando una vacuna contra la enfermedad de Chagas, analizando varias combinaciones de antígenos y adyuvantes y estudiando el uso de nanopartículas y nanomateriales en el desarrollo de vacunas y su impacto en el sistema inmune.

Prof. Dra. Lucía Cavallaro**“Aspectos básicos sobre Vacunas de uso humano. Vacunas virales.”**

La Dra. Cavallaro es Bioquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA (1981). Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área Virología (1997). Prof. titular regular con dedicación exclusiva. Cátedra de Virología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Lugar de trabajo. Cátedra de Virología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Tema de trabajo: Desarrollo de nuevos antivirales. Otros cargos: Presidenta de la Sociedad Argentina de Virología, División de la Asociación Argentina de Microbiología. 2017-2019 y 2019-2021.

Dra. Carla Vizzotti**“Criterios para la inclusión de Vacunas al Calendario Nacional.”**

La Dra. Vizzotti es Médica, especialista en medicina interna, fellow-ship en enfermedades infecciosas, especialista en Sistemas y Seguridad Social de la Universidad Isalud. Es miembro del Grupo Técnico Asesor en Prácticas de Inmunizaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) desde 2013, miembro de la Sociedad Latinoamericana de Infectología Pediátrica (SLIPE) desde 2018, Miembro de la Comisión de Vacunas de la Sociedad Argentina de Infectología (SADI desde 2007, Miembro del Comité Científico de la Fundación Vacunar desde 2019. Es socia fundadora y Presidente de la Sociedad Argentina de Vacunología y Epidemiología (SAVE). Se desempeña como Directora del Centro de Estudios para la Prevención y Control de Enfermedades Transmisibles (CEPyCET), en la Universidad Isalud. Es Consultora en Análisis de Estrategias Sanitarias de Fundación Huésped y asesora en la Comisión de Acción Social y Salud Pública de la Honorable Cámara de Diputados de la Nación. Estuvo a cargo de la Dirección de control de enfermedades Inmunoprevenibles del Ministerio de Salud de la Nación en Argentina de 2007 a 2016, formo partes del Grupo Asesor Técnico de Inmunización Materna de la Organización Mundial de la Salud desde 2014-2016, Grupo Asesor Técnico de Inmunización Materna para la Organización Panamericana de la Salud (2014-2016), Miembro del Consejo Fundador de IAIM (International Association of Immunization Managers/Asociación Internacional de Gerentes de Inmunizaciones) (2013-2015). Miembro de la Comisión Directiva de la Sociedad Argentina de Infectología (2013-2018).

Prof. Dr. Eduardo L. López**“Vacunas: Estado, dudas y rechazos a las vacunas.”**

El Dr. López es Jefe de Departamento Medicina Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez. Director de la Carrera de Infectología Pediátrica, Facultad de Medicina de la UBA. Profesor Titular Infectología Pediátrica, Universidad de El Salvador. Miembro del CORE de la Comisión Nacional de Inmunizaciones.

Mesa Redonda: “Vacunación de niños y adolescentes”:**Dra. María M. Contrini****“Vacunas con componente Pertussis acelular”**

La Dra. Contrini es Presidenta de la Sociedad Argentina de Infectología Pediátrica. Jefa de Unidad Infectología Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez.

Dra. Silvina Neyro**“Vacuna Meningocócica”**

La enfermedad meningocócica invasiva representa un problema de salud pública mundial. La infección por *Neisseria meningitidis* (meningococo) produce una enfermedad infectocontagiosa grave, que se caracteriza por cuadros invasivos de extrema severidad como son la meningitis, bacteriemia, sepsis y meningococemia; con alto riesgo de secuelas graves e irreversibles, principalmente neurológicas. La evolución clínica suele ser devastadora y el 10% de los enfermos muere, generalmente, entre las 24 y 48 horas de observado el primer síntoma.

En Argentina se notifican entre 120-300 casos/año, de los cuáles el 100% requiere internación. El grupo etario principalmente comprometido incluye a niños los menores de 1 año. No se evidencia un aumento de la tasa de incidencia en adolescentes, a diferencia de lo que ocurre en otros países del mundo. Sin embargo, los adolescentes y adultos jóvenes representan el principal grupo portador de la bacteria a nivel nasofaríngeo, con riesgo de transmisión a los lactantes.

En el año 2017, la vacuna antimeningocócica tetravalente conjugada (ACYW) fue introducida al Calendario Nacional de Vacunación para lactantes y adolescentes con el objetivo de disminuir la mortalidad y secuelas por esta patología, con una visión de equidad, que permita el acceso a la vacunación en forma universal, gratuita y obligatoria.

La Dra. Neyro es Médica: Facultad de Medicina de la Universidad del Salvador. Año 2003. Residencia médica básica (Pediatria) y post-básica (Infectología Infantil): Hospital de Niños “Dr. Ricardo Gutiérrez”, Ciudad de Buenos Aires. Períodos: Junio 2004 a Mayo 2008; Junio 2008 a Mayo 2011 (respectivamente). Especialista Universitario en Pediatría e Infectología Infantil: Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. Años: 2009 y 2011 (respectivamente). Instructora de Residentes de Infectología Pediátrica: Hospital de Niños “Dr. Ricardo Gutiérrez”, Ciudad de Buenos Aires. Período: Junio de 2011 a Mayo 2013. Médica Pediatra.

Asistente Interino Titular del Guardia: Servicio de Urgencias del Hospital de Niños “Dr. Ricardo Gutiérrez”. Ciudad de Buenos Aires. Período: Julio de 2013 a Marzo de 2016. Médica Infectóloga para la Dirección de Control de Enfermedades Inmunoprevenibles (DiCEI), Ministerio de Salud y Desarrollo Social de la Nación Período: desde febrero 2012 a la actualidad. Miembro del área de Recomendaciones Científicas cuya labor incluye: la revisión sistemática de evidencia científica y asesoría para la introducción de nuevas vacunas al Calendario Nacional de Vacunación (CNV); formulación de guías, normas y lineamientos técnicos; supervisión de aspectos logísticos y la participación en capacitaciones. Coordinadora de la vacunación en Huéspedes Especiales y prematuros, la vacunación pediátrica y las vacunas recientemente introducidas al CNV de Argentina (rotavirus, varicela y meningococo), en cuanto a implementación, actualización de recomendaciones y evaluación del impacto de las estrategias implementadas. Médica Infectóloga Pediatra, Interina de Planta: Sección de Tisiología, Servicio de Infectología Pediátrica, Hospital de Niños Dr. R Gutiérrez. Período: desde abril de 2016 a la actualidad. Miembro titular de la Sociedad Argentina de Pediatría (SAP), de la Sociedad Argentina de Infectología (SADI) y miembro de la Comisión Directiva de la Sociedad Argentina de Infectología Pediátrica (SADIP).

Dra. Hebe Vázquez

“Vacuna contra HPV”

Los virus del papiloma humano (VPH) son de las causas más frecuentes de infecciones de transmisión sexual en el mundo. Originan una amplia gama de enfermedades tanto en hombres como en mujeres que incluyen lesiones pre malignas que pueden progresar a cáncer. A pesar de que la mayoría de las infecciones por VPH no desarrollan síntomas y se resuelven espontáneamente, la persistencia de las mismas puede provocar enfermedad. En las mujeres, la infección persistente por genotipos de VPH de alto riesgo oncogénico, es la causa principal del cáncer cervical y de sus precursores. También se la asocia con el desarrollo de cánceres de vulva y vagina y oro-faríngeos y ano genitales en ambos sexos. Los tipos de VPH de bajo riesgo provocan verrugas genitales y papilomatosis laríngea, lesiones que aunque benignas causan impacto en los pacientes y en el sistema de salud debido a sus recurrencias. Las vacunas contra VPH son preventivas. En Argentina, disponemos de la vacuna bivalente que incluye dos tipos de VPH 16 y 18 presentes en 70% de los casos de cáncer cuello de útero que también causan cánceres de vulva, vagina, pene, ano, recto y en orofaringe y la cuadrivalente; además de los tipos 16 y 18, esta vacuna suma protección contra otros dos tipos 6 y 11 presentes en 90% de las verrugas genitales. La vacuna cuadrivalente está incorporada al Calendario Nacional de Vacunación para niñas y niños de 11 años de edad. También para varones y mujeres conviviendo con el virus de VIH y trasplantados de 11 a 26 años. Aunque el mayor beneficio se obtiene si se aplican antes de iniciar la vida sexual activa, también son útiles en jóvenes y adultos, en quienes se pueden prevenir lesiones por VPH y sus recurrencias (tratamiento adyuvante).

La Dra. Vázquez es Médica infectóloga en Centros Stambouliau y Helios Salud. Coordinadora del Grupo de Trabajo de VPH y otras ITS Centros Stambouliau. Miembro de la Comisión Vacunas Asociación Panamericana de Infectología. Secretaria de Comisión Vacunas SADI. Representante de la Sociedad Argentina de Infectología (SADI) en Comisión Nacional de Inmunizaciones CoNaln.

Mesa Redonda: “Vacunación del adulto”:

Dra. Miriam Rozenek

“Vacuna Neumocócica”

El *Streptococcus pneumoniae* es un patógeno que afecta frecuentemente a las personas, especialmente a aquellas en los límites de la vida, niños menores de 2 años y adultos mayores de 65. Otras personas fuera de estas edades con comorbilidades como diabetes, enfermedades crónicas pulmonares, cardiovasculares, renales o hepáticas, inmunocomprometidos, entre otros, también son más susceptibles de infectarse con este germen. Para su prevención existen en nuestro medio 2 vacunas complementarias. La vacuna conjugada 13 valente, y la vacuna polisacárida 23 valente. En esta charla conversaremos sobre estas vacunas, su efectividad, coberturas en nuestro medio, e indicaciones de las mismas.

La Dra. Rozenek es Médica Infectóloga Hospital Italiano Buenos Aires Secretaria de la Comisión de Vacunas de la Sociedad Argentina de Infectología.

Dr. Pablo Bonvehí
“Influenza”

Las primeras vacunas antigripales fueron desarrolladas en la década del 40, hace casi ya 80 años y se ha avanzado mucho en la tecnología para la elaboración de las mismas. Actualmente se dispone en el mundo de vacunas elaboradas con virus totalmente inactivados, fraccionados o de subunidades de administración intramuscular con o sin adyuvantes y también de vacunas a virus vivos atenuados de administración intranasal. Desde hace muchos años existen vacunas trivalentes que contienen dos subtipos del virus de influenza A (H1N1 y H3N2) y una cepa del virus B y más recientemente vacunas cuadrivalentes que contienen los dos subtipos del virus A y los dos linajes (Yamagata y Victoria) del virus B. La vacunación contra influenza previene la enfermedad y sus complicaciones incluyendo la hospitalización y la muerte. Por ser un virus que sufre mutaciones periódicamente, la composición de la vacuna se actualiza todos los años de acuerdo a las recomendaciones de la OMS. En nuestro país la vacunación antigripal está dirigida a prevenir las complicaciones en los grupos más vulnerables como los niños menores de 2 años, las embarazadas, las personas con enfermedades o condiciones crónicas, los mayores de 64 años y otros grupos como los trabajadores de la salud. Más allá de estos grupos, cualquier persona puede vacunarse para evitar padecer influenza. La vacuna antigripal es la principal herramienta para prevenir esta enfermedad tan frecuente y fácilmente transmisible.

El Dr. Bonvehí es Médico (Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires). Especialista en Infectología. Master in Public Health (University of Miami). Jefe de la Sección Infectología, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas (CEMIC) Norberto Quirno (CABA). Director y Profesor Titular de la Carrera de Especialización Universitaria en Infectología. Instituto Universitario CEMIC. Director Científico de la Fundación VACUNAR. Médico del Centro de Estudios Micológicos. Dr. Ricardo Negroni

Dr. Daniel Stecher
“dT y Hepatitis B”

La hepatitis B es una infección viral que se transmite con una frecuencia de 30% por vía sexual, vertical y parenteral. Entre el 6 y el 10% de los infectados pueden evolucionar a formas crónicas (hepatitis crónica, cirrosis y/o carcinoma hepatocelular). Su prevención se realiza utilizando una vacuna inactivada de alta efectividad y muy buen perfil de seguridad. La vacuna forma parte del calendario nacional de vacunación (CNV) con una dosis en los recién nacidos y tres dosis incluidos en la vacuna quintuple (2,4 y 6 meses de vida). Para los adultos está recomendada su administración a las personas en riesgo de contraer la enfermedad o presentar manifestaciones más severas (personal de salud, personas que viven con VIH, hombres con sexo con hombres, hemodializados, politransfundidos, hepatopatías crónicas, usuarios de drogas endovenosas y personas privadas de la libertad y personal carcelario). El esquema recomendado es de tres dosis (0,1 y 6 meses). Debido a la dificultad para identificar a las personas en riesgo la estrategia en Argentina es la vacunación universal de toda la población no vacunada. El tétanos es una enfermedad producida por *Clostridium tetani*, que se transmite a través del contacto con esporas en materiales contaminados (tierra, heridas anfractuadas) o durante el parto (tétanos neonatal). Produce un cuadro de convulsiones (opistótonos) y su mortalidad está asociada a las complicaciones derivadas de su manejo clínico (por ejemplo, neumonías intrahospitalarias). En Argentina el último caso de tétanos neonatal se notificó en 2007 pero todos los años se registran episodios en adultos. La difteria se caracteriza por una amigdalitis membranosa que puede producir un cuadro de asfixia pero también puede producir cuadros sistémicos (miocarditis) con una mortalidad del 10%. Es producida por cepas toxigénicas de *Corynebacterium diphtheriae*. La transmisión es por vía aérea. Si bien no se registran actualmente infecciones en Argentina, si se han reportado casos en países de América Latina (Colombia, Haití y Venezuela). La prevención de tétanos y difteria se realiza en los adultos a través de la vacuna doble bacteriana que contiene toxoides inactivados de *C. tetani* y *C. diphtheriae*. El esquema de administración es de una dosis cada 10 años. Tanto hepatitis B como difteria y tétanos son enfermedades inmunoprevenibles con alto impacto en la salud de la población. Las vacunas para su prevención están disponibles en el CNV por lo que son obligatorias y gratuitas para la población, pero deben lograrse buenas coberturas para garantizar su control.

El Dr. Stecher es jefe de la División Infectología del Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires. Área de Recomendaciones Científicas, Dirección de Control de Enfermedades Inmunoprevenibles, Secretaría de Gobierno de Salud, Ministerio de Salud y Desarrollo Social.



*Academia Nacional de
Farmacia y Bioquímica*

JORNADA CIENTÍFICA

Sección Ciencias Aplicadas a la Salud

“El farmacéutico en la Atención Primaria de la Salud”

Jueves 05 de septiembre de 2019

**Sala de Conferencias de la
Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA
Junín 956, CABA**

Coordinación General: Acad. Manuel R. Limeres

Moderador: Acad. Marcelo Wagner

PROGRAMA

14:00 – 14:45 hs	Dr. Rubén Torres (Rector de la Universidad Isalud) - Conferencia Inaugural
14:45 – 16:00 hs	1er Panel - Farmacéuticos en la práctica de la Atención Primaria de la Salud: Experiencia en terreno. o Dra. Graciela Lanfranchi o Dr. Mario Mazzeo Coordinador: Dr. Rubén Sajem
16:00 – 16:15 hs	Intervalo
16:15 a 17:20 hs	2do Panel - Instituciones Farmacéuticas o Dra. Maria Isabel Reinoso (Presidenta - COFA) o Dra. Margarita Menéndez Llano (Presidenta -COFyBCF) o Dra. Claudia Slezack (Vicepresidenta - COLFARMA)
17:20 – 18:00hs	Dr. Alejandro Costa - Secretario de Salud de Almirante Brown - Conferencia de cierre

CONFERENCIAS

Conferencia Inaugural

Dr. Rubén Torres (rector@isalud.edu.ar)

CV. El Dr. Rubén Torres es médico cirujano infantil. Especialista en Planificación y Gestión de Políticas Sociales. Magister en Sistemas de Salud y Seguridad Social, en Organización y Gestión de Instituciones de Seguridad Social y en Sociología. Ha sido Superintendente de Servicios de Salud de la Nación; Consultor Regional en Políticas y Sistemas de Salud de OPS, Representante de la OMS y OPS ante el gobierno de Chile, y Ex Gerente del Área de Sistemas de Salud basados en la APS de la OPS. Subsecretario de Salud de la provincia de Santiago del Estero y Director de hospitales públicos y privados en la provincia de Buenos Aires y en la CABA. Es el Rector de la Universidad ISALUD, en la cual fue Director de la Maestría y Especialización en Sistemas de Salud y Seguridad Social. Autor de tantísimas publicaciones, entre ellas, el libro: “Política Sanitaria en el país de los argentinos”, presentada en el 2015.

1er Panel - Farmacéuticos en la práctica de la Atención Primaria de la Salud: Experiencia en terreno.

- o Dra. Graciela Lanfranchi (graciela.lanfranchi@hotmail.com)
- o Dr. Mario Mazzeo (mazzeomariod@live.com)

Dr. Rubén Sajem (r_sajem@yahoo.com.ar)

CV. El Dr. Rubén Sajem es Farmacéutico, Facultad de Farmacia y Bioquímica – UBA. Licenciado en Psicología, Facultad de Psicología – UBA. Secretario General del Colegio Oficial de Farmacéuticos y Bioquímicos de la Ciudad de Buenos Aires (COFyBCF). Director Académico del Colegio Oficial de Farmacéuticos y Bioquímicos de la Ciudad de Buenos Aires (COFyBCF). Miembro de la Comisión Directiva del Centro de Profesionales Farmacéuticos Argentinos – CEPROFAR. Gestor en Servicios Farmacéuticos basados en APS. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Coordinador de la Comisión de Servicios Farmacéuticos, APS y trabajos profesionales interdisciplinarios del Colegio Oficial de Farmacéuticos y Bioquímicos de la Capital Federal.

-Intervalo-

- 2do - Instituciones Farmacéuticas
- o Dra. Isabel Reinoso (COFA) (isa.colfarma@gmail.com)
- o Dra. Margarita Menéndez Llano (COFyBCF) (maguistar2009@hotmail.com)
- o Dra. Claudia Slezack (CFPBA) (cslezack@gmail.com)

La exposición en la Academia Nacional de Farmacia es una reflexión sobre la importancia de la Red COLFARMA de cuatro mil quinientas farmacias bonaerenses y el impacto que pueden tener en la salud pública bonaerense la aplicación de los servicios farmacéuticos.

Es un trabajo que debe ser promovido por las entidades farmacéuticas que además deben garantizar condiciones para su aplicación.

También se trata de otorgar mayor visibilidad al trabajo del Colegio provincial en consonancia con la CoFA y el proyecto de Ley Nacional que, entre otros temas asociados a nuestra profesión, promueven los servicios farmacéuticos sobre servicio público impropio.

Como Instituciones, tanto provinciales como nacionales, debemos trabajar en reafirmar el rol sanitario de los profesionales farmacéuticos en atención primaria de la salud, a través de los servicios farmacéuticos. Creemos que los farmacéuticos ocupamos un lugar esencial en el equipo de salud y que la prevención es un pilar fundamental para avanzar en mejorar la calidad de vida y disminuir los gastos en salud.

Para nosotros la colaboración con el Estado sirve para optimizar los recursos disponibles en salud y poder invertirlos en investigación o en campañas sanitarias en terreno, concientizar a la población que el primer paso en mejorar la salud son condiciones de higiene básicas que redundan en beneficio de todos.

CV Claudia Slezack es farmacéutica egresada de la Universidad Kennedy. Ha sido presidente en su filial de Berisso y es actualmente Vicepresidente del Colegio de farmacéuticos de la provincia de Buenos Aires. Ha coordinado campañas públicas junto al Estado provincial y la Cámara de Dipuados de la provincia, además es la responsable de la COMISIÓN DE OBRAS SOCIALES Y POLÍTICAS DE COMERCIALIZACIÓN DE MEDICAMENTOS

Conferencia de cierre

Dr. Alejandro Costa (alesalvacosta@hotmail.com)



*Academia Nacional de
Farmacia y Bioquímica*

JORNADA CIENTIFICA

Sección Ciencias Farmacéuticas y Farmacológicas

“CRISPR, la nueva biotecnología del Siglo -Investigación y desarrollo en Argentina-

Jueves 19 de septiembre de 2019 14 a 17 h.

**-Sala de Conferencias
de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA-
Junín 956, CABA**

Coordinador General y Moderador: Dr. Alberto Diaz

PROGRAMA

14:00 – 14:45 h	•.: Dr. Manuel de la Mata (IFIBYNE – UBA - CONICET) “Edición de genomas por CRISPR en investigación básica y aplicada.”
• 14:45 – 15:30 h	.: Dr. Sergio Feingold (INTA – Coordinador Programa Nacional Biotecnología) "El potencial de la Edición Génica para la Agroindustria"
• 15:30 – 15:45 h.:	Intervalo (Café)
• 15:45 – 16:30 h.:	Dr. Federico Pereyra Bonnet (INPA-FAUBA - CONICET) “CRISPR como una herramienta para la detección de enfermedades humanas”
16:30 – 17:00 h.:	• Mesa final de preguntas, comentarios y discusión.

CONFERENCIAS

Dr. Manuel de la Mata (IFIBYNE – UBA - CONICET)

“Edición de genomas por CRISPR en investigación básica y aplicada.”

La tecnología CRISPR ha revolucionado nuestra capacidad para manipular genomas de diversos organismos. Su relativa simplicidad y bajo costo ha permitido una gran masividad en su aplicación, "democratizando" la edición de genomas y haciéndola accesible esencialmente a cualquier laboratorio pequeño de biología molecular. En esta charla se dará una reseña general sobre las bases moleculares de la tecnología CRISPR, las aplicaciones que ha permitido en la práctica y de lo que potencialmente permitirá en un futuro próximo, funcionando como catalizador de investigaciones básicas en genética y medicina molecular y biotecnología.

CV. Estudié Licenciatura en química en la Universidad Nacional de Córdoba (1995-1999). Realicé mi tesis de licenciatura bajo la dirección del Dr. Pablo Iribarren en el instituto CIBICI-CONICET. Llevé a cabo mi doctorado en el instituto IFIBYNE-UBA-CONICET, Facultad de ciencias exactas y naturales de la UBA bajo la dirección del Dr. Alberto Kornblihtt (2001-2006). Luego de un postdoctorado corto en el mismo instituto (2007-2008), realicé mi postdoctorado en el instituto FMI de Basilea, Suiza en los laboratorios de los Dres. Witold Filipowicz y Helge Grosshans (2009-2015). Desde 2016 inicié un grupo de investigación en el instituto IFIBYNE-UBA-CONICET

Dr. Sergio Feingold (INTA – Coordinador Programa nacional Biotecnología)

"El potencial de la Edición Génica para la Agroindustria"

Laboratorio de Agrobiotecnología de la EEA Balcarce. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). ARGENTINA

La selección de genotipos superiores -plantas o animales- siempre ha dependido de la existencia de diversidad genética. Desde la domesticación de especies, la variabilidad genética natural causada por mutaciones, poliploidización y cruzamientos a lo largo de la evolución, se ha ido reduciendo como consecuencia inevitable de la selección de individuos con características favorables. Distintas tecnologías han posibilitado la re-introducción de variabilidad a partir de cruzamientos (intra- o inter-específicos) realizados por el hombre, la inducción de mutaciones, y más recientemente la ingeniería genética. Estas técnicas son herramientas básicas en el mejoramiento.

Hace unos 20 años la ingeniería genética abrió la posibilidad de superar la incompatibilidad sexual de cualquier organismo vivo, para incorporar genes provenientes de cualquier origen, incluso de diferentes reinos, generando organismos genéticamente modificados (OGM) también denominados transgénicos.

Desafortunadamente, esta técnica no ha rendido todo su potencial. Probablemente, los principales factores que pueden explicar este hecho son i) una percepción pública negativa –e inesperada–, ii) la existencia de genotipos o especies recalcitrantes para ser transformados o regenerados y iii) el estricto y costoso proceso de desregulación para poder comercializar genotipos mejorados. Este tercer factor ha contribuido a que los denominados “desarrollos biotecnológicos” hayan estado concentrados en unas pocas empresas de presencia mundial con poca participación relativa de entidades de investigación pública (Universidades, INIAs). La Edición Génica constituye un avance significativo en las tecnologías de modificación genética con su consecuente impacto en la introducción de la variabilidad. Posee el potencial de realizar modificaciones en la secuencia de ADN dirigidas a genes específicos para alterar su expresión (apagarlos o sobre-exresarlos), reemplazar alelos e introducir transgenes en sitios específicos en el genoma. Se estima que esta técnica puede reducir drásticamente los tiempos del mejoramiento y producir una modificación radical en los programas de mejoramiento tanto en animales como en plantas.

En un país de neto corte agroexportador, la importancia estratégica de la semilla determina que la inversión en esta tecnología es clave en la sostenibilidad e incremento de la producción frente a factores bióticos y abióticos adversos como los que seguramente estaremos enfrentando a partir de los cambios climáticos que genera el calentamiento global. El conocimiento de los genes involucrados en estos procesos es fundamental en la aplicación de la edición genética. Asimismo, la EG posee un importante impacto potencial en el agregado de valor, aumentando la calidad nutricional e industrial de nuestros productos.

En los cultivos de reproducción agámica (como la papa, la batata, la vid, los árboles frutales y forestales) es posible aventurar un cambio en la estructura de los programas de mejora, a partir de la posibilidad de generar mejoras incrementales en genotipos y cultivares de elite

La edición genética presenta desafíos técnicos, especialmente si se requiere la expresión transitoria de la maquinaria de la edición. La ausencia de secuencias genéticas foráneas puede determinar que los organismos mejorados no presenten requisitos reglamentarios especiales como los transgénicos para su comercialización. La ausencia de marcadores de selección plantea tanto una ventaja desde la percepción pública de los alimentos mejorados por esta técnica como un cuello de botella que implicará un esfuerzo significativo en la identificación de la descendencia "editada".

Los avances en la secuenciación de genomas de importancia agropecuaria, la identificación acabada de los genes -sus funciones y regulaciones- se presenta como un requisito previo para la identificación las secuencias objetivo y de qué manera la edición cambiará su expresión. Además, las secuencias de genomas completos de buena calidad permiten minimizar la posibilidad de que la maquinaria de edición genética realice cambios en regiones no deseadas ("off target"). Asimismo, se revaloriza el conocimiento de las variantes alélicas de origen natural y su impacto en el fenotipo, ya que a partir de esta información se puede dirigir el reemplazo alélico en variedades y razas ya mejoradas, con el objetivo de eliminar de las poblaciones de mejoramiento genes deletéreos y enriquecerlas en alelos favorables.

CV. Graduado como Ingeniero Agrónomo en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires en 1987, realiza estudios de Maestría (FAUBA) y Doctorado (FCEyN-UBA) en proteínas de reserva relacionadas con la calidad en trigo. Pionero en el país en el uso de marcadores moleculares y mapas genéticos aplicados al mejoramiento vegetal, tanto en el ámbito público como privado.

Desde 1999 responsable del Laboratorio de Agrobiotecnología del Área de Investigación en Agronomía del INTA de Balcarce, especializándose en Genómica Funcional en *Solanum sp.* Participó como investigador Responsable por Argentina en el Consorcio de Secuenciación del Genoma de la Papa, publicado en la revista Nature en 2011.

Los proyectos actuales del equipo de investigación que lidera se orientan al estudio de genes responsables de la calidad industrial y nutricional de la papa y en la adaptación y uso de nuevas tecnologías de edición genética en plantas.

Desde 2014 desempeña funciones como Coordinador del Programa Nacional de Biotecnología del INTA

Dr. Federico Pereyra Bonnet (INPA-FAUBA - CONICET)

“CRISPR como una herramienta para la detección de enfermedades humanas”

La herramienta CRISPR-Cas es conocida por su capacidad de editar el genoma de organismos vivos en forma rápida, eficaz y a bajo costo. Sin embargo las aplicaciones de la tecnología CRISPR van en aumento año tras año. El objetivo de esta charla será compartir con la audiencia como desde nuestro laboratorio utilizamos la tecnología CRISPR como un método de diagnóstico para enfermedades humanas. Solo con tres componente podemos detectar un gran número de enfermedades que van desde el Dengue, Zika y varias de las resistencias a antibióticos que contienen las comúnmente llamadas superbacterias. CRISPR es una herramienta muy versátil seguirá sorprendiendo por sus enormes potenciales.

CV. Dr Pereyra Bonnet Federico, Licenciado en Ciencias Biológicas y Doctor de la Universidad de Buenos Aires. Actualmente se desempeña como Investigador del CONICET en el INPA-FAUBA, investigado sobre edición génica y el uso de la tecnología CRISPR en biomedicina.



*Academia Nacional
de Farmacia y Bioquímica*

Buenos Aires, septiembre de 2019

*La **ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA** tiene el agrado de invitar a Usted a la “**Jornada Científica sobre Cambio Climático**”, organizada por la Sección Ciencias Biológicas, Bioquímicas, Biofísicas y Naturales, que se realizará el 3 de octubre próximo, de 14:00 a 17:00 horas en su sede Facultad de Farmacia y Bioquímica, Salón de Conferencias “Pbro. Antonio Sáenz”, Junín 956, Buenos Aires.*

.Esperamos contar con su presencia y saludamos a Usted con nuestra más distinguida consideración.

Acad. Manuel Limeres
Secretario

Acad. Gabriel Mato
Presidente



*Academia Nacional
de Farmacia y Bioquímica*

JORNADA CIENTÍFICA

Sección Ciencias Biológicas, Bioquímicas,
Biofísicas y Naturales

“CAMBIO CLIMÁTICO”

Jueves 3 de octubre de 2019 14 a 17 h.

Sala de Conferencias de la
Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Junín 956, CABA

Coordinación General y Moderador: Dr. Alfredo Salibián

PROGRAMA

14:00 – 14:10	Apertura: Presidente ANFyB - Acad. Gabriel Mato
14:10 – 14:30	Introducción y Presentación de los Expositores: Acad. Alfredo Salibián
14:30 – 15:00	Dra. Inés Camilloni: “Argentina y el Cambio Climático”
15:00 – 16:00	Dr. Ernesto de Titto – Lic. María Sanski: “Calentamiento Global: Las olas de calor, un fenómeno que llegó para quedarse”
16:00 – 16:15	Intervalo (Café)
16:15 – 17:00	Mesa final de preguntas y Conclusiones. Preguntas, comentarios, propuestas, discusión, etc

PARTICIPANTES

Dra. Inés Camilloni: “Argentina y el Cambio Climático”

CV. La **Dra. Inés Camilloni** es Doctora en Ciencias de la Atmósfera, UBA, Profesora Asociada Depto Ciencias de la Atmósfera y los Océanos, Investigadora Independiente CONICET, Directora Maestría en Ciencias Ambientales (FCEN-UBA), Contribuyente en Informes (4º y 5º) de Evaluación y Contribuyente del IPCC. Participó en la elaboración de Comunicaciones Nacionales sobre Cambio Climático.

Dr. Ernesto de Titto: “Calentamiento Global: Las olas de calor, un fenómeno que llegó para quedarse”

CV. Ernesto de Titto es profesor y doctor en Ciencias Químicas (UBA) y coordinador académico de la Maestría en Gestión de la Salud Ambiental en la Universidad ISALUD. Fue director en el Ministerio de Salud de la Nación entre 1995 y 2018 y miembro de la Carrera del Investigador Científico del Conicet; antes fue responsable del Programa Nacional de Investigaciones en Enfermedades Endémicas de la SECYT y becario de la CIC, el Conicet, la OMS y la Palo Alto Medical Foundation-Stanford University (Estados Unidos).

Lic. María Sanski: “Calentamiento Global: Las olas de calor, un fenómeno que llegó para quedarse”

CV. María de los Milagros Skansi es licenciada en Ciencias de la Atmósfera (UBA). Desde 2009 es responsable del Departamento de Climatología del Servicio Meteorológico Nacional y participa en grupos de expertos de la Comisión de Climatología de la OMM. Actualmente es presidenta del Grupo de Trabajo de Clima de la Región III de OMM y coordinadora del Centro Regional del Clima para el Sur del América del Sur.



VIII JORNADA INTERACADEMICA INTERNACIONAL

Ciudad de Buenos Aires, República Argentina

15 de noviembre 2019, de 8.30 a 20 h.

**“La vacunación en la prevención y el control
de las enfermedades infecciosas
transmisibles de los animales y el hombre”**

Participantes:

**Por la República Oriental del Uruguay
Academia Nacional de Veterinaria y Academia Nacional de Medicina**

**Por la República Argentina
Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, Academia Nacional de
Medicina y Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica**

Fecha: Viernes 15 Noviembre 2019 de 8.30 a 20 h

**Lugar: Salón de Conferencias de la Academia Nacional de Agronomía y
Veterinaria Avda. Alvear 1711 Piso 2°, Ciudad Autónoma de Buenos Aires
República Argentina**

Sesión I.

Principios fundamentales de la Vaccinología en humanos y animales. Aspectos históricos y de Política Sanitaria en Argentina y Uruguay.

I.1 "Vaccinología en Veterinaria: aspectos históricos y de impacto". Dr. Fernando Fernández, Sec. CyT, UNSADA-USAL, Argentina.

I.2 "Vaccinología en Medicina: aspectos históricos y de impacto". Ac. Dr. Carlos Salveraglio, ANM, Uruguay.

Sesión II.

Respuesta Inmune a la vacunación. Respuesta inmune humoral, celular y pasiva, modulación, planes sanitarios.

II.1 "Tipos de respuesta inmune y efecto de la vacunación en Medicina Veterinaria". Dra. Viviana Parreño, Inst. Virología, CICVyA, INTA, Argentina.

II.2 "Investigación y desarrollo de vacunas antimicrobianas en Argentina: brucelosis como modelo". Dr. Carlos Alberto Fossati, IIFP, UNLP-CONICET, Argentina.

Sesión III.

Vacunas. La evolución del conocimiento científico y tecnológico y el desarrollo y aplicación de vacunas en humanos y animales. (Vacunas inactivadas, modificadas, de ingeniería genética, nuevos avances y aplicaciones, normas de control).

III.1 "Estado de las vacunas, dudas y rechazos". Prof. Dr. Eduardo López. Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, Argentina.

III.2 Nuevos desarrollos de vacunas: vacunas recombinantes". Dra. Gabriela Calamante, Inst. Biotecnología, CICVyA, INTA, Argentina.

III.3 "Vacunas creativas". Dr. Gonzalo Moratorio, Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay.

III.4 "Producción de vacunas: Potencial transmisión de encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE)". Drs. Pedro Piccardo y David Asher. ANM, Uruguay y FDA, EE.UU.

III.5 "Normas de Bioseguridad y Calidad en los laboratorios de Producción y control de productos biológicos veterinarios". Dr. Eduardo Maradei, Dirección de Laboratorios, SENASA, Argentina.

Sesión IV.

Programas de vacunación. Programas exitosos y limitantes en la prevención y el control de enfermedades animales y humanas mediante la vacunación.

IV.1 "Vacunas para adultos". Dr. Daniel Stamboulian, FUNCEI, Argentina.

IV.2 "Vacunaciones en Uruguay. Aspectos relevantes actuales". Ac. Augusto J. Müller Gras, ANM, Uruguay.

IV.3 "El empleo de vacunas en la producción industrial de aves". Dr. Ricardo Soncini, Consultor en Salud Animal con orientación en Aves y Cerdos, Argentina. DMV, "SAS Assessoria Agropecuaria".

IV.4 "Vacunas de adyuvante oleoso y vacunación contra la fiebre aftosa en América del Sur". Ac. Dr. Raúl Casas Olascoaga, ANV, Uruguay.

IV.5 Desafíos en Inmunizaciones: logros, dificultades, futuro. Dra. Susana Devoto, Inst. Inv. Epidemiológicas, ANM, Argentina.

IV.6. "Beneficios económicos por el uso de vacunas en poblaciones bovinas". Dr. Ernesto Späth, Fac. Cs. Agrarias UNMDP y de INTA, Argentina.

Sesión V.

Conclusiones.

Efecto antiinflamatorio de rizomas de una planta argentina de uso medicinal (*Smilax campestris*) en macrófagos humanos.

Luciana S. Salaverry¹; Tomás Lombardo^{1,2}; Cecilia Beatriz Dobrecky^{3,4}; Sabrina Andrea Flor^{3,5,6}; Cecilia Parrado^{1,2}; Franco Mangone^{1,2}; Ana Z. Rugna⁷; Teresa Gentile¹; Guillermo Blanco²; Andrea Canellada^{1,2}; Estela Rey-Roldán^{1,2}.

1. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Microbiología, Inmunología, Biotecnología y Genética, Buenos Aires, Argentina.
2. Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral Dr. R.A. Margni (IDEHU), Conicet, Argentina
3. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Tecnología Farmacéutica, Buenos Aires, Argentina.
4. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Farmacología, Buenos Aires, Argentina.
5. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Química Analítica y Físicoquímica, Buenos Aires, Argentina.
6. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, CONICET, Argentina.
7. Hospital General de Agudos Dr. Juan A. Fernández, Buenos Aires, Argentina.

Resumen	43
Abstract	43
1. Introducción	44
2. Materiales y Métodos.....	46
Reactivos y anticuerpos.....	46
Material vegetal y preparación del extracto	47
Caracterización fitoquímica por HPLC-MS/MS.....	47
Cultivo celular y diferenciación a macrófagos.....	47
Determinación de citoquinas y citotoxicidad	47
Determinación de Metaloproteasas.....	48
Análisis de Western Blot.....	48
Determinación de anión superóxido y glutatión	49
Análisis estadístico.....	49
3. Resultados	49
Caracterización fitoquímica por HPLC-MS/MS.....	49
Evaluación del efecto citotóxico del extracto acuoso de <i>S. campestris</i>	52
El extracto acuoso de <i>S. campestris</i> disminuye la producción de IL-1 β , IL-6, IL-8 y MCP-1 en macrófagos THP-1 activados con LPS.....	52
El extracto acuoso de <i>S. campestris</i> disminuye la actividad gelatinasa (MMP-9) en macrófagos THP-1 activados con LPS	54
El extracto acuoso de <i>S. campestris</i> inhibe la translocación nuclear de NF κ B en macrófagos THP-1 activados por LPS.....	54
El extracto acuoso de <i>S. campestris</i> disminuye los niveles de anión superóxido en macrófagos THP-1.....	55
El extracto acuoso de <i>S. campestris</i> no modifica el nivel de glutatión en macrófagos THP-1	56
4. Discusión.....	57
5. Referencias	61

RESUMEN

Los extractos de *Smilax campestris* se han empleado en el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias, sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares implicados en sus efectos beneficiosos aún se desconocen. Los macrófagos son células del sistema inmune que tienen un rol central en las respuestas inflamatorias. Estas células se activan en respuesta a una diversidad de señales de peligro y producen mediadores inflamatorios capaces de modular la respuesta inmune. En primer lugar, realizamos una caracterización del perfil fitoquímico del extracto acuoso de rizomas de *S. campestris*. Se identificaron, por HPLC-MS/MS, los siguientes compuestos: catequina, derivados 3-O-glicosilados de quercetina (Q-3-O-Glu, Rutina, Q-3-O-Rha y trazas de Q-3-O-Gal). A su vez, se identificó también la presencia de glicósidos de sarsasapogenina. En este trabajo, demostramos que el extracto acuoso de *S. campestris* disminuye significativamente la producción de las citoquinas proinflamatorias y quemoquinas como la interleuquina 1 beta (IL-1 β), interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 8 (IL-8) y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), así como también la actividad de la metaloproteinasa MMP-9, en macrófagos THP-1 activados por lipopolisacáridos. A su vez, el extracto acuoso de rizomas de *S. campestris* inhibió la translocación al núcleo del factor de transcripción NF κ B. Por último, el extracto de *S. campestris* disminuyó la producción de anión superóxido en los macrófagos THP-1, sin alterar los niveles de glutatión reducido. Estos resultados sugieren que el extracto acuoso de *S. campestris* ejerce sus efectos antiinflamatorios por medio de la inhibición de la translocación al núcleo del factor de NF κ B con una consecuente disminución en la producción de citoquinas proinflamatorias, enzimas metaloproteinasas y una concomitante reducción en los niveles del mediador de estrés oxidativo anión superóxido. Nuestros hallazgos contribuyen a la comprensión de algunos de los mecanismos antiinflamatorios responsables de los efectos beneficiosos observados para *S. campestris*. Estos resultados son relevantes para ampliar nuestro conocimiento sobre nuevas alternativas terapéuticas empleando productos naturales pudiendo inferir su potencial utilidad para mitigar el daño tisular en diversas enfermedades inflamatorias.

ABSTRACT

The extracts of *Smilax campestris* have been used in the treatment of several inflammatory diseases, however, the cellular and molecular mechanisms involved in their beneficial effects are still unknown. Macrophages are cells of the immune system that have a central role in inflammatory responses. These cells are activated by several warning signals and produce inflammatory mediators capable of modulating the immune response. First, we characterized the phytochemical profile of the aqueous extract of rhizomes of *S. campestris*. The following compounds were identified by HPLC-MS/MS: catechin, 3-O-glycosylated derivatives of quercetin (Q-3-O-Glu, Rutin, Q-3-O-Rha and Q-3-O-Gal). Furthermore, the presence of sarsasapogenin glycosides was also identified. In this work, we demonstrate that the aqueous extract of *S. campestris* significantly decreases the production of proinflammatory cytokines and chemokines such as interleukin 1 beta (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8) and monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), as well as the activity of metalloproteinase MMP-9, in THP-1 macrophages activated by lipopolysaccharides. Moreover, the aqueous extract of rhizomes of *S. campestris* inhibited the translocation to the nucleus of the transcription factor NF κ B. Finally, the extract of *S. campestris* decreased the production of superoxide anion in the THP-1 macrophages, without altering the levels of reduced production of superoxide

production of superoxide anion in the THP-1 macrophages, without altering the levels of reduced glutathione. These results suggest that the aqueous extract of *S. campestris* exerts its anti-inflammatory effects by inhibiting the translocation to the nucleus of NFκB factor with a consequent decrease in the production of proinflammatory cytokines, metalloproteinase enzymes and a concomitant reduction in the levels of the mediator of oxidative stress superoxide anion. Our findings contribute to the understanding of some of the anti-inflammatory mechanisms responsible for the beneficial effects observed for *S. campestris*. These results are relevant to expand our knowledge about new therapeutic alternatives using natural products, which can infer their potential utility to mitigate tissue damage in several inflammatory diseases.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Smilax* incluye más de 200 especies vegetales distribuidas a lo largo de todo el mundo, principalmente en regiones con climas tropicales y templados. Muchas de las especies de este género han sido empleadas con fines medicinales por diversas culturas (Ki et al., 2016; Jiang, J, Xu, 2003). En particular, *Smilax campestris* Griseb (Smilacaceae) o sarsaparilla blanca, es una planta dioica que se encuentra en el norte y este de Sudamérica siendo en Argentina la especie más abundante del género *Smilax*, con una amplia distribución en la zona nórdica (Guaglianone, R, Gattuso, 1991). Sus raíces y rizomas se utilizan en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel, en el reumatismo, como diurético y diaforético. Sus hojas han sido utilizadas como tónico y bebida digestiva. Estudios previos empleando extractos provenientes de rizomas y hojas de *S. campestris* demostraron actividades antioxidantes por métodos químicos (Rugna et al., 2003), y antifúngicas (Rugna et al., 2013) sin evidenciarse efectos tóxicos *in vivo* (Gorzalczany et al., 1999). A su vez, otros autores demostraron actividades antioxidantes y antifúngicas de extractos alcohólicos de partes aéreas de *Smilax campestris* (Morais et al., 2014).

Extractos de varias especies del género *Smilax* se utilizan en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, sin embargo, en la especie *S. campestris* aún no han sido dilucidados los posibles mecanismos implicados. Existen fuertes evidencias de que los fitoquímicos naturales modulan diferentes mediadores de inflamación, entre ellos factores de transcripción, como NFκB, que inducen la expresión de genes que codifican para citoquinas proinflamatorias (IL-1, TNF-α), enzimas proteasas, especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, entre otros, que están implicados en la inflamación crónica asociada a enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis. (Hussain, 2016). Los extractos del género *Smilax* se caracterizan por ser ricos en polifenoles, como flavonoles y proantocianidinas, de propiedades antiinflamatorias, antibióticas y protectoras contra el estrés oxidativo (Lincha, 2016; Lu, 2015; Ruangnoo, 2012). Previamente, en extractos metanólicos de rizomas de *S. campestris* fueron identificados flavonoles como la quercetina, quercetina 3-O-glucósido y quercetina 3-O-rutinosido, además de procianidina y propelargonidina (Rugna et. al, 2005; Rugna et. al, 2002; Rugna et. al., 1999). Los efectos protectores de los polifenoles se asocian principalmente con su capacidad de interactuar en forma directa con diversas especies reactivas de oxígeno (ROS), pero a su vez, este grupo de compuestos químicos también es capaz de inducir respuestas celulares modulando el metabolismo y la supervivencia celular (Simirgiotis et al., 2015). Dentro de los polifenoles, los flavonoides son fitoquímicos con una gran capacidad para modular respuestas de estrés oxidativo e

inflamación. Se ha demostrado que extractos vegetales que en su composición cuentan con flavonoides como la quercetina y sus derivados glicosilados (rutina, quercetina 3-O-rhamnósido, quercetina 3-O-glucósido, entre otros) así como también otros flavonoides como la catequina y epicatequina son capaces de modular diversos mediadores proinflamatorios y de estrés oxidativo como la producción de óxido nítrico (NO), citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-1 β , IL-8), COX-2, entre otros, por medio de la regulación negativa de diversas vías de señalización y factores de transcripción como NF κ B, JNK, STAT, ERK y MAPKs en macrófagos RAW activados por LPS (Cho et al., 2016; Ho et al., 2017; Lin et al., 2017).

Por otro lado, es sabido que las saponinas esteroidales son compuestos bioactivos relevantes del género *Smilax*. Se ha demostrado que estos fitoquímicos son capaces de ejercer efectos antifúngicos y antiinflamatorios por medio de la modulación de segundos mensajeros, como AMPc, en modelos de macrófagos activados por LPS (Tian et al., 2017). A su vez, existen evidencias de que los compuestos derivados de la sarsasapogenina, una saponina presente en el género *Smilax*, son capaces de ejercer efectos antiinflamatorios mediante la modulación de diversos mediadores proinflamatorios como la citoquina TNF- α , la quemoquina MCP-1, iNOS, NO, COX-2, PGE2 en macrófagos murinos activados por LPS por una vía dependiente del factor de transcripción NF κ B (Dong et al., 2017).

Como es sabido, la inflamación es una respuesta fisiológica de la inmunidad innata fundamental para la defensa del organismo frente a microorganismos y noxas. Sin embargo, cuando esta respuesta es exacerbada o crónica puede conllevar al desarrollo de diferentes patologías. Un mayor grado de conocimiento sobre los mecanismos antiinflamatorios responsables de los efectos beneficiosos de la planta medicinal *S. campestris* resulta de suma importancia para poder considerarla una alternativa terapéutica segura y eficaz para mitigar el daño tisular en enfermedades inflamatorias. Dentro de las células de la inmunidad innata, los macrófagos son células claves de la respuesta inmune inflamatoria. Frente a señales de peligro (externo o interno) se activan, modifican su fenotipo y producen mediadores proinflamatorios como citoquinas, quemoquinas, enzimas metaloproteinasas (MMP) y generan radicales libres del oxígeno y el nitrógeno como mecanismo de defensa frente a patógenos (Choi, 2013). Por otro lado, la vía del factor de transcripción NF κ B tiene un rol clave como modulador de la respuesta inflamatoria regulando la expresión de diversos genes que codifican mediadores proinflamatorios (Chanput et al., 2014).

La línea celular humana THP-1 ha sido ampliamente utilizada como modelo monocito/macrofágico en estudios de inmunomodulación. Por acción de ésteres de forbol (forbol miristato acetato, PMA), estas células monocíticas se diferencian a macrófagos de fenotipo semejante a los obtenidos a partir de sangre periférica, estimulando a tiempos cortos la producción de radicales libres del oxígeno (ROS). A su vez, la activación con lipopolisacárido bacteriano (LPS) estimula la producción de IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1 y metaloproteinasas (MMP-9) y moléculas de adhesión (ICAM-1) (Chanput et al., 2014; Walquist et al., 2017). La citoquina proinflamatoria IL-1 β , una de las más importantes producida por los macrófagos activados, puede modular la producción de IL-6 (inductora de proteínas de fase aguda), TNF- α , así como también la expresión de enzimas como las MMPs. Estas proteasas se encuentran aumentadas en diversos procesos fisiopatológicos como la inflamación crónica. Las metaloproteasas tienen un rol clave en procesos como la migración de leucocitos a través del tejido conectivo, el remodelado del tejido y la angiogénesis (Mittal et al., 2016). Por otro lado, las quemoquinas, como IL-8 y MCP-1, son moléculas quimiotácticas capaces de reclutar diferentes tipos celulares al foco inflamatorio. Se ha propuesto que la quemoquina IL-8, con propiedades angiogénicas y estimulantes de la quimiotaxis de neutrófilos, y la quemoquina MCP-1, inductora de la quimiotaxis de monoci-

tos, pueden estar implicadas en la disfunción endotelial y aterosclerosis (Christodoulou et al., 2018; Lincha, 2016) A su vez, la producción de ROS en macrófagos activados, entre ellos, el anión superóxido, puede activar factores de transcripción, como NFκB, e inducir la síntesis de citoquinas, y otros mediadores de inflamación, promoviendo el establecimiento del estado inflamatorio (Kim et al., 2016). Sin embargo, aunque se propone que la inflamación y el estrés oxidativo son procesos íntimamente relacionados, aún hay aspectos que no han sido descritos. El uso de extractos vegetales resulta una alternativa interesante para combatir el daño inducido por estrés oxidativo debido a la presencia de ciertos fitoquímicos, como los flavonoides, con una gran capacidad para secuestrar radicales oxidativos ejerciendo así sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios (Murakami et al., 2015). A su vez, el balance redox de la célula puede ser finamente regulado por una amplia variedad de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. En este último grupo se incluyen moléculas pequeñas, como el glutatión, capaces de oxidarse o reducirse según el estado redox celular y mitigar así el daño inducido en contextos de estrés oxidativo elevado y/o inflamación exacerbada o crónica (Ghezzi, 2011).

En este trabajo nos propusimos investigar el rol inmunomodulatorio del extracto acuoso de rizomas de *Smilax campestris*, analizando su efecto sobre la actividad de macrófagos humanos. En primer lugar, realizamos un análisis fitoquímico del extracto acuoso de *S. campestris*, por HPLC-MS/MS, con el objetivo de identificar principios activos responsables del potencial efecto beneficioso del extracto. Luego, en células THP-1 activadas o no con LPS evaluamos el efecto del extracto acuoso de *S. campestris* sobre la secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-1β e IL-6, las quemoquinas IL-8 y MCP-1, la actividad de enzimas metaloproteasas MMP-9, la expresión de la vía del factor de transcripción NFκB/IκB, los niveles de anión superóxido y glutatión, así como también la citotoxicidad inducida por el extracto en las condiciones experimentales ensayadas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y anticuerpos

Los reactivos empleados fueron: medio de cultivo RPMI 1640 (RPMI), suero fetal bovino (SFB), penicilina-estreptomocina y piruvato-glutamina (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA), éster de forbol-12-miristato-13-acetate (PMA), lipopolisacárido de *Escherichia Coli* (LPS), y carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) (Sigma Co, St Louis, MO; USA), dihidroetidina (HE) and diacetato de 5-clorometilfluoreceina (5-CMF) (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina). Para la caracterización fitoquímica por HPLC masa se emplearon: Metanol LiChrosolv® (Merck, Darmstadt, Germany), ácido fórmico (Baker, New Jersey, USA), agua ultrapura generada con Barnstead Thermo Scientific™. Como compuestos testigo se emplearon: Quercetina-3-ramnósido (Q-3-O-Rha) (Extrasynthese, Lyon, France) y rutina (R), procianidina B2 (PB2), catequina (C), epicatequina (EC), quercetina (Q), quercetina-3-O-glucósido (Q-3-O-Glu), quercetina-3-O-arabinofuranósido (Q-3-O-AF), quercetina-3-O-galactósido (Q-3-O-Gal), quercetina-3-O-arabinopiranosido (Q-3-O-AP) and sarsasapogenina (S) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Para los ensayos de western blot, los anticuerpos primarios empleados fueron: anticuerpo policlonal IgG de cabra anti-NFκB p65 (C-20), anticuerpo policlonal IgG de conejo anti-IκBα (FL) y anticuerpo monoclonal IgG2a de ratón anti-histona H1 (AE-4) (Santa Cruz Biotechnology, USA) y anticuerpo de ratón anti-α-tubulina (DM1A) (e- Bioscience, USA). Los anticuerpos secundarios empleados fueron: anticuerpo bovino conjugado a HRP anti- IgG de cabra, anticuerpo hecho en oveja conjugado a HRP anti- IgG de ratón y anticuerpo hecho en cabra conjugado a HRP anti- IgG de conejo (H+L) (Jakson Immuno Research, USA, Biodynamics, Argentina).

Material vegetal y preparación del extracto

Se utilizaron los rizomas de ejemplares de poblaciones femeninas de *S. campestris* provenientes de Puerto Gaboto (32° 26' 0'' S, 60° 49' 0'' O), Departamento San Jerónimo en la Provincia de Santa Fe (Argentina). Las muestras fueron colectadas durante el mes de abril, que corresponde a la etapa estacionaria de la planta en la cual los rizomas tienen mayor concentración de polifenoles (Rugna et al., 2013). El material vegetal fue colectado e identificado por la Prof. Dra. Susana Gattuso y está depositado en la Cátedra de Farmacobotánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (Universidad de Buenos Aires, Argentina). Se utilizaron 60 g de rizomas secados al aire y molidos de *S. campestris*. Se realizó una extracción por cocimiento según Farmacopea Argentina a ebullición lenta durante 20 minutos (FNA, 1978). Luego de enfriar el extracto se lo filtró primero a presión y después con membranas de 0,22 µm. Se llegó a un volumen final de extracto de 350 mL. El extracto siempre fue conservado a 5 °C. El contenido de fenoles totales se determinó por el método de Folin-Ciocalteu utilizando una curva standard de ácido tánico. El contenido de fenoles totales fue de 2,792±0,123 mg ácido tánico / g material seco, o 479±24 µg de ácido tánico / mL de extracto.

Caracterización fitoquímica por HPLC-MS/MS

El equipamiento empleado consistió en un HPLC UltiMate 3000 acoplado a un espectrómetro de masa triple cuádruplo con electrospray como fuente de ionización. (TSQ Quantum Access MAX). Para la separación cromatográfica se empleó una columna Hypersil C18 (150 x 4 mm, 5µm de tamaño de partícula Thermo Scientific™). La fase móvil consistió en 0,1% v/v ácido fórmico en metanol y 0,1% v/v ácido fórmico con un gradiente de 15:85 (0 min), 40:60 (25 min), 40:60 (50 min), 85:15 (60 min). El flujo utilizado fue 1 mL/min y la temperatura del horno y del inyector fueron fijadas a 40°C y 20°C, respectivamente. El volumen de inyección fue 25 µL. Las condiciones de optimización para la detección fueron las siguientes: Voltaje de spray 3,0 kV, temperatura de vaporización 280 °C, temperatura capilar 280°C, mientras que la presión del gas envolvente y la presión de gas auxiliar se establecieron en 25 y 35 unidades, respectivamente. El método utilizado comprendió dos eventos, monitorización selectiva de iones (SRM) y fragmentación selectiva de compuestos que se encuentran en alta abundancia (data dependant scan) (Tabla 1). Preparación soluciones estándar stock: Se prepararon soluciones estándar para cada compuesto en una concentración de 1 mg/mL en metanol. Solución estándar de trabajo: Alícuotas equivalentes de cada solución estándar stock, se colocaron en matraz aforado, y se diluyeron con fase móvil hasta una concentración final de 1 µg/mL. Soluciones de muestra: 10 mg/mL de fracciones acuosas de extracto de *Smilax campestris* se diluyeron 1: 1 en fase móvil.

Cultivo celular y diferenciación a macrófagos

La línea celular monocítica humana THP-1 (ATCC® TIB-202™, Rockville, MD, EE. UU.) se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, 100 µg/mL de penicilina-estreptomocina, piruvato 2 mM y glutamina 2 mM (Gibco- BRL / Invitrogen Argentina) en un humidificado con 5% de CO₂ a 37°C. Las células monocíticas se sembraron en una placa de 24 pocillos y se diferenciaron a macrófagos mediante estimulación con PMA (40 ng/mL) durante 72 h (definidas como macrófagos THP-1) (Yang et al., 2012).

Determinación de citoquinas y citotoxicidad

Los macrófagos THP-1 (5x10⁵ células/well) fueron incubados con distintas concentraciones de extracto acuoso de *S. campestris* (10, 100, 1000 and 10000 ng de ácido tánico/mL extracto) y luego.

Al final de las incubaciones se colectaron los sobrenadantes y guardaron a -86° C para las posteriores determinaciones. Los niveles de citoquinas se determinaron por ELISA de captura empleando kits comerciales (BD OptEIA, Bioscience, para humanos), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las DOs se midieron en un lector de ELISA (Metertech Σ 960). La concentración de citoquinas se obtuvo por interpolación en una curva standard. Los límites de detección fueron 3.9, 3.1, 4.6 y 7.8 pg/ml para IL-1 β , IL-8, IL-6 y MCP-1, respectivamente. Los valores graficados son la media \pm SEM de veces de cambio respecto al control sin LPS obtenido de 4-5 experimentos independientes (considerando el valor control como 1).

La citotoxicidad celular se evaluó determinando la liberación de la enzima intracelular lactato deshidrogenasa (LDH) al sobrenadante de cultivo empleando el kit CytoTox 96 LDH-cytotoxicity de acuerdo con el manual de instrucciones (Promega). Brevemente, los sobrenadantes de cultivo (100 μ L) fueron incubados con 100 μ L de dye solution en oscuridad, a temperatura ambiente. Luego se midió la absorbancia a 490 nm. Los valores se expresaron como veces de cambio respecto al control \pm SEM (células cultivadas sin LPS).

Determinación de Metaloproteasas

Los macrófagos THP-1 ($8.10^5/1.5$ ml) fueron preincubados con medio RPMI libre de suero fetal bovino (0.1% glucosa, 0.02% seroalbúmina bovina), en presencia o no de LPS (1 μ g/mL) durante 24 h y posteriormente incubados con diferentes concentraciones de extracto acuoso de *S. campestris* (10, 100 and 1000 ng de ácido tánico/mL de extracto) durante 24 h más. Se colectaron los sobrenadantes de cultivo y se congelaron a -40° C para la posterior determinación de la actividad metaloproteasa por zimografía de acuerdo con la técnica descrita por Quesada et al., 1997. Brevemente, los sobrenadantes se sometieron a electroforesis en 7.5% SDS-PAGE conteniendo gelatina (1 mg/mL) en condiciones no reductoras. Las proteínas fueron renaturalizadas por incubación en Tritón X-100 al 2.5% durante 1 h a temperatura ambiente. La actividad proteolítica se reveló incubando el gel en buffer enzimático (Tris 25 mM, pH 7.5, 0.9% NaCl, 5 mM CaCl₂) durante toda la noche a 37 $^{\circ}$ C. El gel fue teñido con Coomassie Blue, decolorado, y la actividad enzimática revelada como claras bandas contrastadas por el fondo azul. El gel fue escaneado y las bandas se analizaron usando el programa Scion Image. Los valores graficados se expresan como veces de cambio (media \pm SEM) respecto al control sin LPS, obtenidos de 4-5 experimentos independientes.

Análisis de Western Blot

Los macrófagos THP-1 (5.10^6 células /3 mL) se incubaron con diferentes concentraciones de extracto acuoso de *S. campestris* (10, 100, 1000 y 10000 ng de extracto de ácido tánico/mL extracto) durante 24 h y luego se activaron las células en presencia de LPS (1 μ g/mL) durante 30 min. Después de los tratamientos, se realizó la lisis celular y se obtuvieron extractos citosólicos y nucleares utilizando *buffers* de extracción de proteínas apropiados, como se describió previamente (Cano et al., 2005). El contenido de proteína total en extractos nucleares y citoplasmáticos se determinó mediante el ensayo de medición de proteínas Bradford (Bio-Rad, EE. UU.). Cantidades iguales de proteína (35 μ g/calle) se corrieron en geles de poliacrilamida SDS al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante electrotransferencia. Las membranas se bloquearon durante la noche a 4 $^{\circ}$ C, luego se incubaron con anticuerpo primario durante la noche a 4 $^{\circ}$ C y finalmente se incubaron con anticuerpo secundario, durante 3 hs a temperatura ambiente. La detección de bandas inmunorreactivas se llevó a cabo empleando un reactivo comercial para la detección de quimioluminiscencia (ECL), según lo descrito por el fabricante (Thermo Scientific, EE. UU.). Los resultados se expresaron como veces de cambio (media \pm SEM) frente al control sin LPS, obtenido de 4-5 experimentos independientes.

Determinación de anión superóxido y glutatión

La producción de anión superóxido y glutatión fue evaluada por citometría de flujo, según lo descrito por Lombardo et. al., 2012. Los macrófagos THP-1 ($5 \cdot 10^5$ /mL) se incubaron con distintas concentraciones de extracto acuoso de *S. campestris* (10, 100, 1000 and 10000 ng de ácido tánico/mL extracto) en medio RPMI 1640 conteniendo 2% de suero fetal bovino, en presencia o no de LPS, durante 24 h. En ambas determinaciones se utilizó como control positivo carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP, 50 μ M/well), un desacoplante de la cadena de fosforilación oxidativa. El incremento en los niveles de anión superóxido inducido por el CCCP desencadena una respuesta antiestrés mediada por el aumento en los niveles de glutatión.

Luego de la estimulación, las células se incubaron en oscuridad a 37°C y 5% CO₂ con sondas fluorescentes. Para evaluar la producción de anión superóxido se empleó la sonda fluorescente hidroetidina (HE, 2mM/well) la cual, en presencia de anión superóxido, se oxida a etidio. Para evaluar la producción de glutatión, se utilizó la sonda fluorescente 5-clorometil fluoresceína (5-CMF, 0.05 μ M/well). Esta sonda forma aductos fluorescentes con tioles no proteicos intracelulares, de los cuales más del 95% corresponden a aductos GSH-5CMF. Luego de 20 minutos de incubación, las células se lavaron e inmediatamente corrieron en un citómetro de flujo Partec PAS III, equipado con un láser de argón 20 W 488nm (Partec, GmbH, Münster, Germany). Los resultados se expresan como veces de cambio (mediana \pm SD) respecto al control sin LPS. Todos los tratamientos se realizaron por duplicado y cada experimento se realizó al menos 3 veces.

Análisis estadístico

Todos los parámetros estadísticos se calcularon utilizando el software Graph Pad Prism 4.0 (GraphPad, San Diego, EE. UU.). El efecto del extracto acuoso de *S. campestris* sobre la producción de citoquinas y quemoquinas, la citotoxicidad, la expresión de p65-NF κ B/ I κ B- α y la producción de metaloproteasas fueron analizados por análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de Dunnet de comparaciones múltiples. El efecto del extracto sobre la producción de anión superóxido y glutatión, obtenidos por citometría de flujo, se analizaron utilizando el programa Win.MDI 2.8 (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). Las medianas se compararon mediante el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn. Se consideró significativo un $p < 0.05$.

3. RESULTADOS

Caracterización fitoquímica por HPLC-MS/MS

Los compuestos analizados en la solución estándar de trabajo por HPLC-MS/MS se presentan en la Tabla 1. Comprenden flavonoles mono y diglicosilados, flavan-3-oles tales como catequina y glicósidos de sarsasapogenina que se asignaron a partir de sus iones [M+H⁺] y fragmentos resultantes. Los 3-O-glicósidos de flavonoles son derivados de quercetina, mientras que los glicósidos de saponina presentan sarsasapogenina como aglicón común.

#	Tiempo de retención (min)	Fórmula molecular	Ion padre (m/z)	Ion fragmentado (m/z)
Catequina	6.12	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	291.0	139.0
Procianidina B2	7.85	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	579.5	139.0
Epicatequina	10.28	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	291.0	139.0
Quercetina-3-O-Gal	22.96	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.1	303.2
Quercetina-3-O-Glu	23.53	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.1	303.2
Rutina	23.73	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	611.1	303.2
Quercetina-3-O-AP	25.26	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	435.1	303.2
Quercetina-3-O-AF	25.90	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	435.1	303.2
Quercetina-3-O-Rha	27.11	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.1	303.2
Quercetina	65.31	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	303.2	153.0
Sarsasapogenina	67.37	C ₂₇ H ₄₄ O ₃	417.3	273.2

Tabla 1: Compuestos analizados por HPLC- MS/MS en las soluciones estándar.

A continuación, se presentan los cromatogramas obtenidos por HPLC-MS/MS (Fig. 1, 2, 3) que permitieron identificar los compuestos presentes en el extracto.

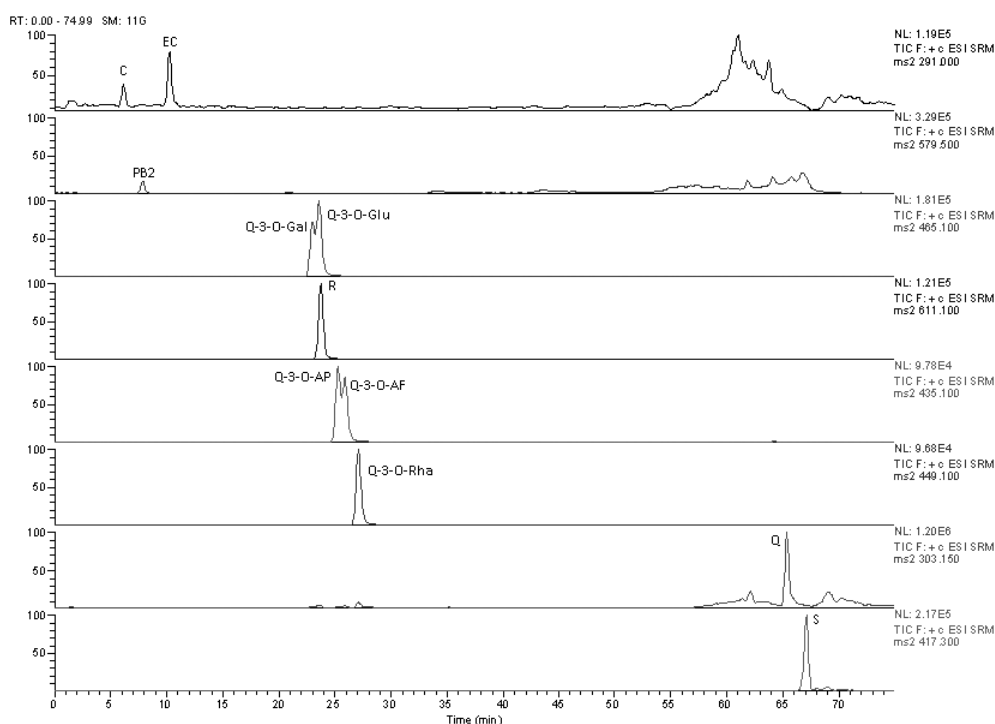


Figura 1: Cromatogramas correspondientes a solución estándar de trabajo conteniendo Quercetina-3-ramnosido (Q-3-O-Rha) rutina (R), procianidina B2 (PB2), catequina (C), epicatequina (EC), quercetina (Q), quercetina-3-O-glucosido (Q-3-O-Glu), quercetina-3-O-arabinofuranosido (Q-3-O-AF), ercetina-3-O-galactosido (Q-3-O-Gal), quercetina-3-O-arabinopiranosido (Q-3-O-AP) y sarsasapogenina (S).

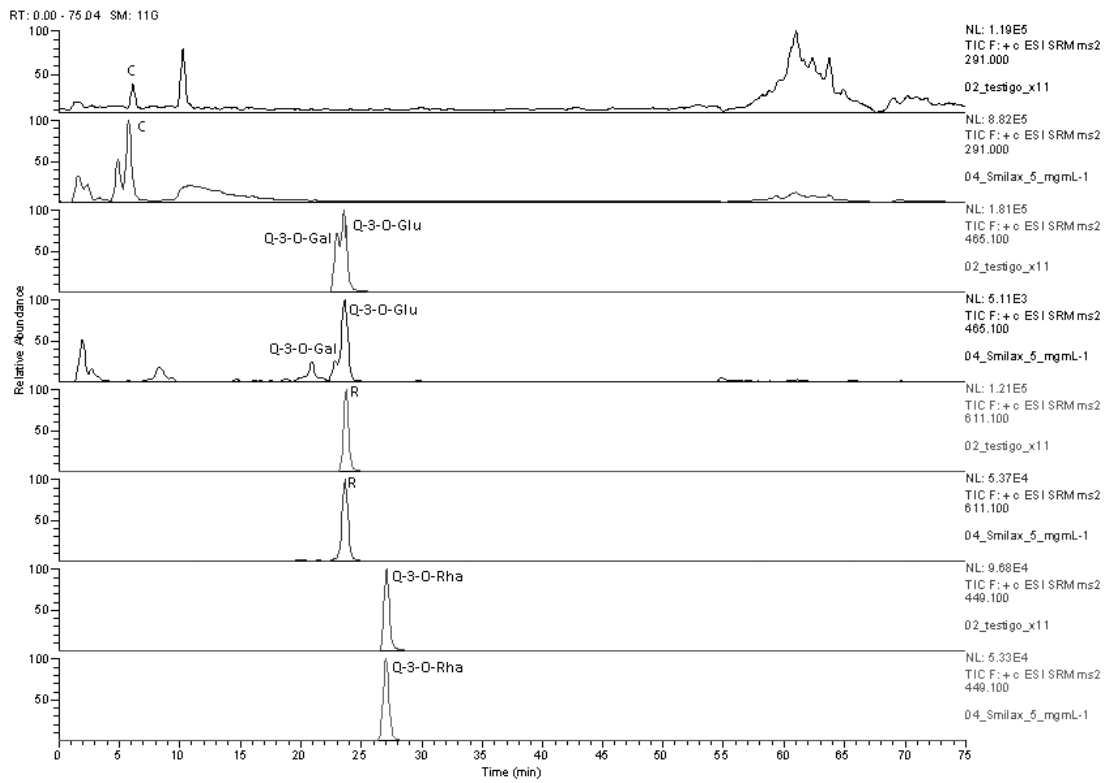


Figura 2: Cromatogramas correspondientes a compuestos identificados en extracto acuoso de *Smilax campestris* (estándar vs muestra). Catequina (C), quercetina-3-O-glucosido (Q-3-O-Glu), trazas de quercetina-3-O-galactósido (Q-3-O-Gal), rutina (R), Quercetina-3-ramosido (Q-3-O-Rha).

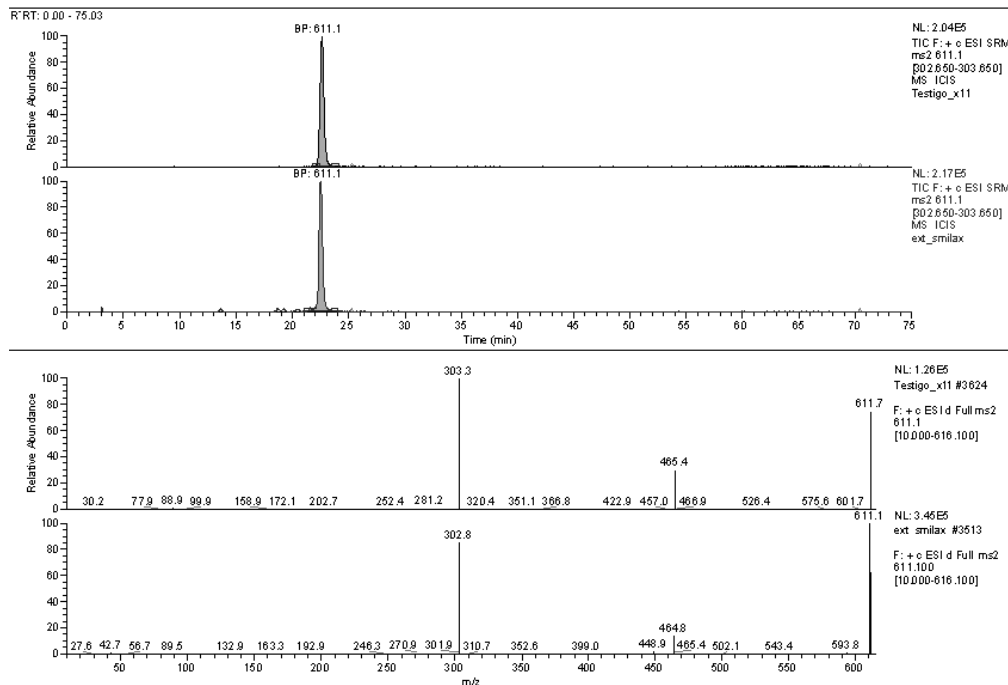


Figura 3: Confirmación estructural de la presencia de rutina en el extracto de *Smilax campestris* por comparación de patrón de fragmentación respecto del estándar.

Evaluación del efecto citotóxico del extracto acuoso de *S. campestris*

Para evaluar el efecto citotóxico del extracto acuoso de *S. campestris*, los macrófagos se estimularon con diferentes concentraciones del extracto (10, 100, 1000 o 10000 ng/mL) en presencia de LPS. El extracto acuoso de *S. campestris* no ejerció efecto citotóxico en las concentraciones ensayadas, evaluado mediante la prueba de liberación de LDH (Fig. 4).

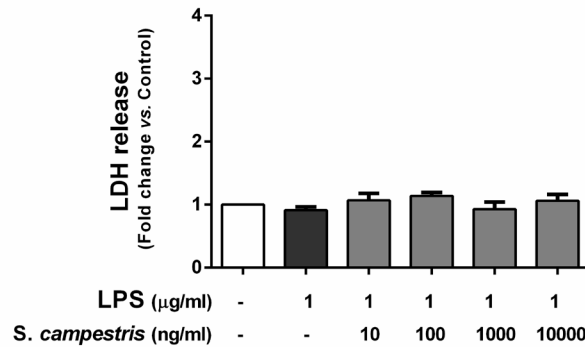


Figura 4: Efecto del extracto acuoso de *S. campestris* sobre la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) en macrófagos THP-1. Los datos se expresan como veces de cambio vs. control (al que se le asignó un valor de 1) \pm SEM.

El extracto acuoso de *S. campestris* disminuye la producción de IL-1 β , IL-6, IL-8 y MCP-1 en macrófagos THP-1 activados con LPS

A fin de evaluar el efecto del extracto acuoso de *S. campestris* sobre la producción de citoquinas proinflamatorias, las células macrofágicas fueron estimuladas con diferentes concentraciones del extracto (10, 100, 1000 ó 10000 ng/mL) durante 24 hs (IL-1 β , IL-8, MCP-1) ó 48 hs (IL-6). Los niveles de citoquinas y quemoquinas detectadas en el sobrenadante de cultivo de los macrófagos THP-1 estimulados con *S. campestris*, en ausencia de LPS, fueron similares al control (Fig 5 A, B, C y D). Como era de esperar, en presencia del estímulo proinflamatorio (LPS) la producción de las citoquinas evaluadas aumentó significativamente. Esta inducción fue inhibida significativamente cuando las células se cultivaron en presencia del extracto acuoso de *S. campestris*, alcanzando valores basales con la mayor concentración del extracto empleada (10.000 ng/mL) (Fig 5 E, F, G y H).

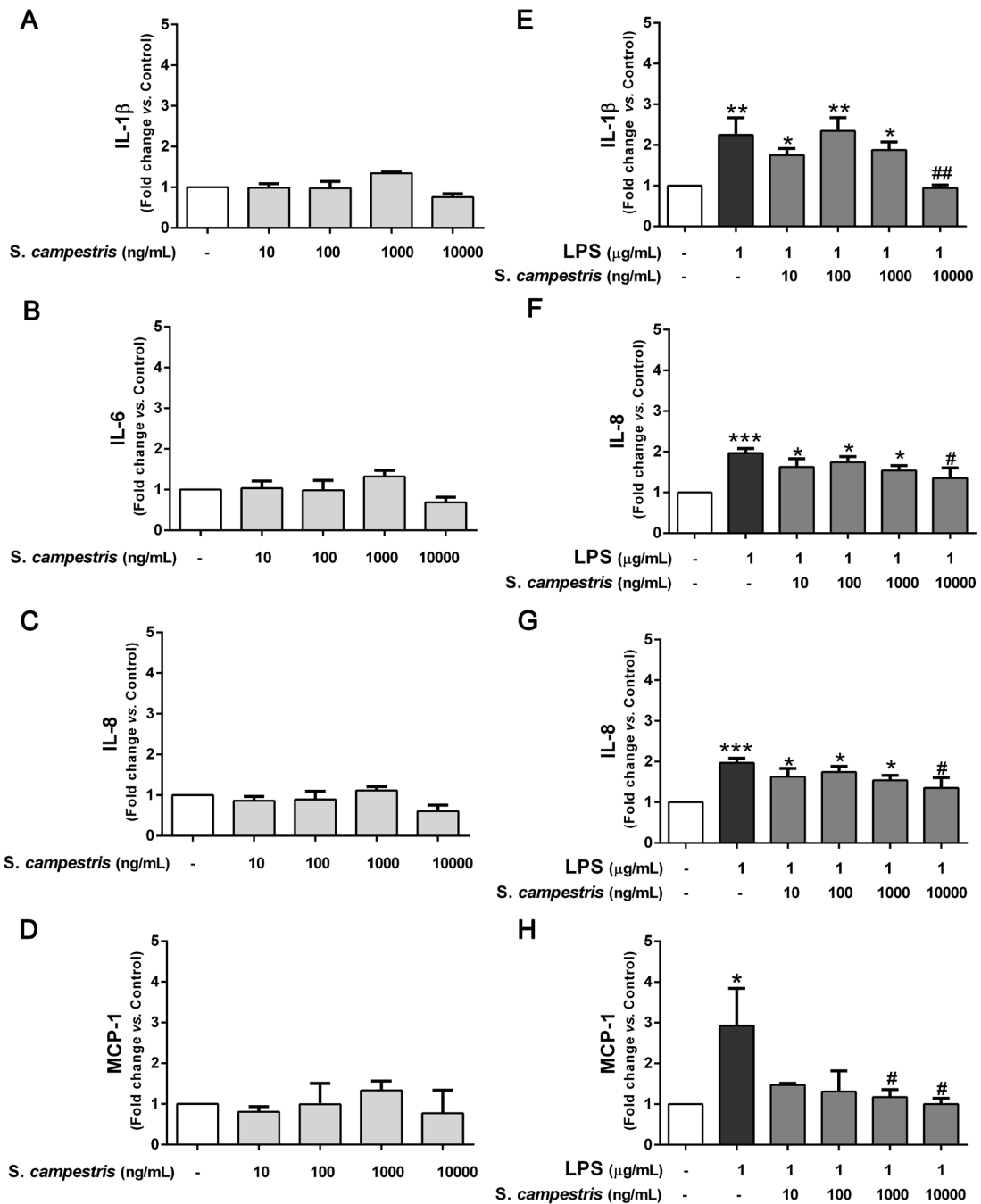


Figura 5: Efecto del extracto acuoso de *S. campestris* sobre los niveles de IL-1 β , IL-6, IL-8 y MCP-1 en macrófagos THP-1 después de 24 h (IL-1 β , IL-6, MCP-1) o 48h (IL-8) de cultivo en ausencia (A, B, C, D) o presencia (E, F, G, H) de LPS. Los resultados se expresan como veces de cambio respecto al control y/o LPS. Los valores se representan como la media \pm SEM. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs. control; #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$ vs. LPS.

El extracto acuoso de *S. campestris* disminuye la actividad gelatinasa (MMP-9) en macrófagos THP-1 activados con LPS

A fin de evaluar el efecto del extracto acuoso de *S. campestris* sobre la actividad de las enzimas metaloproteasas, los macrófagos THP-1 se estimularon con diferentes concentraciones de extracto (10, 100 y 1000 ng/mL) en presencia o no de LPS (1 µg/mL). En los sobrenadantes de cultivo se observó, por zimografía, una banda de 92 kDa que correspondería a la actividad gelatinasa de MMP-9. En condiciones basales, el extracto no modificó los niveles de gelatinasa observados (Fig 6A). Luego de estimular las células con LPS, se observó un marcado incremento en la actividad MMP-9. Como se muestra en la figura 5B, todas las concentraciones ensayadas del extracto acuoso de *S. campestris* disminuyeron significativamente la actividad de MMP-9 inducida por LPS, retornando a valores basales (Fig 6B).

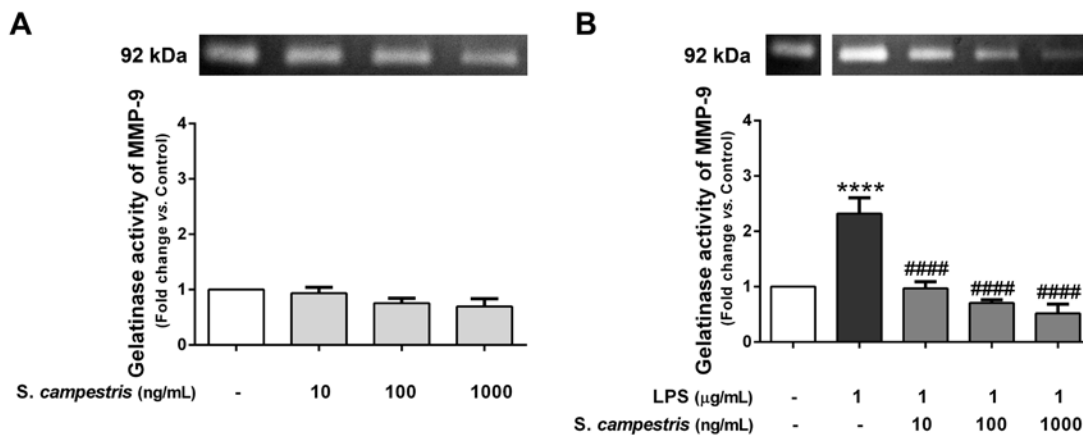


Figura 6: Efecto del extracto acuoso de *S. campestris* sobre la actividad de MMP-9 en macrófagos THP-1 en ausencia (A) o presencia (B) de LPS. Los resultados se expresan como veces de cambio vs control y/o LPS. Los valores son la media \pm SEM. ****: $p < 0.0001$ vs control, ####: $p < 0.0001$ vs LPS.

El extracto acuoso de *S. campestris* inhibe la translocación nuclear de NFκB en macrófagos THP-1 activados por LPS

Para evaluar el efecto del extracto acuoso de *S. campestris* sobre la expresión del factor de transcripción NFκB, se estimularon los macrófagos THP-1 con diferentes concentraciones de extracto de *S. campestris* (10, 100 1000 y 10000 ng/mL) en presencia de LPS (1 µg/mL). Como se esperaba, el estímulo proinflamatorio LPS indujo un aumento significativo en la expresión de la subunidad p65 del factor de transcripción NFκB en los extractos nucleares (Fig. 7B), lo cual se correlaciona con una disminución en los niveles de la subunidad p65 y su inhibidor IκBα en la fracción citosólica (Fig 7A, C). Sin embargo, cuando se estimularon los macrófagos THP-1 con extracto acuoso de *S. campestris*, la expresión de NF-κB inducida por LPS se inhibió significativamente retornando a valores basales en presencia de la concentración más alta de extracto ensayada (10000 ng/ml) en la fracción nuclear (Fig. 7B) con un aumento concordante en el inhibidor IκBα en los extractos citosólicos (Fig. 7C). Estos resultados sugieren que el extracto acuoso de *S. campestris* es capaz de inhibir la translocación de NFκB al núcleo en macrófagos THP-1 activados en presencia del estímulo inflamatorio LPS.

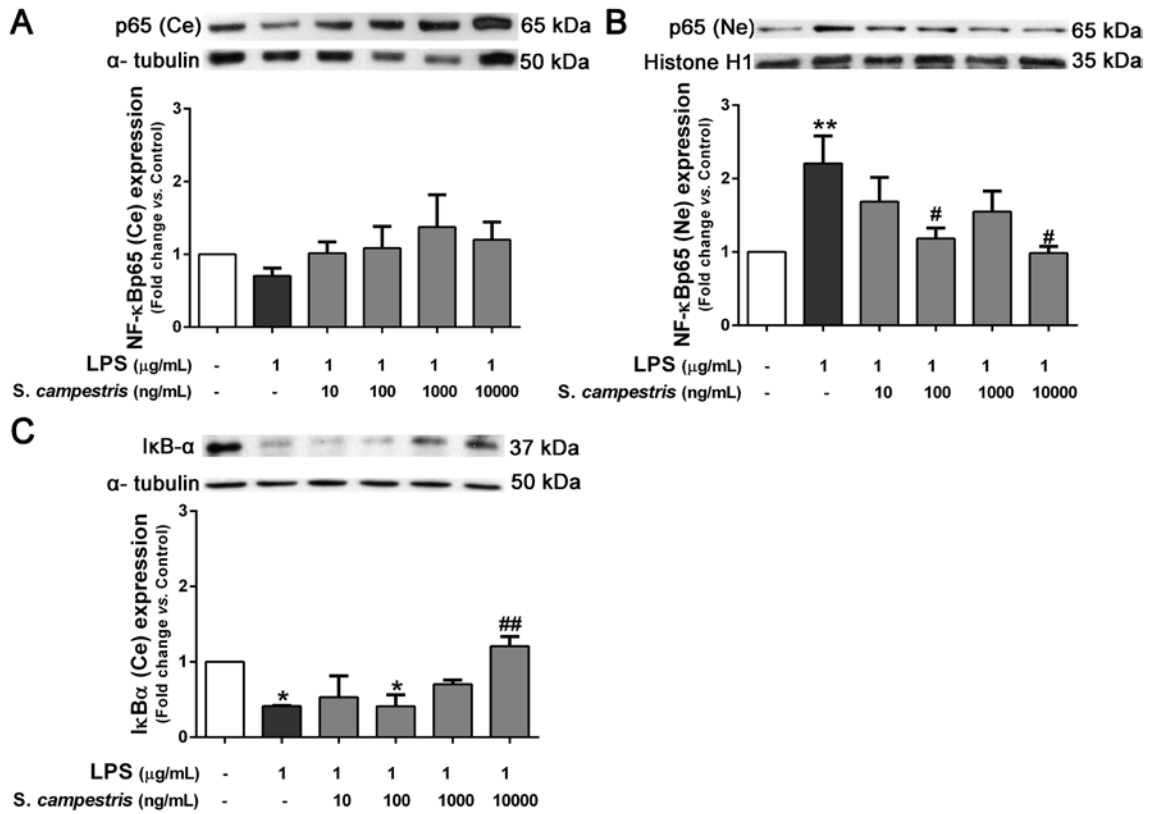


Figura 7: Efecto del extracto acuoso de *S. campestris* sobre la expresión del factor de transcripción NF κ B en macrófagos THP-1 en presencia de LPS (1 μ g/mL). Ce: Extractos citosólicos, Ne: Extractos nucleares. Los datos se expresan como veces de cambio respecto al control y/o LPS \pm SEM. *: p < 0.05, **: p < 0.01 vs. control; #: p < 0.05, ##: p < 0.01 vs. LPS.

El extracto acuoso de *S. campestris* disminuye los niveles de anión superóxido en macrófagos THP-1

A fin de estudiar el efecto del extracto acuoso de *S. campestris* sobre la producción de anión superóxido, los macrófagos THP-1 fueron incubados con diferentes concentraciones del extracto (10, 100, 1000 y 10000 ng/mL) observándose una disminución significativa en los niveles del radical libre en presencia de las mayores concentraciones del extracto empleadas, 1000 y 10000 ng/mL, luego de 24 h de incubación (Fig. 8A y B). El tratamiento de los macrófagos THP-1 con LPS no modificó la producción de anión superóxido en las condiciones experimentales ensayadas. Sin embargo, en esta condición inflamatoria, todas las concentraciones de extracto evaluadas disminuyeron significativamente la producción de anión superóxido (Fig. 8C y D).

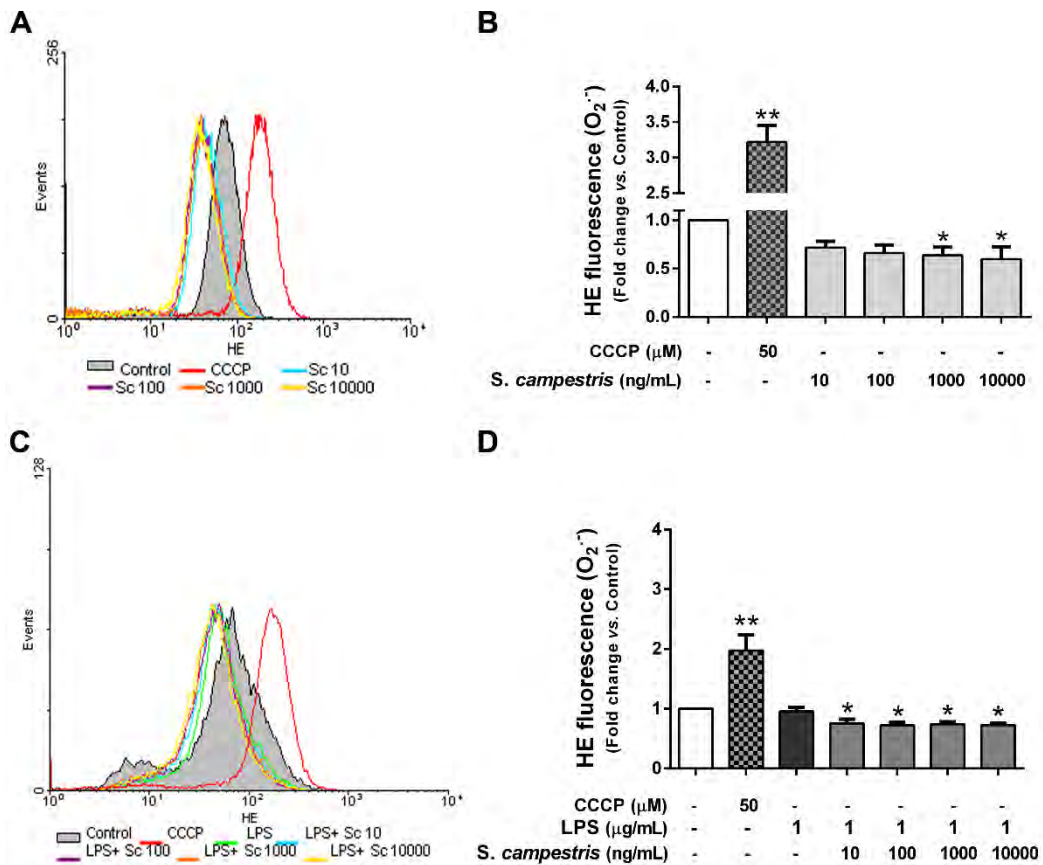


Figura 8: Efecto del extracto acuoso de *S. campestris* (Sc) sobre los niveles de anión superóxido en macrófagos THP-1, en ausencia (A, B) o presencia de LPS (C, D). (A, C) Diagramas de frecuencia, eventos medidos en el canal FL2 (HE). (B, D) Cuantificación del anión superóxido (fluorescencia HE) expresado como veces de cambio respecto al control. Los valores se representan como la media ± SEM. *: p <0.05, **: p <0.01 vs control.

El extracto acuoso de *S. campestris* no modifica el nivel de glutatión en macrófagos THP-1

A fin de estudiar el efecto del extracto acuoso de *S. campestris* sobre los niveles del antioxidante glutatión, los macrófagos THP-1 fueron tratados con diferentes concentraciones del extracto (10, 100, 1000 y 10000 ng/mL) en presencia o no de LPS (1 ug/mL). Luego de 24 horas de incubación, no se observaron variaciones en los niveles de glutatión tanto en condiciones basales como inflamatorias (Fig. 9A, B y C, D, respectivamente).

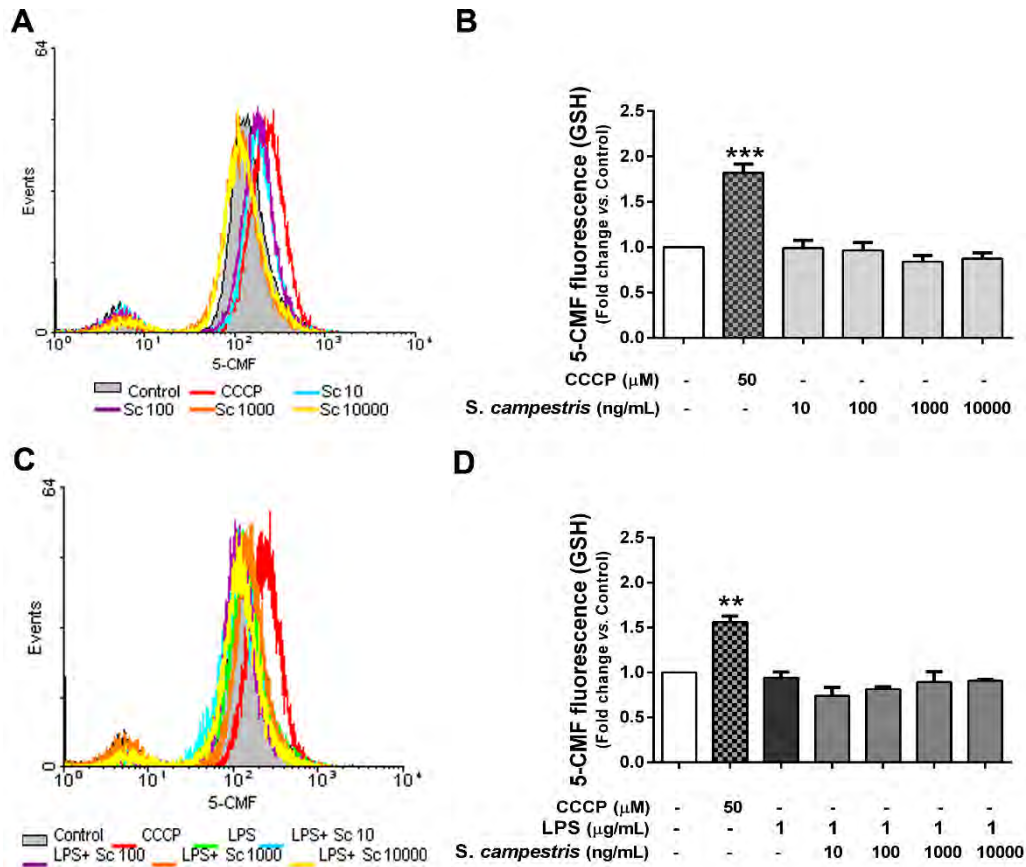


Figura 9: Efecto del extracto acuoso de *S. campestris* (Sc) sobre los niveles de glutatión en macrófagos THP-1 en ausencia (A, B) o presencia de LPS (C, D). (A, C) Diagramas de frecuencia, eventos medidos en el canal FL1 (5-CMF). (B, D) Cuantificación de glutatión (fluorescencia de 5-CMF) expresada como veces de cambio respecto al control (B). Los valores se representan como la media \pm SEM. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0,001$ vs. control.

4. DISCUSIÓN

En este trabajo, se realizó la determinación del perfil fitoquímico del extracto acuoso de rizomas de *S. campestris*. Se identificaron, por HPLC-MS/MS, catequina y derivados 3-O-glicosilados de quercetina (Q-3-O-Glu, Rutina, Q-3-O-Rha y trazas de Q-3-O-Gal). Por otra parte, se determinó también la presencia glicósidos de sarsasapogenina. A su vez, demostramos que el extracto acuoso de rizomas de *S. campestris* Griseb es capaz de modular la actividad de macrófagos humanos. El extracto disminuyó la producción de citoquinas proinflamatorias y la actividad de metaloproteasas, enzimas implicadas en el remodelado tisular, en un contexto inflamatorio, además de inhibir la translocación al núcleo del factor de transcripción NFκB y disminuir la producción de anión superóxido en estas células.

Los macrófagos activados por un entorno proinflamatorio producen un amplio rango de moléculas con las cuales modulan esta respuesta (Makon-Sebastien, 2014). Los rizomas de varias especies del género *Smilax* se emplean en la medicina popular por sus efectos antiinflamatorios, habiéndose demostrado un efecto inhibitorio de la expresión y secreción de diversas moléculas proinflamatorias, y se han sugerido algunos posibles mecanismos de acción de éstas en modelos

animales de enfermedades inflamatorias como dermatitis y artritis (Ki et al., 2016; Vijayalakshmi, 2012) Por ejemplo, en modelos ex vivo, Jiang, J, Xu, 2003 demostraron que la administración de extracto acuoso de rizomas de *Smilax china* (400 y 800 mg/kg), en ratas artríticas, disminuye la producción de las citoquinas IL-1 y TNF- α en macrófagos peritoneales estimulados por LPS, efecto en el cual estaría implicado el factor de transcripción NF κ B. Estudios in vitro recientemente realizados en células endoteliales, demostraron que el extracto etanólico de hojas de *S. china* y ciertos compuestos purificados de las mismas, disminuyen la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 y TNF- α , implicadas en la adhesión endotelial y extravasación de los linfocitos. A su vez, dicho extracto disminuye los niveles de la citoquina quimiotáctica IL-8. Esto sería importante para mejorar la disfunción endotelial, por ejemplo, en la aterosclerosis (Lincha et. al., 2016). En este trabajo investigamos el rol del extracto acuoso de *S. campestris* sobre la actividad de macrófagos humanos (células THP-1 diferenciadas a macrófagos en presencia de PMA). Nuestros resultados indican que el extracto acuoso de *S. campestris* es capaz de disminuir los niveles de las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-8 y MCP-1 cuando las células se encuentran en un entorno inflamatorio inducido por LPS, retornando a valores basales con la mayor concentración de extracto ensayada (10000 ng/mL), sin presentar efectos citotóxicos a estas concentraciones. El efecto del extracto sobre las citoquinas podría atribuirse, al menos en parte, a la presencia de flavonoles. En el extracto acuoso de rizomas de *S. campestris* hemos identificado catequina y derivados 3-O-glicosilados de quercetina (Q-3-O-Glu, Rutina, Q-3-O-Rha y trazas de Q-3-O-Gal). Por otra parte, se determinó también la presencia glicósidos de sarsasapogenina. Existen evidencia de que algunos flavonoles, como la quercetina aislada de extractos de plantas provenientes de diferentes especies del género *Smilax*, presentan efectos antiinflamatorios, entre ellos, la capacidad de reducir TNF- α , en macrófagos murinos estimulados por LPS (Ruangnoo et. al., 2012). Además, se observó que ciertos polisacáridos purificados de *S. china* son capaces de modular los niveles de citoquinas proinflamatorias en macrófagos, disminuyendo la secreción de TNF- α e IL-6, efecto en el cual estarían implicadas vías de transcripción como ERK1/2 y JNK (Lu et. al., 2015). Se ha demostrado que extractos vegetales que en su composición cuentan con flavonoides como la quercetina y sus derivados glicosilados (rutina, quercetina 3-O-ramnósido, quercetina 3-O-glucósido, entre otros) así como también otros flavonoides, como la catequina y epicatequina, son capaces de modular diversos mediadores proinflamatorios y de estrés oxidativo. Entre los mecanismos antiinflamatorios se encuentran la regulación negativa en la producción de óxido nítrico (NO), citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-1 β , IL-8), COX-2, entre otros (Ho et al., 2017; Lin et al., 2017; Cho et al., 2016). A su vez, en el extracto acuoso empleado se ha detectado la presencia de la saponina sarsasapogenina. Existen evidencias científicas de que los derivados de la sarsasapogenina son capaces de ejercer efectos antiinflamatorios mediante la modulación de diversos mediadores proinflamatorios como la citoquina TNF- α , la quemoquina MCP-1, iNOS, NO, COX-2, PGE2 en macrófagos murinos activados por LPS por una vía dependiente del factor de transcripción NF κ B (Dong et al., 2017)

Por otro lado, es sabido que la vía del factor de transcripción NF κ B juega un papel crucial en la modulación de la respuesta inflamatoria. La translocación de NF κ B al núcleo induce la expresión de varios genes relacionados con la inflamación, por lo que la regulación negativa de la activación de NF κ B se convierte en un target importante para controlar la inflamación exacerbada (Afonina et al., 2017). En este estudio, observamos que el extracto acuoso de *S. campestris* inhibe la activación del factor de transcripción NF κ B inducido por LPS, regulando negativamente la producción de mediadores proinflamatorios y, por lo tanto, la respuesta inflamatoria. Nuestros resultados están en línea con los de Navarrete et al., 2015 que demostraron que el extracto acuoso de tomate inhibe la expresión de NF κ B disminuyendo los niveles de IL-1 y TNF en macrófagos activados por LPS. A su vez, nuestros resultados son consistentes con lo descrito en la bibliografía que propone que extractos vegetales que en su composición cuentan con algunos de los flavonoides identificados en nuestro extracto (derivados glicosilados de quercetina y catequina) son capaces de ejercer sus efectos

antiinflamatorios por medio la regulación negativa de diversas vías de señalización y factores de transcripción como NFκB, JNK, STAT, ERK y MAPKs en macrófagos RAW activados por LPS (Cho et al., 2016; Ho et al., 2017; Lin et al., 2017).

En un contexto inflamatorio, los macrófagos activados además producen enzimas metaloproteasas. Se ha demostrado en diversos tipos celulares, entre ellos macrófagos (de Pinho et al., 2014), queratinocitos (Choi et al., 2013), células cocleares (Nam, Si, Kwon, 2014), que el aumento de las citoquinas proinflamatorias IL-1β o TNF-α incrementa la producción de la gelatinasa MMP-9. En concordancia con estos estudios, en este trabajo demostramos, por primera vez, que el extracto acuoso de *S. campestris* disminuye la actividad de MMP-9 a la vez de reducir los niveles de citoquinas proinflamatorias, como IL-1β, inducidos cuando las células son estimuladas con LPS bacteriano. Se ha demostrado que componentes fenólicos extraídos de aceite de oliva modulan la expresión de MMP-9 en células THP-1 activadas por TNF-α, sugiriendo que este mecanismo contribuye a los efectos antiinflamatorios y antiateroescleróticos del aceite de oliva (Dell'Agli et al., 2010). En nuestros estudios, empleando el extracto de *S. campestris*, observamos un efecto similar para todas las concentraciones ensayadas. Escasos son los estudios relacionados al efecto del género *Smilax* sobre la actividad de estas enzimas. Recientemente, Nho et al., 2015 sugirieron a los extractos de *S. china* como potenciales agentes antimetastásicos por su efecto sobre enzimas MMP y sus inhibidores (TIMP). En un modelo de células de cáncer de mama demostraron que el extracto etanólico de *S. china* reduce la expresión de moléculas asociadas a la degradación de la matriz extracelular, a la vez de aumentar los inhibidores TIMP-1 y TIMP-2. Es interesante destacar que el extracto acuoso de *S. campestris* empleado en este trabajo, fue capaz de inhibir la producción de MMP-9 asociado a una disminución no solo en los niveles de la citoquina proinflamatoria IL-1β sino también de las quemoquinas IL-8, con propiedades pro-angiogénicas, y MCP-1. Nuestros resultados están en concordancia con los de Yi et al., 2008, quienes demostraron que flavonoles purificados de extractos de *S. glabra* inhiben la adhesión de linfocitos T vía la reducción en los niveles de TNF-α asociada a una disminución de MMP-9. Por otra parte, Chae et al., 2012 han observado que los extractos etanólicos de *Rosemarinus officinalis* L. inhiben la migración celular relacionada con la disminución de los niveles de MMP-9 y MCP-1 en macrófagos RAW activados por LPS. Entre los compuestos presentes en el extracto de *S. campestris* empleado se encuentran la quercetina, y su derivado glicosilado la rutina, que podrían ser responsables al menos en parte del efecto inhibitorio observado sobre las MMP. Hay evidencias de que extractos vegetales que en su composición incluyen los flavonoides mencionados son capaces de inhibir la actividad de MMP-9 a la vez de disminuir los niveles de citoquinas proinflamatorias como TNF-α, IL-1β (Benso et al., 2016) e IL-6 (Li et al., 2018) en macrófagos murinos RAW, en forma concordante con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Por otro lado, los macrófagos activados producen un amplio rango de ROS como parte de los mecanismos de defensa frente a la infección, no obstante, su producción excesiva desencadena procesos inflamatorios crónicos. A su vez, la inflamación puede inducir la producción de moléculas que favorecen el incremento de ROS. Existe, por lo tanto, una íntima relación entre inflamación y estrés oxidativo (Salzano et al., 2014). Recientemente se describió que el incremento en la producción de IL-1β en macrófagos activados genera especies reactivas del oxígeno por mecanismos que involucran la activación del factor de transcripción NF-κB o la activación del inflammasoma NLRP3 (Kim et al., 2016; Wang et al., 2015). En concordancia, nosotros observamos en los macrófagos THP-1 que el extracto acuoso de *S. campestris* reduce los niveles de la citoquina proinflamatoria IL-1β, acompañado de una disminución en la producción de anión superóxido, primer eslabón en la cadena productora de ROS.

Este efecto es claro cuando los macrófagos están activados por LPS. En ausencia del estímulo proinflamatorio, la disminución de la secreción de IL-1 β no es significativa.

Es conocido que los extractos de diferentes plantas medicinales poseen la capacidad de secuestrar radicales oxidativos ejerciendo así sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios (Murakami et al., 2015; Cox et. al., 2005). En particular, nosotros (Rugna et al., 2013) y otros autores (Morais et al., 2014), demostramos por métodos químicos que diferentes extractos alcohólicos de rizomas y partes aéreas de *S. campestris* pueden capturar distintos radicales libres. Sin embargo, las evidencias son más escasas en modelos celulares.

Park et. al., 2014, demostraron que el extracto alcohólico de sarsaparrilla (200 μ g/mL), en concentraciones mayores a la empleada por nosotros, disminuye la producción de ROS con un concomitante aumento en la producción de glutatión en fibroblastos dérmicos dañados por luz UV o peróxido de hidrógeno. En nuestro modelo de macrófagos THP-1, el extracto acuoso de rizomas de *S. campestris* disminuye los niveles de anión superóxido sin alterar el balance intracelular de glutatión. En el presente trabajo, hemos detectado en el extracto acuoso empleado, por medio de la técnica de HPLC-MS/MS, la presencia de flavonoides que incluyen catequina y derivados 3-O-glicosilados de quercetina (Q-3-O-Glu, Rutina, Q-3-O-Rha) además de la presencia de glicósidos de sarsasapogenina. Proponemos que algunos de ellos podrían estar involucrados en el efecto inhibitorio observado sobre los niveles de anión superóxido. Existen evidencias de que ciertos flavonoides, como la quercetina, la catequina y la epicatequina tienen una alta capacidad de captar ROS, evaluada por el ensayo de DPPH, lo cual se relacionaría con la inhibición observada por los autores sobre la producción de mediadores proinflamatorios como TNF- α y COX-2 y la vía del factor de transcripción de NF κ B en macrófagos murinos activados por LPS (Murakami et al., 2015). Estudios recientes, demostraron que ciertos flavonoides como la quercetina y la catequina son capaces de inhibir la producción de ROS en macrófagos murinos activados en presencia de LPS (Hu et al., 2018; Tao et. al., 2016; Zhao et. al., 2014).

Nuestros resultados no mostraron una alteración en los niveles de glutatión intracelular. Dado que la inhibición observada sobre los niveles de anión superóxido es aproximadamente del 20% respecto del control, la misma podría no ser suficiente para alterar el balance global de dicho antioxidante endógeno. Los macrófagos, al ser células fagocíticas, deben ser capaces de lidiar con los efectos perjudiciales de los ROS, que se generan en grandes cantidades durante la respuesta inflamatoria (Hussain, 2016). Por esta razón, los macrófagos cuentan con un sistema redox altamente desarrollado capaz de contrarrestar fluctuaciones pequeñas en los niveles de ROS manteniendo la homeostasis celular (Ault, JG, Lawrence, 2003).

Aunque muchos extractos vegetales han sido empleados por la medicina popular en el tratamiento de enfermedades inflamatorias solo algunos de ellos han sido estudiados científicamente. Comprender como los extractos de ciertas plantas medicinales son capaces de modular la producción de diferentes mediadores proinflamatorios, no solo puede explicar sus efectos beneficiosos, sino también, contribuyen a ampliar el conocimiento sobre el uso terapéutico de los extractos vegetales.

En conclusión, en este estudio demostramos un efecto antiinflamatorio del extracto acuoso de *S. campestris* sobre la actividad de macrófagos humanos THP-1 activados con LPS, ejercido por la inhibición de la translocación al núcleo del factor de transcripción NF κ B y la producción de citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6, IL-8 y MCP-1, así como también sobre la actividad de la metaloproteasa

MMP-9. Asimismo, el extracto acuoso de *S. campestris* y disminuyó los niveles de anión superóxido, implicando efectos antioxidantes y antiinflamatorios, sin afectar los niveles del antioxidante endógeno glutatión. Cabe destacar, que en ausencia de un estímulo inflamatorio importante como es el LPS, la funcionalidad de los macrófagos no se encuentra afectada. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el extracto acuoso de *S. campestris* posee un potente efecto antiinflamatorio por lo que su uso podría resultar una alternativa prometedora en el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias.

5. Referencias

- Afonina, I.S., Zhong, Z., Karin, M., Beyaert, R., 2017. Limiting inflammation - The negative regulation of NF- κ B and the NLRP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* 18, 861–869. doi:10.1038/ni.3772
- Ault, JG, Lawrence, D., 2003. Glutathione distribution in normal and oxidatively stressed cells. *Exp Cell Res* 285(1) 9-14.
- Benso, B., Franchin, M., Massarioli, A.P., Paschoal, J.A.R., Alencar, S.M., Franco, G.C.N., Rosalen, P.L., 2016. Anti-inflammatory, anti-osteoclastogenic and antioxidant effects of malva sylvestris extract and fractions: In vitro and in vivo studies. *PLoS One* 11, 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0162728
- Cano, E., Canellada, A., Minami, T., Iglesias, T., Redondo, J.M., 2005. Depolarization of neural cells induces transcription of the Down syndrome critical region 1 isoform 4 via a calcineurin/nuclear factor of activated T cells-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 29435–29443. doi:10.1074/jbc.M506205200
- Chae, I.G., Yu, M.H., Im, N.-K., Jung, Y.T., Lee, J., Chun, K.-S., Lee, I.-S., 2012. Effect of *Rosemarinus officinalis* L. on MMP-9, MCP-1 Levels, and Cell Migration in RAW 264.7 and Smooth Muscle Cells. *J. Med. Food* 15, 879–886. doi:10.1089/jmf.2012.2162
- Chanput, W., Mes, J.J., Wichers, H.J., 2014. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int. Immunopharmacol.* doi:10.1016/j.intimp.2014.08.002
- Cho, Y.H., Kim, N.H., Khan, I., Yu, J.M., Jung, H.G., Kim, H.H., Jang, J.Y., Kim, H.J., Kim, D.I., Kwak, J.H., Kang, S.C., An, B.J., 2016. Anti-inflammatory Potential of Quercetin-3-O- β -D-(‘2’-galloyl)-glucopyranoside and Quercetin Isolated from *Diospyros kaki* calyx via Suppression of MAP Signaling Molecules in LPS-induced RAW 264.7 Macrophages. *J. Food Sci.* 81, C2447–C2456. doi:10.1111/1750-3841.13497
- Choi, WY, Lim, HW, Lim, C., 2013. Anti-inflammatory, antioxidative and matrix metalloproteinase inhibitory properties of 20(R)-ginsenoside Rh2 in cultured macrophages and keratinocytes. *J Pharm Pharmacol* 65(2) 310-316.
- Christodoulou, E., Kadoglou, N.P.E., Stasinopoulou, M., Konstandi, O.A., Kenoutis, C., Kakazanis, Z.I., Rizakou, A., Kostomitopoulos, N., Valsami, G., 2018. *Crocus sativus* L. aqueous extract reduces atherogenesis, increases atherosclerotic plaque stability and improves glucose control in diabetic atherosclerotic animals. *Atherosclerosis* 268, 207–214. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2017.10.032
- Cox, SD, Jayasinghe, KC, Markham, J., 2005. Antioxidant activity in Australian native sarsaparilla (*Smilax glycyphylla*). *J Ethnopharmacol* 101(1-3) 162-168.
- de Pinho, RT, da Silva, WS, de Castro Côrtes, LM, da Silva Vasconcelos Sousa, P, de Araujo Soares, RO, Alves, C., 2014. Production of MMP-9 and inflammatory cytokines by Trypanosoma cruzi-infected macrophages. *Exp Parasitol.* 2014 Dec;14772-80. doi 10.1016/j.exppara.2014.09.003. Epub 2014 Oct 18.
- Dell’Agli, M, Fagnani, R, Galli, GV, Maschi, O, Gilardi, F, Bellosta, S, et al., 2010. Olive oil phenols modulate the expression of metalloproteinase 9 in THP-1 cells by acting on nuclear factor-kappaB signaling. *J Agric Food Chem* 58(4) 2246-2252.
- Dong, D., Zhou, N.N., Liu, R.X., Xiong, J.W., Pan, H., Sun, S.Q., Ma, L., Wang, R., 2017. Sarsasapogenin-AA13 inhibits LPS-induced inflammatory responses in macrophage cells in vitro and relieves dimethylbenzene-induced ear edema in mice. *Acta Pharmacol. Sin.* 38, 699–709. doi:10.1038/aps.2016.180
- FNA, 1978. *Farmacopea Nacional Argentina (FNA)*. 6th Ed. 370.
- Ghezzi, P., 2011. Role of glutathione in immunity and inflammation in the lung. *Int J Gen Med* 4 105-113.
- Gorzalczany, S., Rojo, A., Rondina, R., Debenedetti, S., Acevedo, C., 1999. Estudio de toxicidad aguda por vía oral de plantas medicinales Argentinas. *Acta Farm. Bonaer.* 18, 221–224.
- Guaglianone, R, Gattuso, S., 1991. Estudios taxonómicos sobre el género *Smilax* (Smilacaceae). *Boletín la Soc. Argentina Botánica* 27(1-2)105-129.
- Ho, G.T.T., Wangenstein, H., Barsett, H., 2017. Elderberry and elderflower extracts, phenolic compounds, and metabolites and their effect on complement, RAW 264.7 macrophages and dendritic cells. *Int. J. Mol. Sci.* 18. doi:10.3390/ijms18030584

- Hu, Q., Yuan, B., Xiao, H., Zhao, L., Wu, X., Rakariyatham, K., Zhong, L., Han, Y., Muinde Kimatu, B., Yang, W., 2018. Polyphenols-rich extract from: *Pleurotus eryngii* with growth inhibitory of HCT116 colon cancer cells and anti-inflammatory function in RAW264.7 cells. *Food Funct.* 9, 1601–1611. doi:10.1039/c7fo01794d
- Hussain, Tarique; Tan, Bie; Yin, Yulong; Blachier, Francois; Myrlene C. B., T., 2016. *Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?* 2016.
- Jiang, J, Xu, Q., 2003. Immunomodulatory activity of the aqueous extract from rhizome of *Smilax glabra* in the later phase of adjuvant-induced arthritis in rats. *J Ethnopharmacol.* 85(1) 53-59.
- Ki, N.Y., Park, E.J., Sung, I.S., Ju, S.A., Kim, K.U., Kim, M.R., Song, D.Y., Lee, M.J., Kim, H.S., Kang, B.H., Chung, H.J., Choi, E.J., Yoon, K.H., Lee, M.W., Yun, S., Min, B., Kwon, S.H., Shin, H.S., 2016. The Hot-Water Extract of *Smilacis Chinae* Rhizome Suppresses 2,4-Dinitrochlorobenzene and House Dust Mite-Induced Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in Mice. *Phyther. Res.* 30, 636–645. doi:10.1002/ptr.5573
- Kim, SK, Choe, JY, Park, K., 2016. Rebamipide Suppresses Monosodium Urate Crystal-Induced Interleukin-1beta Production Through Regulation of Oxidative Stress and Caspase-1 in THP-1 Cells. *Inflamm.* 39(1) 473-482.
- Li, Y.R., Fu, C.S., Yang, W.J., Wang, X.L., Feng, D., Wang, X.N., Ren, D.M., Lou, H.X., Shen, T., 2018. Investigation of constituents from *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl and evaluation of their anti-inflammatory properties in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J. Ethnopharmacol.* 221, 37–47. doi:10.1016/j.jep.2018.04.017
- Lin, J.T., Chang, Y.Y., Chen, Y.C., Shen, B.Y., Yang, D.J., 2017. Molecular mechanisms of the effects of the ethanolic extract of *Muntingia calabura* Linn. fruit on lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory mediators in macrophages. *Food Funct.* 8, 1245–1253. doi:10.1039/c6fo01735e
- Linha, VR, Zhao, BT, Woo, MH, Yang, JJ, Shin, H., 2016. Effects of Constituent Compounds of *Smilax china* on Nicotine-Induced Endothelial Dysfunction in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Biol Pharm Bull* 39(6) 984-992.
- Lu, CL, Wei, Z, Min, W, Hu, MM, Chen, WL, Xu, XJ, et al., 2015. Polysaccharides from *Smilax glabra* inhibit the pro-inflammatory mediators via ERK1/2 and JNK pathways in LPS-induced RAW264.7 cells. *Carbohydr Polym* 122 428-436.
- Makon-Sebastien, N, Francis, F, Eric, S, Henri, VP, Francois, LJ, Laurent, P, et al., 2014. Lycopene modulates THP1 and Caco2 cells inflammatory state through transcriptional and nontranscriptional processes. *Mediat. Inflamm* 2014 507272.
- Mittal, R, Patel, AP, Debs, LH, Nguyen, D, Patel, K, Grati, M, et al., 2016. ntricate Functions of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological Conditions. *IJ Cell Physiol* 231(12) 2599-2621.
- Morais, M.I., Pinto, M.E.A., Araújo, S.G., Castro, A.H.F., Duarte-Almeida, J.M., Rosa, L.H., Rosa, C.A., Johann, S., Lima, L.A.R. dos S., 2014. Antioxidant and antifungal activities of *Smilax campestris* Griseb. (*Smilacaceae*). *Nat. Prod. Res.* 28, 1275–1279. doi:10.1080/14786419.2014.895728
- Murakami, Y., Kawata, A., Ito, S., Katayama, T., Fujisawa, S., 2015. Radical-scavenging and anti-inflammatory activity of quercetin and related compounds and their combinations against RAW264.7 cells stimulated with *porphyromonas gingivalis* fimbriae. relationships between anti-inflammatory activity and quantum chemical par. *In Vivo (Brooklyn)*. 29, 701–710.
- Nam, SI, Kwon, T., 2014. Dexamethasone inhibits interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression in cochlear cells. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 7(3) 175-180.
- Navarrete, S., Alarcón, M., Palomo, I., 2015. Aqueous extract of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and ferulic acid reduce the expression of TNF- α and IL-1 β in LPS-activated macrophages. *Molecules* 20, 15319–15329. doi:10.3390/molecules200815319
- Nho, KJ, Chun, JM, Lee, AY, Kim, H., 2015. Anti-metastatic effects of *Rheum Palmatum* L. extract in human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Env. Toxicol Pharmacol* 40(1) 30-38.
- Park, G, Kim, TM, Kim, JH, Oh, M., 2014. Antioxidant effects of the sarsaparilla via scavenging of reactive oxygen species and induction of antioxidant enzymes in human dermal fibroblasts. *Env. Toxicol Pharmacol* 38(1) 305-315.
- Quesada, A.R., Barbacid, M.M., Mira, E., Fernández-Resa, P., Márquez, G., Aracil, M., 1997. Evaluation of fluorometric and zymographic methods as activity assays for stromelysins and gelatinases. *Clin. Exp. Metastasis* 15, 26–32.
- Ruangnoo, S, Jaiaree, N, Makchuchit, S, Panthong, S, Thongdeeying, P, Itharat, A., 2012. An in vitro inhibitory effect on RAW 264.7 cells by anti-inflammatory compounds from *Smilax corbularia* Kunth. *Asian Pac J Allergy Immunol* 30(4) 268-274.
- Rugna, A; Gurni, Wagner, M., 1999. Progress in studies on flavonols from *Smilax campestris* Griseb. – *Smilacaceae*. *Acta Hortic.* 501(501)191-194.

- Rugna, A; Gurni, Wagner, M., 2005. *Fitoquímica comparativa de flavonoides en los diferentes órganos de Smilax campestris Griseb. -Smilacaceae. Dominguezia - Vol. 21 (1)17-23.*
- Rugna, A; Gurni, Wagner, M., 2002. *Estudio Variacional de Flavonoles en Ejemplares Masculinos y Femeninos de Smilax campestris Griseb. -Smilacaceae. Acta Farm. Bonaer. 21 119-21.*
- Rugna, A.Z., Gurni, A.A., Wagner, M.L., 2013. *Phenological variations of polyphenols in Smilax campestris (Smilacaceae). Turk. J. Botany 37, 350–354. doi:10.3906/bot-1112-15*
- Salzano, S, Checconi, P, Hanschmann, EM, Lillig, CH, Bowler, LD, Chan, P, et al., 2014. *Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal. Proc Natl Acad Sci U S A 111(33) 12157-12162.*
- Simirgiotis, M.J., Benites, J., Areche, C., Sepu, B., 2015. *Antioxidant capacities and analysis of phenolic compounds in three endemic nolana species by HPLC-PDA-ESI-MS. Molecules 20, 11490–11507. doi:10.3390/molecules200611490*
- Smilacaceae-, G., Rugna, A., Vugin, A., Gurni, A., 2003. *Marcha fitoquímica comparativa entre las hojas y los rizomas de Smilax Comparative phytochemical screening on leaves and rhizoms from Smilax campestris Griseb. – Smilacaceae-19, 25–29.*
- T, Lombardo, Cavaliere V, Costantino SN, Kornblihtt L, Alvarez EM, B.G., 2012. *Synergism between arsenite and proteasome inhibitor MG132 over cell death in myeloid leukaemic cells U937 and the induction of low levels of intracellular superoxide anion. Toxicol Appl Pharmacol.*
- Tao, J, Wei, Y, Hu, T., 2016. *Flavonoids of Polygonum hydropiper L. attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory injury via suppressing phosphorylation in MAPKs pathways. BMC Complement Altern Med 16 25.*
- Tian, L.-W., Zhang, Z., Long, H.-L., Zhang, Y.-J., 2017. *Steroidal Saponins from the Genus Smilax and Their Biological Activities. Nat. Products Bioprospect. 7, 283–298. doi:10.1007/s13659-017-0139-5*
- Vijayalakshmi, A, Ravichandiran, V, Malarkodi, V, Nirmala, S, Jayakumari, S., 2012. *Screening of flavonoid ‘quercetin’ from the rhizome of Smilax china Linn. for anti-psoriatic activity. Asian Pac J Trop Biomed 2(4) 269-275.*
- Walquist, M.J., Stormo, S.K., Jensen, I., Østerud, B., Eilertsen, K., 2017. *Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities in Extracts from Minke Whale (Balaenoptera acutorostrata) Blubber 2017. doi:10.1155/2017/3835851*
- Wang, X, Wang, S, Hu, C, Chen, W, Shen, Y, Wu, X, et al., 2015. *A new pharmacological effect of levornidazole: Inhibition of NLRP3 inflammasome activation. Biochem Pharmacol 97(2) 178-188.*
- Yang, J.H., Lee, E.O., Kim, S.E., Suh, Y.H., Chong, Y.H., 2012. *Norepinephrine differentially modulates the innate inflammatory response provoked by amyloid-β peptide via action at β-adrenoceptors and activation of cAMP/PKA pathway in human THP-1 macrophages. Exp. Neurol. 236, 199–206. doi:10.1016/j.expneurol.2012.05.008*
- Yi, HW, Lu, XM, Fang, F, Wang, J, Xu, Q., 2008. *Astilbin inhibits the adhesion of T lymphocytes via decreasing TNF-alpha and its associated MMP-9 activity and CD44 expression. Int Immunopharmacol 8(10) 1467-1474.*
- Zhao, MH, Jiang, ZT, Liu, T, Li, R., 2014. *Flavonoids in Juglans regia L. leaves and evaluation of in vitro antioxidant activity via intracellular and chemical methods. Sci. 2014 303878.*

Desarrollo de nanopartículas porosas para aplicaciones en nanomedicina

Mitarotonda R ^{1,2}, Tapia ¹³, Giorgi E ¹, De Marzi M¹, Fiszman G³, Desimone M²

¹Laboratorio de Inmunología, Instituto de Ecología y Desarrollo Sustentable (INEDES) CONICET-UNLu, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján, Luján, Buenos Aires, Argentina.

²Cátedra de Química Analítica e Instrumental, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Instituto de la Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA) CONICET-UBA, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

³Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Área de Investigación, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

ÍNDICE

1. Introducción	64
2. Materiales y Metodos.....	65
3-. Resultados	66
4. Discusión.....	79

1. Introducción

El interés en la aplicación de la nanotecnología en medicina ha tomado un gran impulso en los últimos años debido al posible uso en el diagnóstico y/o terapia de algunas enfermedades graves, como el cáncer. El término nanotecnología se define como la manipulación de la materia en una escala atómica, molecular o supramolecular de órdenes inferiores a 100 nanómetros (nm). También se puede considerar como la comprensión y el control de los procesos dentro de estas estructuras con un tamaño entre 1 y 100 nm (Kumar et al., 2015). En esta escala, los nanomateriales tienen propiedades únicas debido a las características intrínsecas relativas a tamaños menores a 1000 nm, es por ello que las propiedades físicas difieren típicamente de las observadas a macroescala (Chen et al., 2017). La aplicación de la nanotecnología implica el empleo de nanovehículos o nanopartículas (NPs) como sistemas de vectorización, protección y liberación controlada de moléculas de interés terapéutico. Estos vectores permitirían mejorar la biodistribución de moléculas frágiles o complejas y favorecer su interacción con tejidos específicos, protegiendo a su vez el tejido sano. Además, esta tecnología puede aplicarse para producir una respuesta inmune sesgada mediante el diseño de NPs que pueden alcanzar preferentemente un subconjunto de células inmunes, ya sea por orientación pasiva o activa, o la aplicación de NPs como adyuvantes que potencien la respuesta dada por un subconjunto de células inmunes específicas. Por las características descritas, la nanotecnología y su aplicación en el diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades, como por ejemplo el cáncer, podría ser una estrategia prominente para las necesidades clínicas actuales. En este sentido, moléculas diagnósticas, fármacos citotóxicos o teragnósticos transportados por NPs podrían alcanzar los tejidos tumorales con mayor facilidad que los mismos administrados de forma libre. Para ello, es necesario diseñar NPs que consigan acumularse específicamente en el sitio tumoral administrando la cantidad de fármaco ideal en el lugar de acción, logrando así un aumento

significativo de la eficacia clínica, junto con una minimización de los problemas de solubilidad, farmacocinéticos, reacciones adversas y resistencias asociadas a los fármacos citostáticos. Por estas razones, el suministro de medicamentos a través de la nanotecnología es uno de los enfoques que mayor impacto sobre la salud podrá generar en los próximos años debido a sus potenciales beneficios (Sah et al., 2018).

En este sentido, los materiales inorgánicos mesoporosos y/o huecos son algunos de los candidatos más recientemente evaluados como plataformas de administración de fármacos. Estas NPs tienen la particularidad de poseer una estructura porosa con cientos de canales vacíos (2-20 nm) donde se pueden alojar moléculas y fármacos aumentando la capacidad de carga y la protección de las mismas frente a las condiciones fisiológicas del cuerpo (McCarthy et al., 2016). De esta manera, sería posible aumentar la biodisponibilidad de los medicamentos y mejorar su eficacia. A la vez que se reduce la concentración y la frecuencia de administración necesaria para conseguir el efecto deseado, obteniendo así tratamientos más efectivos y menos agresivos para los pacientes. Asimismo, cabe destacar la posibilidad de reformular fármacos que no han llegado a la fase clínica por su poca solubilidad o por producir efectos secundarios en lugares no deseados (Slowing et al., 2008).

En particular, los materiales de Sílice, presentan varias características favorables como ser su biocompatibilidad, bioadsorción y la facilidad con la que se pueden modificar las superficies de las partículas lo que puede permitir la integración de varias funciones en las mismas. En este sentido, en el presente trabajo se describe el desarrollo de un protocolo de síntesis para la obtención de NPs de sílice huecas y porosas (HMNPs) aptas para la encapsulación de fármacos y se informa su caracterización físico-química, biológica y su acción en el contexto tumoral.

2. Materiales y Metodos

Síntesis de NPs porosas y huecas: para la obtención de NPs huecas y porosas/mesoporosas (HMNPs) se adaptó la modificación realizada por Chen y colaboradores (2010) del método de Stober, donde se permitió la reacción de tipo sol-gel durante 1 h. Luego, las NPs obtenidas de 80 nm fueron lavadas con agua y etanol y resuspendidas en agua. Por otro lado, se mezclaron CTAC (2 g), tris-(hidroximetil) aminometano (0,02 g) y agua Milli-Q en agitación continua durante 1 h. Posteriormente, se tomaron 10 mL de la solución de NPs obtenidas y se agregó 1 mL de la solución anteriormente nombrada antes de la adición de TEOS. La mezcla se dejó en agitación durante 1 h a 80 °C para permitir la formación de las NPs mesoporosas. Finalmente, se desarrolló un protocolo a partir de las NPs mesoporosas obtenidas para realizar las NPs huecas. Para ello, se disminuyó la temperatura de la mezcla a 50 °C y se le adicionó carbonato de sodio (Na_2CO_3) bajo agitación constante durante 30 min. Luego, con el objetivo de remover el CTAC, se adicionó a la mezcla una solución de NaCl 1 % en metanol a TA empleando una membrana de diálisis, este paso se repitió durante 3 días seguidos. Por último, la muestra fue calcinada durante 5 h a 600 °C.

Caracterización de NPs: todas las poblaciones de NPs obtenidas fueron caracterizadas mediante DLS, potencial zeta (ζ), TEM y se analizó la estabilidad del material mediante la determinación de la liberación de silicio.

Cultivos primarios: En el presente estudio se empleó sangre periférica obtenida por venopunción de individuos humanos sanos bajo consentimiento informado. Para la obtención de la misma se utilizaron agujas de calibre AA y la sangre se depositó en tubos con anticoagulantes. Los anticoagulantes mayormente utilizados fueron citrato de sodio, EOTA-K3 o heparina, según los componentes sanguíneos a aislar.

Cultivos celulares: Se utilizaron las líneas celulares derivadas de adenocarcinomas de mama humano BT474 que sobre expresan HER2+, la línea MCF7 con baja expresión de HER2 y MDA-MB231 que no expresa HER2 todas provenientes de la Asociación Americana de Cultivo de Tejidos (ATCC). Todas las líneas son adherentes y se cultivaron en medio RPMI 1640, suplementado con 2 mM L-glutamina, 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina y 10% de suero fetal bovino, a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de dióxido de carbono (CO_2). Los pasajes sucesivos se realizaron por tratamiento de las monocapas subconfluentes con solución de tripsina.

Posteriormente, los esferoides de células BT474 fueron realizados mediante la técnica de gota colgante. Brevemente, las células tumorales se sembraron en gotas de 20 μl en medio completo conteniendo 10.000 células cada una. Las gotas se colocaron en la tapa de placas de 96 pocillos, se invirtieron sobre la placa conteniendo el medio de cultivo y se incubaron por 72 h como gotas pendientes a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 .

Transcurrido ese período de tiempo, los esferoides formados fueron traspasados individualmente a pocillos de la misma placa, recubiertos por 200 μl de agar 1,5%, en 300 μl de medio completo. El 50% del medio de cultivo se renovó cada 2-3 días.

3-. Resultados

Síntesis y caracterización de NPs huecas y porosas: Se sintetizaron NPs huecas y porosas mediante un protocolo de síntesis a partir de la formación de las micelas y el crecimiento de la red tridimensional descrito por Stober. En esta etapa de hidrólisis-polimerización se formuló el tamaño de las partículas primarias. Luego, se agregó TEOS y la materia orgánica para la etapa de nucleación-crecimiento. Por último, el molde laxo del centro de la NPs se retiró mediante oxidación como se describe en el esquema de la Figura 1.

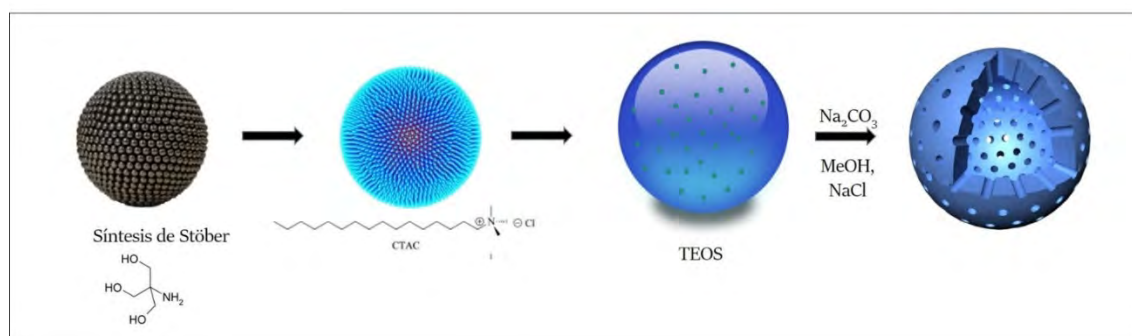


Figura 1.- Esquema representativo del protocolo de síntesis para obtener NPs huecas y porosas (HMNPs). Las NPs fueron sintetizadas a partir del protocolo descrito por Stober, luego se adicionó una capa de materia orgánica y una nueva capa de TEOS. Posteriormente se produjo su oxidación y por último, un ciclo de cacinación.

Las NPs obtenidas fueron caracterizadas mediante DLS observándose un diámetro hidrodinámico de 94 ± 12 nm. Asimismo, la muestra se estudió mediante TEM donde se obtuvieron diámetros similares al descritos por DLS, lo que indica que se trata de una población homogénea con poca dispersión. Además, como puede observarse en las microfotografías electrónicas, el material presentó un interior hueco y un *shell* poroso (Figura 2).

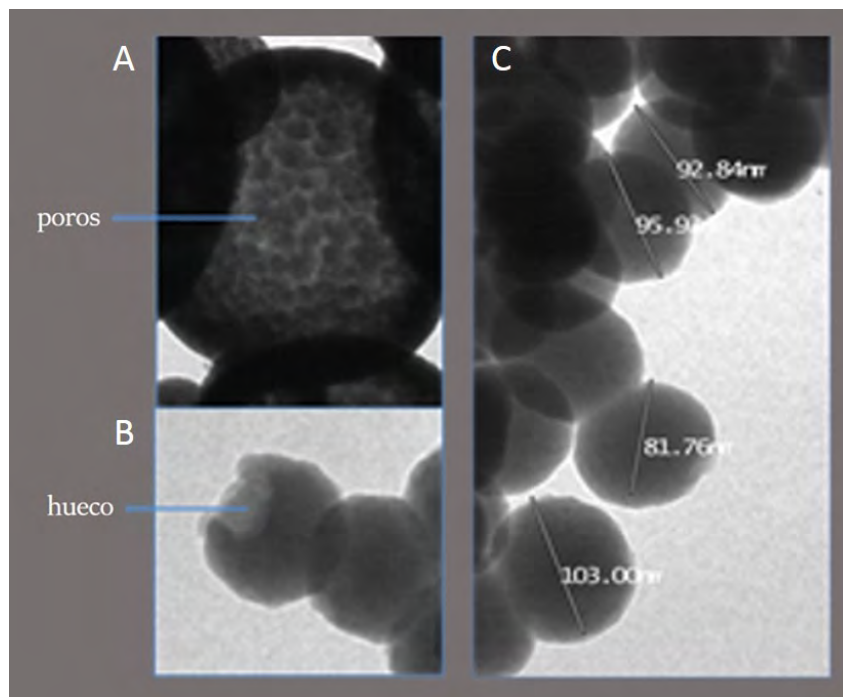


Figura 2.- Microfotografía electrónica del material obtenido mediante el protocolo de síntesis para la obtención de NPs huecas y porosas. En la imagen (A) se observa la estructura porosa del shell y las irregularidades del mismo; en (B) se observa la presencia de huecos internos en las NPs, y el vacío tridimensional que se forma.

Por otra parte, las NPs obtenidas se estudiaron mediante FTIR para descartar la presencia de enlaces de C-C o C-H provenientes de la materia orgánica. En la Figura 3A se observa un espectro de bandas de NPs no porosas obtenidas mediante la síntesis de Stober y en la Figura 3B el espectro obtenido con el material sintetizado mediante el protocolo descrito. El espectro de bandas sólo proveyó las señales características a 1088 cm^{-1} y 802 cm^{-1} correspondientes a los estiramientos vibracionales de Si-O-Si y Si-O.

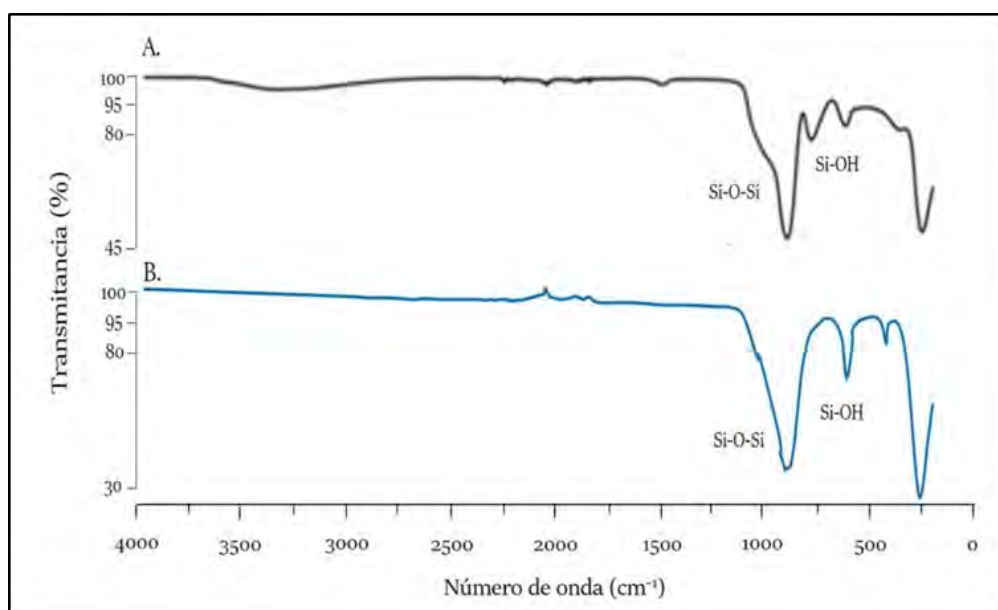


Figura 3.- Espectro de infrarrojo por transformada de Fourier de HMNPs. Espectro de bandas típico de NPs de SiO_2 obtenidas mediante el método descrito por Stöber (A). Espectro de bandas de HMNPs (B).

Debido a que las NPs huecas y porosas fueron diseñadas para transportar fármacos o moléculas terapéuticas es necesario que las mismas liberen su carga de forma gradual. En este sentido y con el fin de estudiar si las HMNPs pueden sufrir degradación, las mismas fueron expuestas a soluciones acuosas ajustadas a diferentes pHs manteniendo la temperatura fisiológica normal (36,5-37 °C) durante 4 h. Luego de la incubación se midió la concentración de silicio libre, como una medida indirecta de degradación de las NPs. Como se puede observar en la **Figura 4** la degradación ocurre mayoritariamente a pHs neutros y alcalinos. La porosidad aportaría una mayor superficie para la erosión. Esta degradación podría favorecer la liberación controlada de fármacos en los microambientes

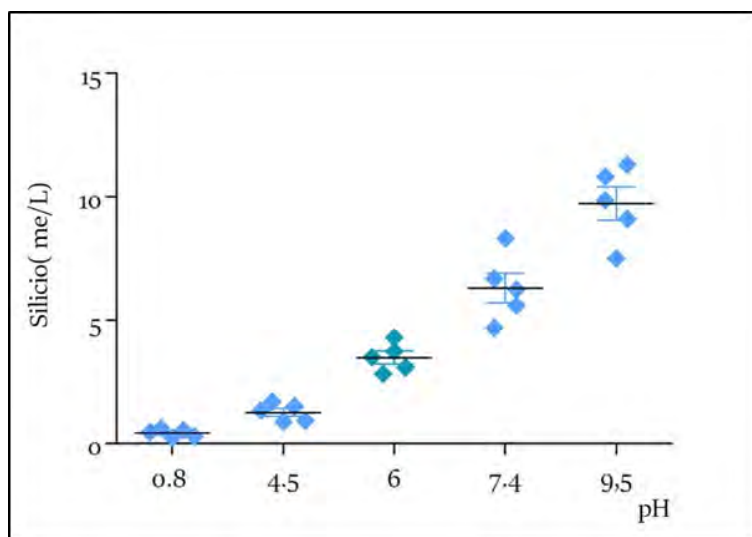


Figura 4.- Determinación de silicio libre como medida indirecta de la erosión que pueden sufrir las HMNPs. Se incubaron 10 mg de muestra a 37°C en las soluciones estabilizadas a diferentes pH. Luego del procesamiento de las muestras se determinó la absorbancia a 650 nm. Los resultados obtenidos fueron interpolados en una curva patrón con sulfito de sodio

Evaluación de la biocompatibilidad: Para evaluar la biocompatibilidad de las HMNPs se incubaron glóbulos rojos en presencia de estas NPs y se determinó el daño ocasionado a las membranas en forma indirecta mediante la determinación de la liberación de hemoglobina. Las HMNPs no provocaron más de un 7-10 % de hemólisis con tres concentraciones estudiadas (5000, 500 y 50 mg/m²). Según lo descripto, la rugosidad de las NPs podría aumentar el contacto y por ende dañar las membranas celulares, sin embargo, el método de síntesis empleado, disminuye la presencia de cargas sobre la superficie de las NPs mediado por las uniones Si-O-Si, lo cual evitaría la despolarización de las membranas celulares.

Por otra parte, se evaluó la adsorción de proteínas sobre la superficie de las NPs, este estudio permite equiparar lo que ocurriría con las NPs al ingresar al torrente sanguíneo ya que la superficie rugosa y porosa proporciona una gran superficie de contacto. Para corroborarlo, se incubó una solución de BSA (1 mg/mL) con diferentes concentraciones de NPs. La población de HMNPs produjo isothermas de adsorción de forma cóncava que ajustaron con los modelos de Langmuir y Freundlich obteniéndose concentraciones máximas comprendidas

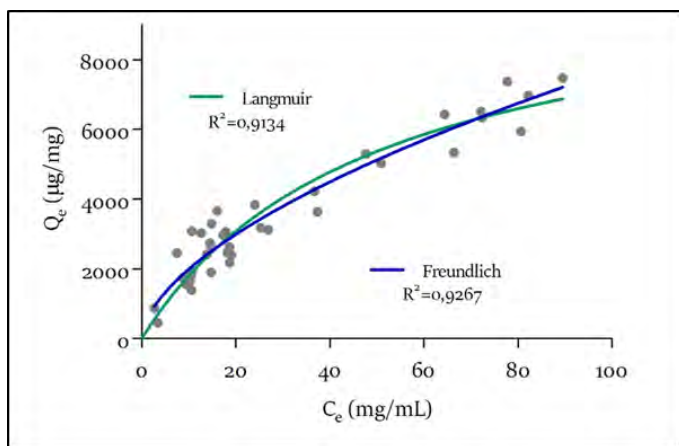


Figura 5.- Determinación de isothermas de adsorción de proteína BSA. Las muestras fueron incubadas con HMNPs durante 6 h. Luego se centrifugaron y se determinó la concentración de proteínas adsorbidas sobre la superficie de las mismas.

entre 3,9-6,12 mg de proteínas/mg de HMNPs (**Figura 5**). Los materiales de sílice expuestos a altas temperaturas sufren la condensación de grupos silanoles (SiOH) para dar lugar a uniones Si-O-Si, esto puede ocasionar que disminuya la cantidad de grupos capaces de interactuar con las proteínas.

Eficacia de encapsulación y liberación de fármacos en HMNPs: Se evaluó si un fármaco puede ser encapsulado en HMNPs, para lo cual se realizaron ensayos de encapsulación mediante la incorporación de doxorubicina (DOX) en HMNPs mediante agitación constante a 500 rpm y agitación por ultrasonido.

Como se observa en la Figura 6 la encapsulación de DOX mediante agitación logró un 32 % de eficiencia mientras que mediante sonicación se obtuvo un 89 % de encapsulación.

Esto demostró que el fármaco pudo ser incorporado siendo la agitación por ultrasonido la que presentó mayor eficiencia de encapsulación. En la **Tabla 1** se muestra la concentración del fármaco y la eficacia de encapsulación.

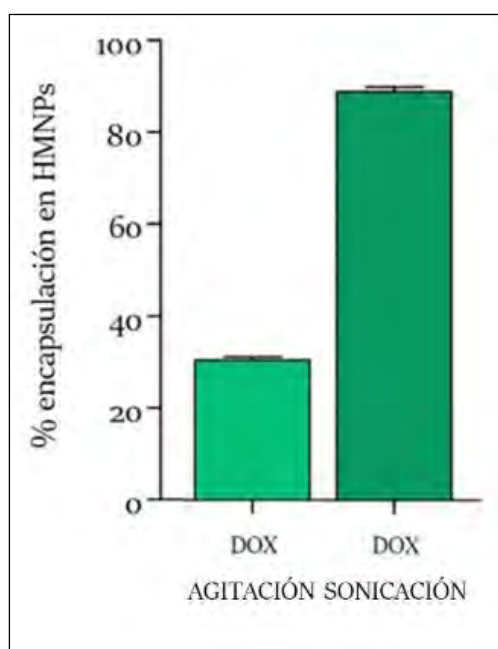


Figura 6.- Eficiencia de encapsulación de fármacos en HMNPs mediante agitación constante a 500 rpm o sonicación por ultrasonido. Las barras verdes corresponden al porcentaje de encapsulación de DOX. El 100 % de encapsulación corresponde a 20 µg DOX en 100 mg HMNPs; DOX, doxorubicina.

Tabla 1.- Eficacia de encapsulación de DOX en HMNPs. La cantidad teórica de encapsulación de DOX es de 20 µg/100 µg de HMNPs.

Tratamiento de HMNPs	µg DOX/100 µg de HMNPs	Eficacia de encapsulación (%)
Agitación constante	6 ± 0.4	32
Sonicación	17 ± 0.8	89

Teniendo en cuenta que mediante sonicación se logra un mayor porcentaje de encapsulación del fármaco y que esta encapsulación puede favorecer su transporte y su posterior deposición en el sitio tumoral, se procedió a evaluar el perfil de liberación del fármaco en función del tiempo a 37°C con agitación constante o de forma estática. Es importante resaltar que debido a la alta velocidad de circulación de la sangre dentro del organismo,

un nanomaterial podría tardar menos de 3 min en alojarse en el microambiente tumoral mediante el efecto EPR, por lo tanto es importante estudiar la liberación de los fármacos en agitación constante (recreando las condiciones de circulación) y de forma estática, similares a las que se esperan en el microambiente tumoral. Además, esta liberación puede deberse tanto a la difusión pasiva propia de los fármacos como a la erosión/degradación del nanomaterial.

En la **Figura 7**, se representa la liberación del fármaco obtenido durante 40 h. Como puede observarse los perfiles de liberación de DOX en HMNPs fue del 68 % y del 65 % en agitación constante y en estado estático al cabo de 35 h, respectivamente.

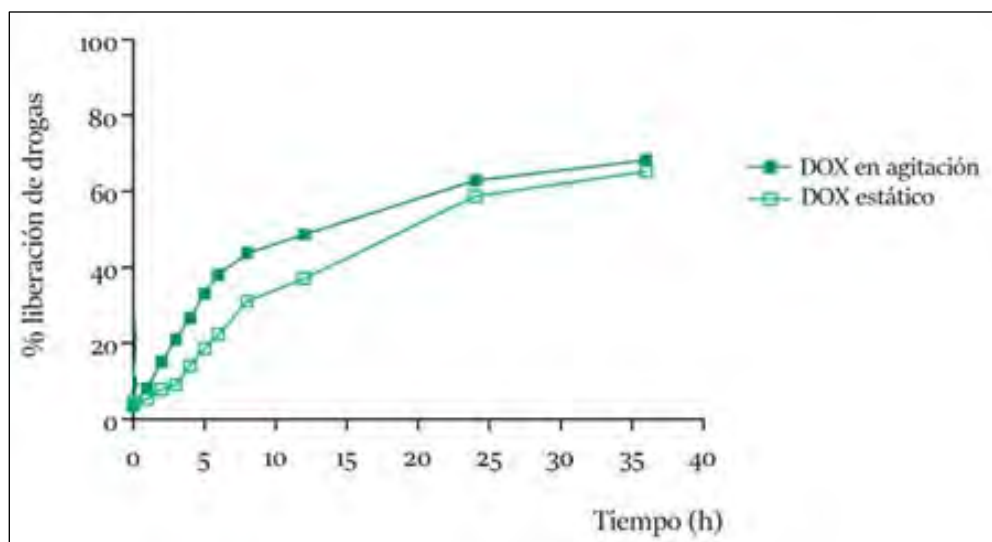


Figura 7.- Liberación de fármacos in vitro desde HMNPs. Los resultados expresan el porcentaje de liberación del fármaco en función del tiempo. Las líneas verdes representan los tratamientos para HMNPs-DOX. La concentración inicial de encapsulación fue de 17 μg DOX/100 μg HMNPs.

La cinética de liberación de DOX proveyó curvas sigmoideas tanto en agitación o de forma estática, observándose una mayor liberación de los fármacos en las primeras horas. Por ello, se prosiguió a determinar la velocidad de liberación de DOX desde las NPs en las distintas etapas de la cinética mediante el ajuste de los datos experimentales por regresión lineal y de la correspondiente pendiente se obtuvo la velocidad de liberación. La Tabla 2 muestra la velocidad de las distintas etapas de liberación desde las HMNPs para el fármaco.

Tabla 2.- Etapas de la cinética de liberación in vitro de HMNPs-DOX en agitación o en forma estática. La concentración inicial de encapsulación fue de 17 μg DOX/100 μg HMNPs obtenidas por ultrasonido. K representa la velocidad de liberación y r^2 el coeficiente de correlación. Agit, agitación; est, Estático

	Etapas de liberación	K ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	r^2
HMNPs-DOX _{agi}	0 a 1 h	0,85	0,9929
	1 a 3 h	1,05	0,9838
	3 a 8 h	0,7668	0,9618
	8 a 35 h	0,1694	0,9527
	35 a 72 h	0,1289	0,9707
HMNPs-DOX _{est}	0 a 1 h	0,25	0,9843
	1 a 2 h	0,5515	0,9676
	2 a 3 h	0,1685	0,9765
	3 a 8 h	0,7654	0,9952
	8 a 35 h	0,221	0,9585
	35 a 72 h	0,0689	0,7785

En la Tabla 2 se pueden distinguir 5 etapas de liberación para las HMNPs expuestas a agitación constante y 6 etapas en las que han quedado estáticas. En el primero de los casos, se puede distinguir que las mayores velocidades de liberación fueron obtenidas en las primeras 3 etapas, siendo la primera hora donde se produce la mayor liberación con una $K_{\text{HMNOP-DOX}} = 1,05 \mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{h}$. Sin embargo, las NPs estáticas produjeron la mayor liberación en la tercera etapa durante 5 h con un $K_{\text{HMNOP-DOX}} = 0,7654 \mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{h}$.

Con el fin de comprender si la liberación del fármaco es debido a la difusión pasiva de DOX o por erosión del material, se aplicaron dos modelos matemáticos, Higuchi y Korsmeyer-Peppas. El modelo de Higuchi nos brinda información sobre la velocidad de liberación controlada de una droga (K) donde si $K \leq 0,5$ el mecanismo de difusión es el que controla la liberación y la masa de fármaco liberado está relacionada con el tiempo; mientras que si $K > 0,5$ el comportamiento de la droga difiere de la propuesta por Higuchi. Por otro lado, el modelo de Korsmeyer-Peppas intenta explicar los mecanismos de liberación de fármacos donde se presenta erosión y/o disolución de la matriz. El valor del exponente n brinda información sobre la cinética de liberación del fármaco y su mecanismo de liberación; por lo que si n es cercano o igual a 0,43, la liberación del fármaco tiene lugar a través de un fenómeno de difusión de tipo Fickiano, si n toma valores entre 0,43 y 0,85 indica que la liberación del fármaco es debida a un mecanismo de difusión no Fickiano o anómalo y cuando n es igual o mayor a 0,85, el mecanismo de liberación del fármaco depende del proceso de relajación del material (Ritger & Peppas, 1987 a y b). En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos para cada complejo NPs-droga.

Tabla 3.- Modelos matemáticos de liberación in vitro de DOX. K corresponde a la constante cinética y n representa el exponente de difusión. Se consideraron r^2 significativos entre 0,920-0,999. El modelo Korsmeyer-Peppas se aplicó hasta las 36 h ya que el sistema luego de transcurrido ese tiempo no cumplía con una de las premisas del modelo ($Mt/M_\infty < 0,6$).

	Modelo de Higuchi		Modelo de Korsmeyer-Peppas	
	r^2	K ($\text{h}^{-1/2}$)	r^2	N
HMNPs-DOX _{agit}	0,9609	0,1239	0,929	0,4233
HMNPs-DOX _{est}	0,9627	0,1248	0,971	0,7790

Los datos para HMNPs-DOX agitación fueron directamente proporcionales a la raíz cuadrada del tiempo ($t^{1/2}$) denotado por las $K \leq 0,5$ y n cercanos a 0,43 con lo cual el mecanismo de liberación es principalmente la difusión pasiva. Por último, para HMNPs-DOX estáticas Higuchi describe un proceso con $K \approx 0,5$ en cambio Korsmeyer-Peppas refiere un $n=0,7790$ lo cual denota un comportamiento anómalo de liberación seguramente debido a la erosión del material. En conclusión, por los parámetros observados podríamos indicar que el proceso de difusión pasivo de la droga es el mecanismo principal de liberación siendo esperable debido a la porosidad de la malla (*Shell*), mientras que la lenta erosión del material y los procesos de adsorción-desorción sobre la superficie de las NPs contribuyen levemente a la liberación del fármaco en las primeras horas.

Eficacia de HMNPs-DOX en línea celular tumoral: Para evaluar la eficiencia de HMNP-DOX como NPs terapéutica se determinó la actividad metabólica relativa en células MCF-7 en presencia de las mismas. Para ello, se utilizaron diferentes concentraciones de encapsulación de DOX en HMNPs teniendo en cuenta que clínicamente se administran 50 mg/m^2 de fármaco libre o liposomal en pacientes en tratamiento frente a diversos tipos de cáncer.

En la Figura 8, se muestra el porcentaje de actividad metabólica relativa como medida inversa a la toxicidad de HMNPs-DOX para las diferentes concentraciones de DOX. Como puede observarse, las células tratadas con HMNPs, HMNPs-DOX ($12,5 \text{ mg/m}^2$) y DOX libre ($12,5 \text{ mg/m}^2$) no disminuyeron la viabilidad celular con respecto a los controles. Sin embargo, las células tratadas con DOX libre o HMNPs-DOX a partir de 25 mg/m^2 provocaron un descenso de la viabilidad (menores a 72 %) dependiente de la concentración. Además, entre las células tratadas con 25 mg/m^2 de fármaco libre o encapsulado no se observaron diferencias significativas, mientras que ésta diferencia si se evidenció a mayores concentraciones, siendo de 17 % para 50 mg/m^2 y de 9,2 % para 100 mg/m^2 entre el fármaco libre y encapsulado. Este efecto puede corresponder a que la difusión del fármaco desde las NPs sucede sobre el cultivo celular mientras que dicha molécula libre se encuentra en solución pudiendo no estar directamente en contacto con las células.

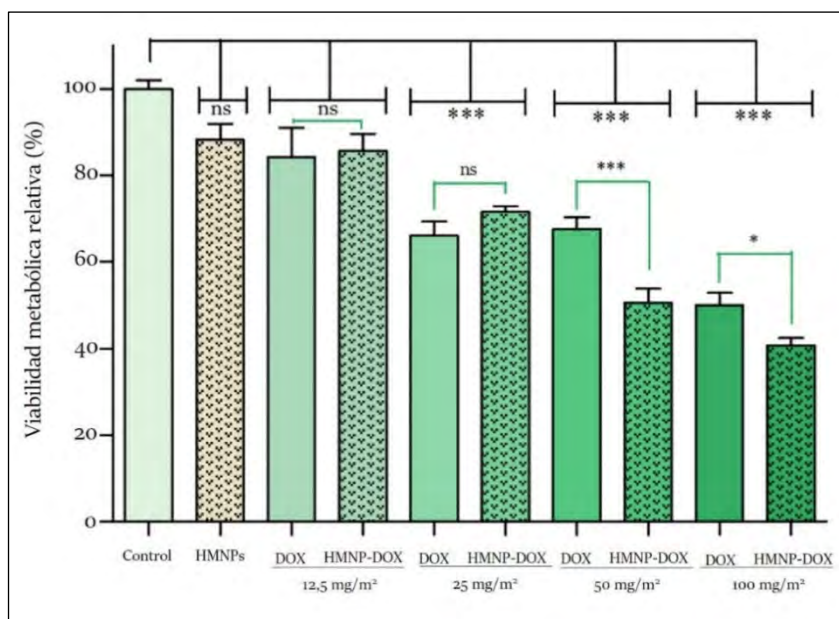


Figura 8.- Viabilidad metabólica relativa de células MCF-7 tratadas con HMNPs-DOX o DOX libre. Las células fueron tratadas durante 24 h y se determinó la viabilidad metabólica relativa mediante el ensayo colorimétrico de MTI tomando el 100 % de viabilidad a las células sin tratar. Los resultados representan el porcentaje de la media \pm SD de los experimentos por triplicado, con 3 ensayos independientes* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Evaluación de HMNPs como nanopartícula inmunoterapéutica: Para mejorar el rendimiento de las NPs terapéuticas se han diseñado estrategias de direccionamiento activo utilizando ligandos célula-específicos conjugados en la superficie de las mismas. En particular, en el presente trabajo se adsorbió el anticuerpo monoclonal Trastuzumab, el cual podría dar lugar a una alta especificidad y afinidad por células tumorales que sobreexpresan HER2.

Para optimizar la concentración de anticuerpos (Acs) necesaria para estabilizar la suspensión de NPs sin provocar su agregación se determinó la concentración mínima mediante un ensayo de floculación. Con ello, se logró la estabilización de los complejos formados y establecer la concentración mínima de TZ requerida para evitar el exceso de moléculas adsorbidas sobre la superficie de las NPs, disminuyendo el costo de producción y los fenómenos de saturación que podrían generar impedimentos estéricos y pérdida de la funcionalidad del conjugado. La concentración mínima de TZ para la estabilización del complejo resultó ser 0,2 mg

TZ/mg HMNPs, la adsorción de TZ sobre la superficie de HMNPs se evidenció mediante TEM. Como puede verse en la **Figura 9**, la superficie de las NPs se encuentra tapizada con Aes TZ formando una corona de $8 \pm 1,3$ nm. La formación de los complejos se caracterizó mediante FTIR. En la **Figura 10** se muestran los espectros correspondientes a HMNPs y TZ-HMNPs. En la **Figura 10 A** se observa el espectro obtenido de las HMNPs desnudas, mientras que en la **Figura 10 B** se observan las bandas correspondientes a los grupos alquilo, que se confirma por las vibraciones de estiramiento de C-H débiles a 500 cm^{-1} . Otras señales como los estiramientos de NH, OH y C-O se relacionan con las proteínas y se solapan con la banda de silanoles después de la conjugación entre TZ y HMNPs. También se observan las bandas de tensión de 3350 y 3180 cm^{-1} , las bandas de flexión N-H entre $1640 - 1550\text{ cm}^{-1}$, y los picos de tensión C=O ($1680 - 1630\text{ cm}^{-1}$) correspondientes a los grupos amidas I, II, III (d) presentes en los Acs.

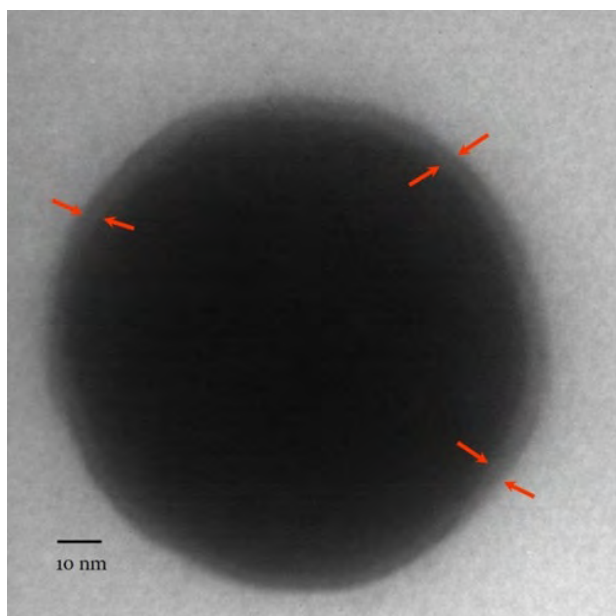


Figura 9.- Microfotografía del complejo TZ-HMNPs. La presencia de la corona de Aes produce el oscurecimiento del centro de la partícula (250000X)

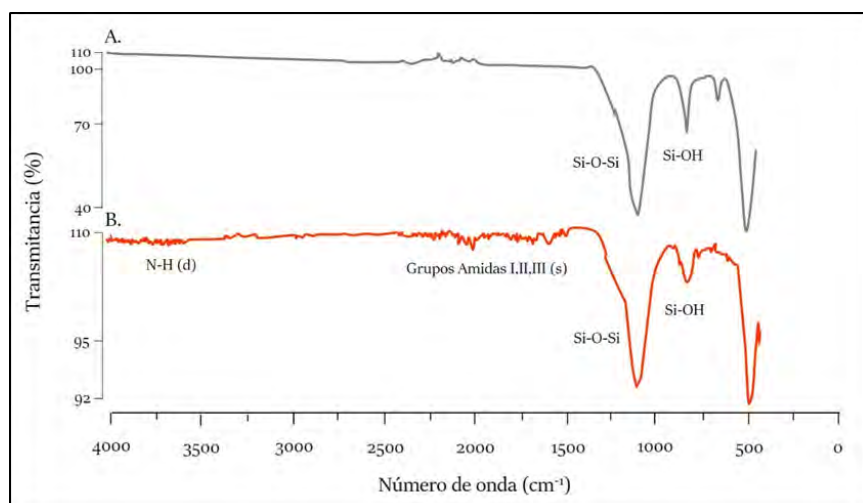


Figura 10.- Espectros de infrarrojos por transformada de Fourier de TZ-HMNPs. En los gráficos se describen las bandas y picos característicos para las NPs HMNPs (A) y para los complejos TZ-HMNPs (B).

Evaluación de TZ-HMNPs en líneas tumorales.

Estudios de interacción entre TZ-HMNPs y el receptor HER2

Para demostrar la interacción del complejo TZ-HMNPs con el receptor HER2 se realizó un ensayo de inmunoprecipitación entre el homogenato de células BT-474 que sobreexpresan HER2 y el complejo TZ-HMNPs. En la **Figura 11** se pueden observar los resultados obtenidos con las muestras de NPs expuestas al homogenato y analizadas por SDS-PAGE así como los resultados obtenidos por inmunoblotting luego de incubar la membrana con un Ac específico anti-HER2.

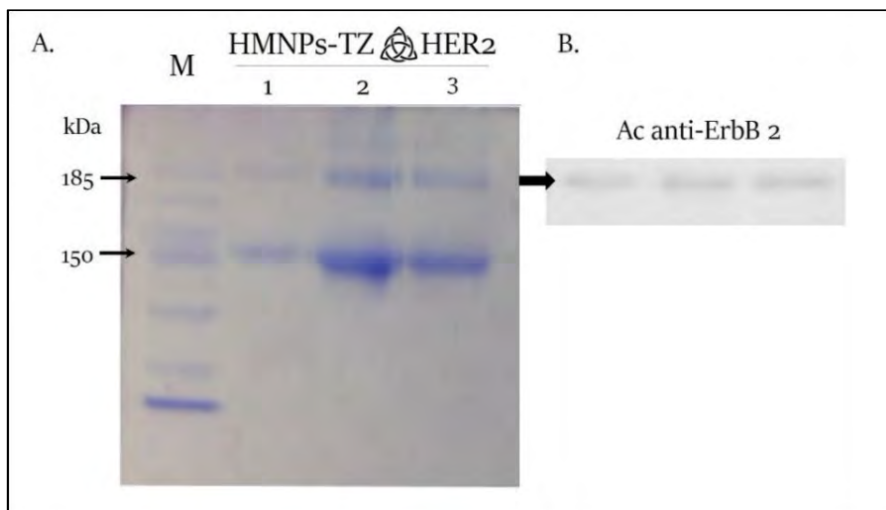
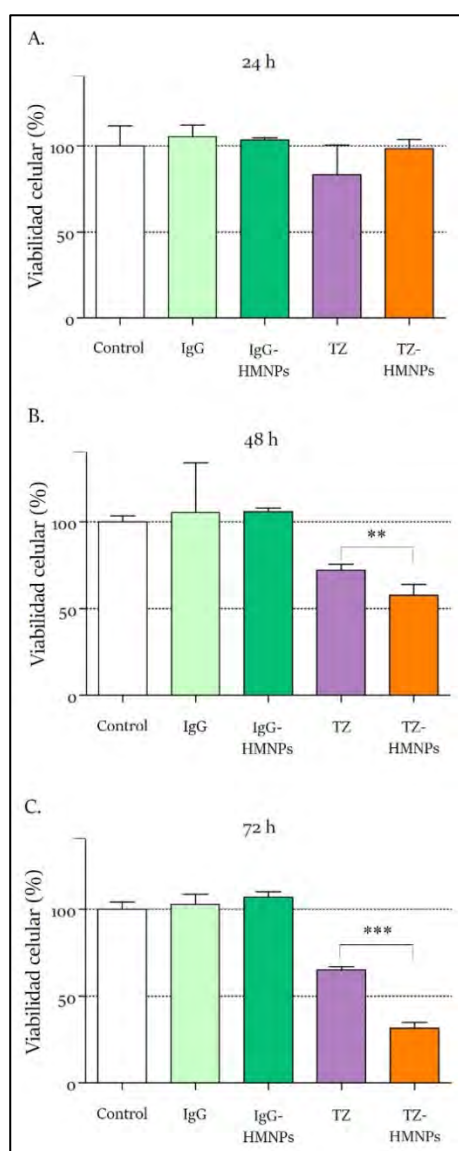


Figura 11.-Especificidad de unión entre TZ-HMNPs y HER2. Corrida electroforética en gel de poliacrilamida 12 % de las muestras obtenidas por inmunoprecipitación de homogenatos de células BT-474 que sobreexpresan HER2 con TZ-HMNPs (A). Inmunotransferencia realizada con Aes anti-ErbB2 (B). M, marcador de peso molecular; 1, 2, 3 muestras tratadas con diferente masa de TZ-HMNPs.

En la imagen se visualiza la presencia de dos bandas correspondientes a 185 y 150 kDa que pertenecerían al receptor HER2 y el Ac Trastuzumab, respectivamente. Esto se corroboró mediante inmunotransferencia empleando los Acs anti-ErbB2. De esta forma logramos visualizar sobre la membrana la banda de 185 kDa correspondiente al receptor, lo que indicaría que el complejo TZ-HMNPs posee especificidad por el mismo.

Efecto del tratamiento con TZ-HMNPs sobre líneas tumorales

El uso de cultivos celulares in vitro es crítico para el estudio de NPs terapéuticas, así como para el desarrollo y la rápida identificación de nuevos fármacos ya que, a diferencia de los modelos tumorales in vivo, permite realizar las evaluaciones en un ambiente controlado. Con el fin de analizar los mecanismos de acción de TZ-HMNPs se evaluó su efecto sobre las células BT474 que sobre-expresan el receptor HER2. Para ello, se estudió la viabilidad de las células en monocapas durante 3 días a una dosis correspondiente a 500 mg/m² y como controles se utilizaron IgG no específica para HER2 y el complejo formado por adsorción de IgG en HMNPs (IgG-HMNPs). Las HMNPs desnudas fueron evaluadas previamente a diferentes dosis y tiempos de incubación y no se observaron cambios en la actividad metabólica de las células.



La **Figura 12** muestra la viabilidad de las células tratadas con el complejo TZ-HMNPs durante 24, 48 y 72 h. Tanto el Ac TZ como el complejo TZ-HMNPs producen una disminución de la viabilidad celular luego de las 48 h, efecto que se mantiene a las 72 h. Además, se pueden observar diferencias significativas entre en el número de células vivas presentes en los cultivos tratados con TZ y aquellos tratados con el complejo. Las máximas diferencias entre ambos se observaron a las 72 h. Por otra parte, las células tratadas con IgG y el complejo IgG-HMNPs no disminuyeron en forma significativa la viabilidad de estas células. Por lo tanto, se puede suponer que la acción del complejo TZ-HMNPs en las células BT-474 depende exclusivamente de la acción del Ac TZ adsorbido en la superficie de HMNPs.

Figura 12.- Viabilidad de las células BT-474 tratadas con TZ-HMNPs durante 24 h (A), 48 h (B) y 72 h (C). Las barras de color verde representan las células tratadas con IgG y el complejo IgG-HMNPs, la barra violeta corresponde a TZ y la barra naranja al complejo TZ-HMNPs. Los resultados representan la media \pm SD de los experimentos por quintuplicado, con 3 ensayos independientes * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Luego, se analizó el efecto biológico de TZ-HMNPs en células MDA-MB231 y MCF-7 cultivadas en monocapas luego de 72 h. Las células MDA-MB 231 expresan HER2 en concentraciones menores a las normales mientras que MCF-7 lo expresan basalmente, por lo cual se esperaba que el Ac TZ no tenga alto efecto citotóxico. Se evaluó la viabilidad celular de las células MDA-MB 231 en presencia del complejo TZ-HMNPs. Como puede observarse en la **figura 13** no se observó efecto citotóxico con las dosis de 500 y 5000 mg/m².

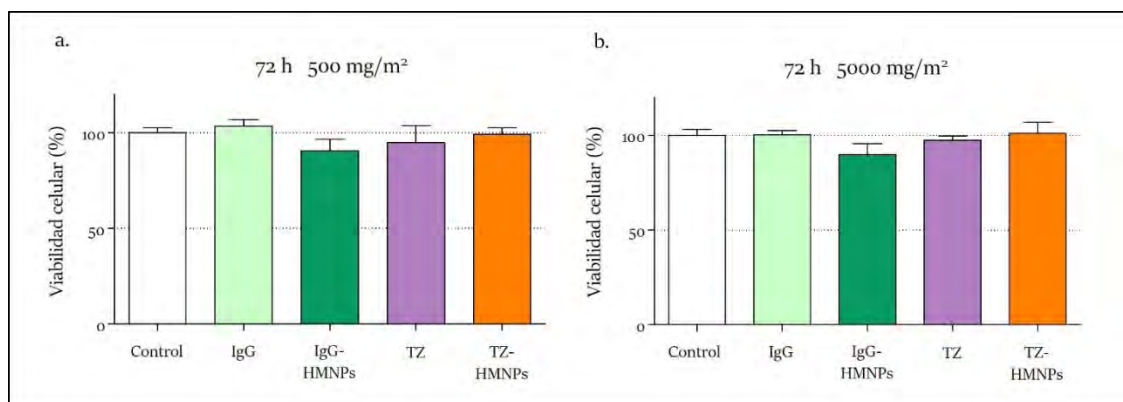


Figura 13.- Viabilidad celular de la línea MDA-MB 231 tratadas con TZ-HMNPs durante 72 h, con una dosis de 500 mg/m². Las barras de color verde representan las células tratadas con IgG y el complejo IgG-HMNPs, la barra violeta corresponde a TZ y la barra naranja al complejo TZ-HMNPs. Los resultados representan la media± SD de los experimentos por quintuplicado, con 3 ensayos independientes, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

Posteriormente, se estudió la viabilidad de las células MCF-7 en presencia de TZ-HMNPs con las dosis de 500 mg/m² (**Figura 14A**) y 5000 mg/m² (**Figura 14B**), en este segundo caso las células tratadas con TZ y el complejo TZ-HMNPs disminuyeron su viabilidad pero no en forma significativa. Este resultado se debería a que estas células expresan el receptor HER2 en concentraciones normales, por lo tanto son sensibles a TZ pero en altas concentraciones. Las células tratadas con IgG e IgG-HMNPs no mostraron diferencias significativas con el control celular.

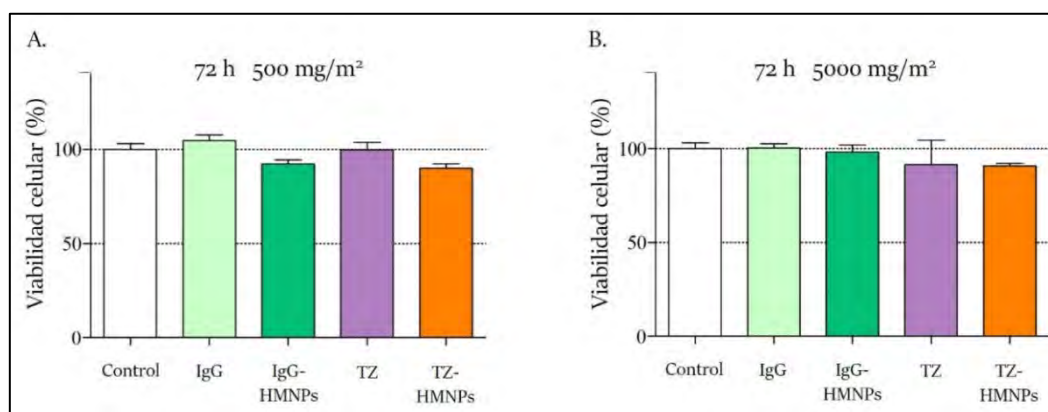


Figura 14.- Viabilidad de la línea celular MCF-7. Las células fueron tratadas con TZ-HMNPs durante 72 h, con una dosis usada en clínica de 500 mg/m² (A) o con una dosis alta de 5000 mg/m² (B). Los resultados representan la media± SO de los experimentos por quintuplicado, con 3 ensayos independientes. No se observaron diferencias significativas.

Evaluación de TZ-HMNPs en una línea celular resistente al tratamiento con Trastuzumab. Como explicáramos previamente, el tratamiento con TZ puede inducir la aparición de tumores resistentes al fármaco. Por esta razón, se evaluó la acción de TZ-HMNPs sobre la línea celular BT-474 MR que sobre-expresa HER2 y no es sensible al tratamiento con TZ. Observamos que las células BT-474 MR respondieron al tratamiento con el complejo TZ-HMNPs disminuyendo la viabilidad celular en más de un 80 %.(Figura 15). Sin embargo, las células tratadas con el complejo IgG-HMNPs mostraron un decremento de la viabilidad del 36 %. Los tratamientos con los Ac IgG y TZ fueron significativamente similares a los controles de células sin trata.

Evaluación de TZ-HMNPs en un modelo 3D de cáncer de mama

Cuando se realiza el screening de nuevos fármacos, los efectos citotóxicos observados sobre las células en monocapas son difícilmente reproducidos in vivo, debido a la incapacidad de estos cultivos bidimensionales (2D) de representar las restricciones de transporte asociadas con el microambiente tumoral tridimensional. Es por ello que se evaluó la acción del complejo TZ-HMNPs en esferoides mamarios obtenidos a partir de la línea celular BT-474. En la Figura 16 se observan los tamaños medidos de los esferoides durante 7 días posteriores al tratamiento.

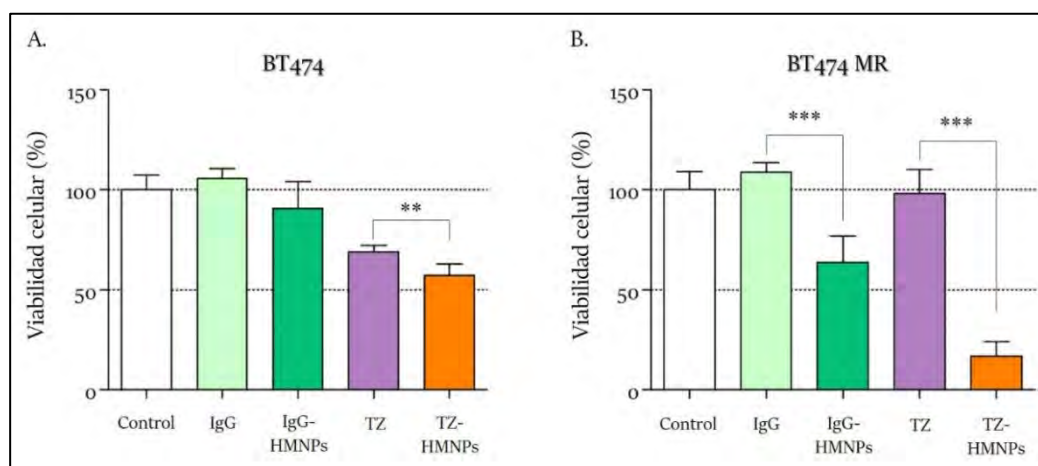


Figura 15.- Viabilidad de células BT474 (A) y BT474 MR (B) tratadas con TZ-HMNPs. Las células fueron incubadas durante 72 h, con una dosis de 500 mg/m². Las barras de color verde representan las células tratadas con IgG y el complejo IgG-HMNPs, la barra violeta corresponde a TZ y la barra naranja al complejo TZ-HMNPs. Los resultados representan la media ± SD de los experimentos por quintuplicado, con 3 ensayos independientes, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

Los esferoides tratados con TZ y TZ-HMNPs redujeron significativamente su tamaño con respecto a los controles. Por otra parte, los tumores tratados con TZ-HMNPs, disminuyeron su tamaño luego de 3 días post-tratamiento mostrando una cinética más efectiva que el TZ solo.

Finalmente; se evaluó la presencia del complejo en el interior de los esferoides, para lo que se realizaron cortes histológicos de 0,5 µm y se observaron mediante un microscopio óptico de alta resolución.

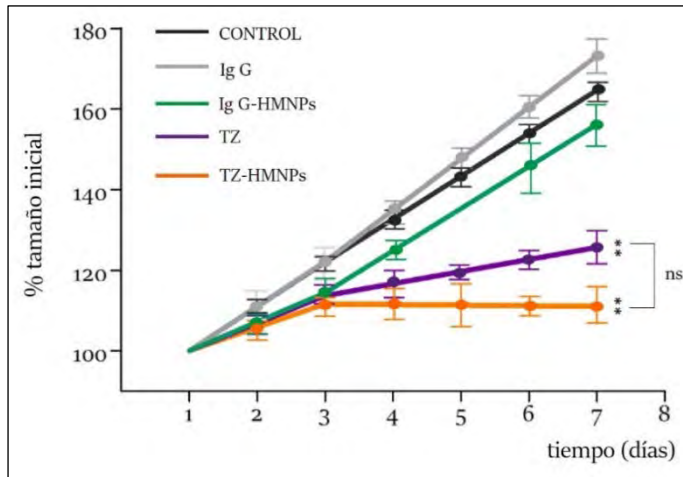


Figura 16 .-Cinética de crecimiento de esferoides BT 474 tratados con TZ-HMNPs. Cada punto de la curva expresa el porcentaje de cambio de volumen respecto al volumen inicial previo al tratamiento (considerado 100 %) y representa media \pm SD (n=6), con 3 ensayos independientes, ** p < 0.01.

La **Figura 17 A** muestra la imagen obtenida de un esferoide observado a 40X, en la **Figura 17B** se observa un corte histológico (40X) y en la **Figura 17C** la ampliación de esa zona. Todas las imágenes obtenidas a partir de los esferoides tratados con TZ-HMNPs presentaron iridiscencia en los bordes externos de los esferoides y en los pequeños huecos de la capa de células externas que rodea el centro necrótico/apoptótico del esferoide. Para corroborar que la iridiscencia se debiera a la presencia de TZ-HMNPs las mismas se observaron a 200X, corroborándose la presencia de cúmulos de NPs lo que produciría el efecto iridiscente por refractancia de la luz sobre las mismas tanto en el interior de los esferoides como sobre el portaobjeto.

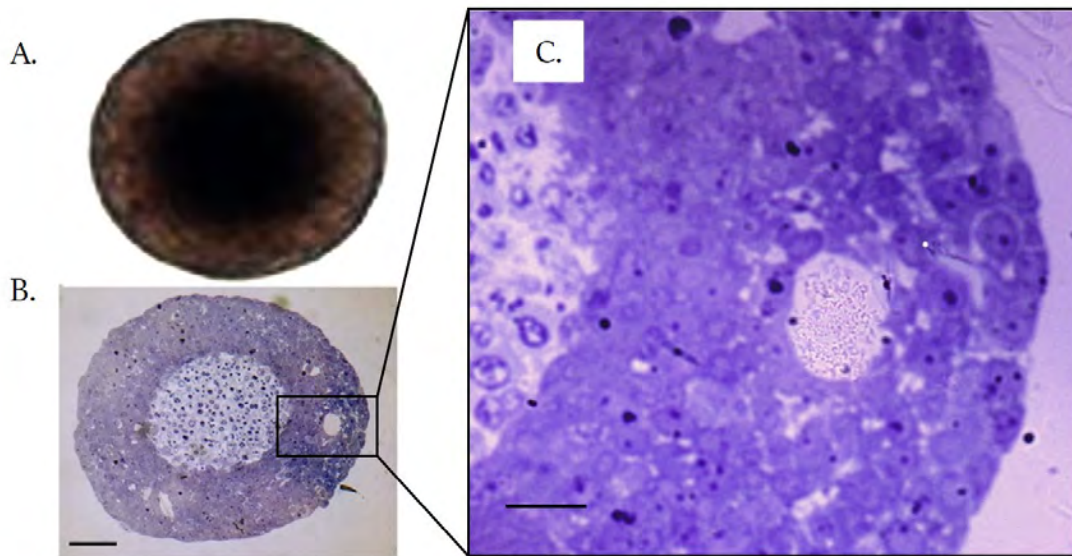


Figura 17.-Esferoides tratados con TZ-HMNPs. Microfotografía de un esferoide BT-474 (40X), **(A)**; corte histológico de un esferoide tratado con TZ-HMNPs **(B)**, ampliación 200X de un sector del corte histológico donde se observan la acumulación de los complejos por iridiscencia de los aglomerados **(C)**.

4. Discusión

Las necesidades crecientes de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer ponen a las NPs como una potencial herramienta para la liberación controlada de fármacos. Sin embargo, la mayoría de las NPs empleadas en investigación o aplicadas en nanomedicina, están compuestas por materiales orgánicos (lípidos o azúcares) que presentan inconvenientes inherentes a su fabricación. Estas se caracterizan por tener un bajo grado de carga de fármacos y/o la liberación prematura de los mismos, además de presentar inestabilidad en condiciones hidrodinámicas y fisiológicas, dificultades para modificar sus propiedades: fisicoquímicas de acuerdo con la molécula de carga y, en ocasiones, cierta toxicidad. Es por ello, que los materiales inorgánicos mesoporosos y/o huecos son algunos de los candidatos más recientemente evaluados como plataformas de administración de medicamentos. En el presente trabajo se logró con éxito desarrollar un protocolo de síntesis para la obtención de NPs huecas y porosas con el objetivo de ser usadas como herramientas terapéuticas. En este sentido, se optimizó la técnica para determinar una serie de parámetros adecuados para la obtención de estos sistemas, entre los que se tuvo en cuenta: el tamaño de partícula, una biocompatibilidad elevada y una morfología adecuada, ya que estas características son indispensables para la administración in vivo.

En, la literatura, hay un número relativamente escaso de protocolos de síntesis de NPs huecas esféricas compuestas por óxido de silicio (Xue et al., 2017). Tanto la forma esférica como la superficie porosa poseen la ventaja de disminuir los daños en las membranas celulares. En este sentido, los materiales porosos han demostrado mejor inocuidad que los no porosos de igual tamaño y forma. Por ejemplo, Lee y colaboradores (2011) han observado que los materiales no porosos producen un aumento drástico en la producción de MAPK, TNF- α , IL1- β y NF- κ B por macrófagos mientras que esto se evitó en presencia de NPs porosas.

EL protocolo desarrollado en el presente trabajo condujo a la obtención de NPs con poros superficiales para facilitar la entrada del medio acuoso, para posteriormente, favorecer la difusión del fármaco. El material fue caracterizado fisico-químicamente, y el protocolo de síntesis permitió obtener muestras altamente homogéneas y con alta reproducibilidad. También, se pudo verificar que el material obtenido era biocompatible ya que la viabilidad celular superó el 80 %, por ende estas NPs pueden considerarse no tóxicas (ISO

10993-5: 2009). Además, se evaluó la erosión de las NPs ante diferentes valores de pHs fisiológicos y patológicos, lo cual es recomendable para la liberación de fármacos de interés terapéuticos. En tal sentido por lo observado se puede concluir que si el material ingresara en el cuerpo podría degradarse lentamente por la exposición al pH fisiológico.

Por otra parte, es fundamental mencionar que los tratamientos quimioterapéuticos tradicionales contra el cáncer a menudo se ven obstaculizados por la alta toxicidad sistémica de las drogas aplicadas, debido a la falta de especificidad por el tumor. Asimismo, se conoce que las NPs podrían quedar retenidas en el medio tumoral por el efecto EPR aumentando la especificidad de los fármacos transportados. Estas características facilitarían a posteriori la administración de fármacos encapsulados en NPs por vía parenteral para el tratamiento del cáncer. Por ello, se evaluó la incorporación de DOX en HMNPs mediante la agitación constante de los componentes o el empleo de ultrasonido. El fármaco fue encapsulado eficientemente en HMNPs mediante sonicación lo que optimiza el tiempo de preparación de los complejos. Asimismo, se estudiaron los mecanismos por los cuales se produce la liberación de las fármacos, para ello se simuló las condiciones de HMNPs en el flujo sanguíneo como en el microambiente tumoral. El fármaco fue liberado desde las NPs por difusión pasiva siendo que la degradación del material afectó muy poco la liberación del mismo. Por último, se probó la efectividad del complejo HMNPs-DOX con diferentes dosis de DOX en células tumorales de línea. Estos resultados demostraron que la efectividad del complejo HMNPs-DOX fue superior a la e la droga libre con dosis de 50 mg/m¹ y 100 mg/m², lo cual podría ser el puntapié inicial para aumentar las dosis actualmente proporcionadas a nivel clínico. Es de resaltar que el tratamiento con DOX induce cardiocitotoxicidad, es por esta razón, que desde el patentamiento de Doxil (liposoma con DOX encapsulado) en 1995 se ha intensificado

La búsqueda de nuevas formas de encapsulación. Es por ello, que la encapsulación y liberación eficiente de DOX desde las HMNPs podría ser una alternativa nueva para el tratamiento del cancer.

Por otra parte, el tratamiento del cáncer con anticuerpos monoclonales (AcMo) ha significado un gran avance terapéutico, sin embargo, es necesario superar los problemas relacionados con las altas concentraciones necesarias para alcanzar dosis efectivas y la resistencia que generan en el tiempo. Estos AcMo podrían servir para funcionalizar las superficies de las NPs y dirigir activamente a estas hacia el sitio tumoral, aumentando las dosis efectivas de los fármacos encapsulados. Además, los AcMo pueden no sólo bloquear los receptores de membrana desatando una respuesta mediante las vías de señalización de muerte celular, sino también ser reconocidos por células del sistema inmune y desencadenar una respuesta inmune particular contra el tumor. En este sentido, en el presente trabajo, se adsorbió el AcMo, Trastuzumab, sobre las superficies de las HMNPs. La conjugación de los Aes fue un método simple, no direccionado y en el cual no intervienen uniones covalentes. Como describieran Katz y Willner (2004) la adsorción es un método simple que está asociado con baja inestabilidad e inactivación de las proteínas inmovilizadas; a diferencia de lo observado durante la inmovilización por uniones covalentes con linkers bifuncionales. Por otro lado, la concentración de Aes juega un rol esencial en la formación del complejo. En este trabajo se ha hallado que la concentración mínima necesaria para que el complejo mantenga su estabilidad es de 0,2 mg/mg de nanomaterial y que la fina corona de Ac generada ha podido ser observada mediante TEM. Esto coincide con lo demostrado por otros autores donde altas concentraciones de proteínas sobre las NPs no formarían complejos estables, en comparación con los conjugados a bajas concentraciones (Vertegel et al., 2004; Wu & Narsimhan, 2008; BJORKEGREN et al., 2015). Además, el incremento en la concentración de Aes no produce necesariamente aumentos de la actividad del mismo. Por el contrario, una alta densidad de Aes inmovilizados sobre las NPs puede provocar efectos negativos en su unión con los Ags, debido a la reducción del número de fragmentos Fab disponibles o por el impedimento estérico ocasionado por el solapamiento de los sitios de unión. Además, se ha descrito que la síntesis de complejos Ac-NPs conjugados por adsorción con concentraciones de Aes menores a la saturación de la superficie han sido más efectivos que aquellos con mayores concentraciones (Bizova et al., 2017; Brewer et al., 2017).

También, se demostró que el complejo TZ-HMNPs se unía específicamente al receptor HER2. En este sentido células tumorales que sobre-expresan HER2 fueron utilizadas para evaluar la acción del complejo, se observó que luego de 3 días el complejo disminuía la viabilidad de las células superando los efectos del AcMo empleado con una dosis similar a la aplicada en clínica. Además, esa dosis fue evaluada en células MDA-MB23 I y MCF- 7, en las cuales no se observó disminución de la viabilidad. Asimismo, en células resistentes al tratamiento con TZ (BT474 MR) se observó una acción significativa de los complejos TZ-HMNPs y IgG-HMNPs. Sin embargo, el complejo TZ-HMNPs disminuyó la viabilidad en más de un 80 % mientras IgG-HMNPs lo hizo en un 36 %, por lo que la acción de TZ podría estar siendo efectiva. Esto es coincidente con lo reportado por Chung y col (2015) donde pacientes con resistencia a TZ presentan niveles basales de expresión de HER2. En este sentido los complejos TZ-HMNPs podrían estar activamente en contacto con las monocapas de células, además la masa de Aes disponibles cerca de las células podría aumentar la respuesta anti-HER2. Por otro lado, se ha descrito que al bloquear alguno de los receptores de membrana de estas células, las mismas se vuelven más sensibles a TZ (Kanzaki et al., 2016). Por otro lado, las NPs desnudas no ocasionaron variaciones en la actividad metabólica de las células.

Por último, y teniendo en cuenta que el principal problema en el tratamiento del cáncer es el desarrollo de metástasis y la resistencia a los diferentes tratamientos, y que el cribado en la búsqueda de nuevas terapias o fármacos se realiza en cultivos celulares en monocapas, estas no reflejan la resistencia adquirida presente en tumores sólidos *in vivo*. Estos tumores son más que una expansión clonal de células mutantes; son estructuras tipo órganos y como tales, se relacionan no solo entre células sino también con el microambiente que lo rodea. Es por ello, que el complejo TZ-HMNPs se evaluó en esferoides obtenidos con la línea celular BT474. Se observó

que los esferoides tratados con el complejo y TZ disminuían su crecimiento significativamente luego de 3 días. Además se pudo observar que las NPs lograron ingresar a los esferoides. En este sentido, se desconoce el modo de ingreso de las NPs, sin embargo, el mismo podría ocurrir por translocación o por necrosis celular. En este sentido, la evaluación de TZ-HMNPs en sistemas de cultivo tridimensionales que muestran interacciones relevantes entre células-células, perfiles de expresión génica y vías de señalización, heterogeneidad y complejidad estructural, son muy útiles para reflejar lo que puede ocurrir en tumores in vivo con las NPs terapéuticas.

5. Conclusión

En este trabajo se desarrolló un protocolo de síntesis para la obtención de NPs huecas y porosas que son biocompatibles, las que pueden sufrir degradación a pH fisiológico. Además se demostró que son aptas para la encapsulación de fármacos. Por último, mediante la conjugación de un AcMo en su superficie se demostró que las NPs poseían una gran actividad antitumoral. En definitiva, esta nanoherramienta desarrollada posee un gran potencial para ser aplicada en el transporte de fármacos hacia el sitio tumoral direccionada mediante un lígando activo en su superficie.

6. Referencias

- BJORKEGREN S.M.S., L. Nordstiema, A. Temerona, M.E. Persson, & A.E.e. Palmqvist (2015) Surface activity and flocculation behavior of polyethylene glycol-functionalized silica nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 452, 215- 223.
- Brewer M.G., A. DiPiazza, J. Acklin, C. Feng, A.J. Sant & S Dewhurst (2017) Nanoparticles decorated with viral antigens are more immunogenic at low surface density. *Vaccine*; 35(5):774-781.
- Byzova N.A., I.V. Safenkova, E.S. Slutskaya, A.V. Zherdev & B.B Dzantiev (2017) Less is More: A Comparison of Antibody-Gold Nanoparticle Conjugates of Different Ratios. *Bioconjugate Chemistry*, 28(11), 2737-2746.
- Chen F., E. Zhao, T. Kim, J.X. Wang, G. Hableel, P.J.T. Reardon, et al. (2017) Organosilica Nanoparticles with an Intrinsic Secondary Amine: An Efficient and Reusable Adsorbent for Dyes. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 9, (18), 15566-15576.
- Chen Y., H. Chen, L. Guo, Q. He, F. Chen, J. Zhou, et al (2010) Hollow/Rattle-Type Mesoporous Nanostructures by a Structural Difference-Based Selective Etching Strategy. *ACS Nano*, 4(1), 529-539.
- Chung D.Y., S.W. Jun, G. Yoon, S.G. Kwon, D.Y. Shin, P. Seo, et al (2015) Highly Durable and Active PtFe Nanocatalyst for Electrochemical Oxygen Reduction Reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 137(49), 15478-15485.
- Kanzaki M., H. Hatakeyama, Y. Nakahata & H. Yarimizu (2016) Live-cell single-molecule labeling and analysis of myosin motors with quantum dots. *Molecular Biology of the Cell*, 28(1), 173-181.
- Katz E. & I Willner (2004) Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. *Angew. Chem., Int. Ed.* 43, 6042-6108.

- **Kumar S., A.C. Anselmo, A. Banerjee, M. Zakrewsky & S Mitragotri (2015) Shape and size dependent immune response to antigen-carrying nanoparticles. J Control Release 220 141-148.**
- **Lee D.E., H. Koo, I.C. Sun, J.H. Ryu, K. Kim & I.C. Kwon (2011) Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis. Chem. Soc. Rev ., 41 (7). 2656-2672.**
- McCarthy C.A., Ahem R.J., R. Dontireddy, K.B. Ryan & A.M. Crean (2016) Mesoporous silica formulation strategies for drug dissolution enhancement: a review. *Expert Opin Drug Deliv.* 13(1):93-108.
- Sah A.K., Vyas A., P. K. Suresh & B Gidwani (2017) Application of nanocarrier-based drug delivery system in treatment of oral cancer. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(4), 650-657.
- Slowing I.I., J.L. Vivero-Escoto, C.W. Wu & V.S.Y Lin (2008) Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 60(11): 1278-88.)
- Vertegel A.A., R.W. Siegel & J.S. Dordick (2004) Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme. *Langmuir* 20. 6800-6807.
- Wu X.Y. & G. Narsimhan (2008) Effect of surface concentration on secondary and tertiary conformational changes of lysozyme adsorbed on silica nanoparticles. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* 1784, 1694-1701.
- Xue H., Z. Yu, Y. Liu, W. Yuan, T. Yang, You J., et al. (2017) Delivery of miR-375 and doxorubicin hydrochloride by lipid-coated hollow mesoporous silica nanoparticles to overcome multiple drug resistance in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 12, 5271-5287.