



ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

ANALES 2017



ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

SUMARIO

MEMORIA	1
CONFERENCIA	
“BIOTECNOLOGÍA, CONCEPTO Y APLICACIONES”	4
Dr. Sergio Secchiari	
JORNADAS CIENTIFICAS	
VI JORNADA INTERACADEMICA INTERNACIONAL	25
“RESISTENCIA MICROBIANA: ABORDAJE TRANSDISCIPLINARIO”	
ARGENTINA: Academia Nacional De Agronomía Y Veterinaria; Academia Nacional De Medicina Academia Nacional De Farmacia Y Bioquímica	
URUGUAY: Academia Nacional De Veterinaria; Academia Nacional De Medicina	
Jornada 161 “ESTADO ACTUAL DE LA NANOTECNOLOGIA Y SUS APLICACIONES EN LAS CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS”	29
Jornada 162 “SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO. PASADO, PRESENTE Y FUTURO”	91
Jornada 163 “OBESIDAD, NUTRICIÓN Y SALUD”	117
PREMIOS	
Premio "Vicente Colobraró"	127
"Premezclas comerciales libres de gluten y desarrollo de nuevas formulaciones. situación de escolares celíacos respecto al hierro y zinc"	
Luis Dyner, Verónica Ferreyra, Ricardo Wright, Silvina Márquez, Carolina Cagnasso y Margarita Olivera Carrión.	
Premio "María Amelia Enero"	149
"Comparación de los efectos cardiovasculares del tratamiento crónico con β-bloqueantes o amlodipina en ratas espontáneamente hipertensas"	
Julieta S. Del Mauro, Paula D. Prince, Martín Donato, Marcela A. Morettón, Germán E. González, Facundo M. Bertera, Andrea Carranza, Susana B. Gorzalczany, Diego A. Chiappetta, Celina Morales, Ricardo J. Gelpi, Carlos A. Taira, Christian Hocht.	
Premio "Fernando Rusquellas"	168
"Enterocina ap-cect7121: actividad bactericida, sinergia antimicrobiana y evidencias de prevención y efecto anti-biofilm sobre staphylococcus aureus multi-resistente"	
Gastón Delpech, Mónica Cecí, Sabina Lísarrague y Mónica D. Sparo.	

MEMORIA

CONSEJO DIRECTIVO

ASUNCIÓN DE NUEVAS AUTORIDADES

El 28 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. Manuel R. Limeres
Vicepresidente:	Acad. Marta M. Salseduc
Secretario General:	Acad. Horacio J.G. Mato
Prosecretario:	Acad. Néstor Caffini
Tesorero:	Acad. Alfredo Salibian
Protesorero:	Acad. Virginia Martino
Vocales Titulares:	Acad. Carlos A. Gotelli Acad. Juan P.F.C. Rossi
Vocales Suplentes:	Acad. Miguel Ángel Caso Acad. Roberto Coco
Revisores de Cuentas:	Acad. Osvaldo Cascone Acad. Miguel D' Aquino Acad. Francisco Stefano

El Consejo Directivo realizó durante este período diez (9) 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

ACTOS DE INCORPORACIÓN DE ACADÉMICOS

ACADÉMICO TITULAR

El 23 de marzo de 2017 asumió como Académica titular la **Dra. Norma Sterin de Speziale**, quien fue presentada por el Acad. Juan Pablo Rossi, disertó sobre el tema: "*Lípidos bioactivos en la salud humana*".

El 25 de abril de 2017 asumió como Académica Correspondiente la **Dra. Silvia Gold** quien disertó sobre el tema: "Una aproximación innovadora a la Academia". Fue presentada por el Acad. Manuel Limeres.

El 18 de mayo de 2017 asumió como Académica Correspondiente la **Dra. María Luz Martínez**. Presentada por el Acad. Manuel Limeres disertó sobre el tema: "Evolución conceptual de suplementos dietarios".

El 23 de marzo de 2017 el Claustro de Académicos Titulares eligió como Académicos Correspondiente a los Dres. Daniel Allemandi y Alejandro Vila.

El Acad. **Daniel Allemandi** asumió el 29 de junio de 2017 en el Auditorio Edificio Integrador, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba disertando sobre "Desafíos de la tecnología farmacéutica para el desarrollo de medicamentos más efectivos". El Acad. Allemandi fue presentado por los Académicos Limeres y Manso.

El Acad. **Alejandro Vila** asumió el 12 de septiembre de 2017 en el Aula de Graduados de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Univ. Nacional de Rosario. Fue presentado por el Acad. Gabriel Gutkind. Disertó sobre el tema "De bacterias y hombres. Evolución de la resistencia bacteriana a antibióticos".

El 18 de mayo de 2017 el Claustro de Académicos Titulares eligió como Académico Correspondiente al Dr. **Víctor Romanowski** quien el 20 de julio asumió presentado por el Acad. Néstor Caffini. El Acad. Romanowski disertó sobre el tema "Baculovirus: un problema y varias soluciones".

El 24 de agosto de 2017 el Claustro de Académicos Titulares eligió como Académicos Correspondiente la **Dra. Nélide Mondelo** y como académico Titular al Dr. Rolando Rossi.

La Acad. Nélide Mondelo asumió el 9 de noviembre de 2017 y fue presentada por la Dra. Marta Salseduc. En el acto disertó sobre "Farmacotoxicología en la industria y con el mundo académico inspiradores y cambios"

El **Acad. Rolando Rossi** asumió el 26 de octubre de 2017 presentado por la Acad. Mirta Biscoglio. Disertó sobre "La Na, K-ATPasa, una maquina molecular"

ACADÉMICOS CORRESPONDIENTES

La Acad. Titular **María Guillermina Volonté** solicitó el pase a Miembro Correspondiente, por razones personales que le impiden cumplir con sus obligaciones como miembro titular.

CONFERENCIA

18 de julio de 2017

“BIOTECNOLOGÍA, CONCEPTO Y APLICACIONES”

El Dr. Sergio Secchiari expuso acerca de la evolución de la biotecnología y dio un panorama amplio de sus aplicaciones en distintas áreas. Presentó los fundamentos de la obtención de proteínas recombinantes, los diferentes tipos de proteínas que se pueden obtener y los diferentes procesos aplicados. Se refirió más en detalle a las aplicaciones de la bioingeniería en medicina humana: en la producción de medicamentos y otros productos farmacéuticos; producción de proteínas de uso farmacéutico; producción de medicamentos en animales transgénicos y terapia génica. Por último, hizo referencia a la producción de metabolitos secundarios de origen vegetal: dio los fundamentos de las distintas técnicas empleadas; ejemplificó las distintas aplicaciones de la biotecnología vegetal a la producción de principios activos y de compuestos que contribuyen al color y aroma de algunas especies vegetales.

PRESENTACIÓN REALIZADA POR LA ACAD. VIRGINIA MARTINO.

Sergio Secchiari es farmacéutico de la UBA. Se recibió en 1977. Hizo carrera docente en la Cátedra de Farmacognosia de la FFYB desde 1978, siendo JTP hasta 1995. Allí realizó además tareas de investigación en Fitoquímica y plantas medicinales. Se integró a la industria farmacéutica, ejerciendo distintas funciones en los laboratorios Roche (1983-1985); Merck (1985-1988); Instituto Biosidus (1988-2000) y en Biosidus, donde actualmente desempeña el cargo de Gerente de Calidad y Director Técnico. El desempeño de estas funciones le permite interactuar con las diferentes disciplinas asociadas a la producción biotecnológica, incluyendo creación de bancos celulares, purificación de proteínas, manufactura de soluciones proteicas concentradas y productos biotecnológicos en diferentes formas farmacéuticas.

JORNADAS CIENTIFICAS

161° JORNADA CIENTÍFICA

ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

“ESTADO ACTUAL DE LA NANOTECNOLOGÍA Y SUS APLICACIONES EN LAS CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS”

Coordinador

Acad. Marcelo C. Nacucchio

10 de Agosto de 2017

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Sala de conferencias: “Pbro. Antonio Sáenz”

PROGRAMA	
09:00 - 10:00 hs	Acreditación
10:00 - 10:10 hs	Palabras de apertura del Simposio por el Sr. Presidente de la Academia Acad. Manuel Limeres
10:15 - 10:45 hs	Conferencia: "Nanotecnología: el desafío del Siglo XXI" Prof. Dr. Galo Soler Iliá. (Univ. Nacional de San Martín)
10:45 - 11:30 hs	Mesa redonda Aplicaciones Biomédicas. Moderador: Acad. Marcelo Nacucchio Panelistas:
	Prof. Ma. Celina Lamas (Universidad Nacional de Rosario) "Perspectivas nanotecnológicas empleando benzimidazoles para el tratamiento de la trichinelosis"
	Prof. Santiago Palma (Universidad Nacional de Córdoba) "Sistemas nanométricos basados en lípidos destinados al tratamiento de enfermedades de retina"
	Dra. María Emilia Villanueva (Universidad de Buenos Aires) "Material antimicrobiano inteligente a base de queratina y nanopartículas de óxido de Zinc"
11:30 - 12:00 hs	Conferencia "Cristales líquidos como sistemas de liberación de fármacos" Acad. Daniel Allemandi (Universidad Nacional de Córdoba)
12:00 - 12:30 hs	Conferencia "Nanosistemas como potenciales agentes de diagnóstico por imágenes" Prof. Dr. Romina Glisoni. (Universidad de Buenos Aires)
12:30 - 13:00hs	Conferencia "Herramientas para la promoción de la Nanotecnología" Ing. Daniel Lupi (Presidente Fundación Argentina de Nanotecnología)
13:00 - 14:30 hs	Presentación de trabajos en formato posters.
14:30 - 15:00 hs	Conferencia "Desarrollo de nanosistemas para liberación controlada de fármacos empleando sistemas biológicos" Prof. Dr. Guillermo R. Castro (Universidad Nacional de La Plata)
15:00 - 15:30 hs	Conferencia "Aplicaciones micro- y nanotecnológicas para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas" Prof. Dr. Claudio Salomón (Universidad Nacional de Rosario)
15:30 - 15:50 hs	Café

15:50 - 16:20hs	Conferencia “Aspectos regulatorios aplicados a productos nanotecnológicos” . Dra. Marta Spinetto – Dra. Patricia Aprea (ANMAT)
16:20 - 17:00 hs	Mesa redonda Experiencias y Visión del sector industrial. Moderador: Acad. Marcelo Nacucchio Panelistas: Dr. Santiago Sanguinetti (Inmunova) Dr. Diego Comerci (Chemtest) Ing. Daniel Miguez (MabbBiomaterial)
17:00-17:30 hs	Generación del Documento del Simposio. Lectura del mismo y palabras de cierre
17:30 hs	Anuncio de Premios: Premio Jornada 2017 de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica al mejor trabajo de investigación presentado. Premio Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica-Fundación Argentina de Nanotecnología al mejor trabajo con aplicación industrial presentado

CONCLUSIONES

La Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica, a través de la Sección Ciencias Farmacéuticas y Farmacológicas, organizó la 161 Jornada Científica sobre **“Estado actual de la nanotecnología y sus aplicaciones en las ciencias farmacéuticas y bioquímicas”** abriendo nuevas perspectivas para la investigación, innovación e interacción entre los diferentes sectores.

Dicha Jornada contó con la presencia de 15 oradores y una numerosa audiencia.

El objetivo principal fue difundir las distintas actividades relacionadas con la nanotecnología desde la investigación y desarrollo, la producción e innovación, aspectos regulatorios y experiencias empresariales.

Los disertantes abarcaron las distintas áreas en las que trabajan, ya sea en los sectores académicos, privados o gubernamentales.

Se generó una gran convocatoria lo que evidencia un genuino interés en el tema de la Nanotecnología y sus aplicaciones en las ciencias farmacéuticas y bioquímicas.

Existe una diversidad de enfoques y disciplinas tanto farmacéuticas como bioquímicas que contribuyen a esta temática. También se evidencia una red de investigadores, reguladores y emprendedores con amplia experiencia en estas tecnologías lo que augura un promisorio futuro e inserción de estas temáticas y sus aplicaciones a nivel nacional.

Se plantea la necesidad de un estrechamiento en la relación entre la academia, el sector gubernamental y el sector industrial, apoyado por políticas que promuevan el desarrollo de las investigaciones y regulaciones de acuerdo a las necesidades del sector de las ciencias para la salud.

Se propone promover que las cámaras involucradas, el Ministerio de Ciencia y Tecnología, el Conicet, u otros, generen “mesas de integración” convocando a la industria y la universidad.

VER ANEXO 5

162° JORNADA CIENTÍFICA
ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Sala de conferencias: “Pbro. Antonio Sáenz”

“SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO.
PASADO, PRESENTE Y FUTURO”

Coordinadores

Acad. Silvia Gold – Acad. Francisco Stefano
Buenos Aires – Argentina
14 de Septiembre de 2017

	PROGRAMA
14:30 – 14:35 hs	Introducción
14:35 – 15:05 hs	“Escherichiacoli productor de toxina Shiga: avances de un abordaje transdisciplinario” Académico Gerardo Leotta <i>Académico de Número en representación de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria</i>
15:15 – 15:45 hs	“SUH, su impacto en la población pediátrica Argentina” Dra. Andrea Exeni <i>Jefe de Sección Nefrología y Diálisis Peritoneal Crónica Infantil Hospital Universitario Austral</i>
15:55 – 16:25 hs	“Nuevo paradigma diagnóstico del Síndrome Urémico Hemolítico típico” Dra. Marta Rivas <i>Jefe Servicio Fisiopatología INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”</i>
16:35 – 16:50 hs	Café
16:50 – 17:20 hs	“Prevención del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH)” Dra. María Gracia Caletti <i>Consultora (h) H. Garrahan</i>
17:30 – 18:00 hs	“Ingeniería de proteínas para el abordaje terapéutico del Síndrome Urémico Hemolítico” Dr. Fernando Goldbaum <i>Investigador Superior CONICET, Director del Centro de Rediseño e Ingeniería de Proteínas (CRIP-UNSAM)</i>

VER ANEXO 5-2

163° JORNADA CIENTÍFICA
ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Sala de conferencias: “Pbro. Antonio Sáenz”
163° JORNADA CIENTÍFICA
“OBESIDAD, NUTRICIÓN Y SALUD”

Coordinadoras

Acad. Dra. María Cristina Añón & Acad. Dra. María Luz Pita Martín de Portela
Buenos Aires – Argentina
7 de Noviembre de 2017

PROGRAMA	
09:15 - 09:30hs	Palabras de apertura por el señor Presidente Acad. Manuel R. Limeres.
09:30 - 10:10hs	“Obesidad: controversias y desafíos” -Dra. Ana Cappelletti (Universidad Favaloro)
10:15 - 10:35hs	Sección I – Moderador: Acad. Silvia Hajos “Alteraciones cardiometabólicas tempranas en obesidad infantil” - Dra. Carmen Mazza (Hospital Garrahan)
10:35 - 10:55hs	“Abordaje clínico de la obesidad Infantil” - Dra. Marisa Laura Armeno (Hospital Garrahan - Hospital Alemán)
10:55 - 11:15hs	“Microbiota y obesidad” - Dra. Carmen Toca (Hospital Posadas - UBA)
11:15 - 11:30hs	Preguntas y discusión
11:30 - 11:50hs	Café
11:50 - 12:10hs	Sección II: Obesidad en adultos: aspectos bioquímicos y clínicos – Moderador: Mirtha Biscoglio “¿Qué pasa con las lipoproteínas en la obesidad?” - Dra. Laura Schreier - (Hospital de Clínicas - UBA)
12:10 - 12:30hs	“Obesidad y síndrome metabólico en el adulto” - Dr Julio Mollerach (Hospital Tornú – ICBA – UBA – UCA)
12:30 - 12:50hs	“Obesidad y su relación con metabolismo óseo” - Dra Susana Zeni (Hospital de Clínicas -CONICET -UBA)
12:50 - 13:00hs	Preguntas y discusión
13:00 - 14:00hs	Receso
14:00 -14:20hs	Sección III El paciente adulto obeso y sus alternativas clínicas – Moderador: Acad. Norma Sterin de Speziale “Indicaciones de la cirugía bariátrica en obesidad mórbida o con síndrome metabólico” Dr. Hugo Montemerlo (UCA - IADEIN)
14:20 - 14:40hs	“Indicadores bioquímicos de estado nutricional pre cirugía bariátrica”- Acad. María Luz Pita Martín de Portela (UBA)

14:40 - 15:10hs	“Alteraciones nutricionales y de la microbiota post cirugía bariátrica”- Dra. María del Pilar Quevedo (UBA)
15:10-15:30hs	Preguntas y discusión
15:30-16:00hs	Café
16:00 - 16:30hs	“Genética y Epigenética” - Dr. Gustavo Fretchel (UBA - CONICET)
16:30 - 16:40hs	Preguntas y discusión
16:40 - 17:20hs	“Prevención de Obesidad en la infancia y adolescencia” - Dra. Irina Kovalskys (UBA)
17:20 - 17:30	Conclusiones

VER ANEXO 5-3

PREMIOS

PREMIOS 2017

El jurado integrado por la Acad. Virginia Martino, el Acad. Roberto Coco, el Acad. Mario Los, el Acad. Francisco Stefano, el Acad. Osvaldo Cascone, Acad. Clyde Carducci y Acad. Silvia Hajos.

Por unanimidad dictamina adjudicar :

Premio "María Amelia Enero", correspondiente al área Ciencias Farmacéuticas y Farmacológicas, al trabajo "COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS CARDIOVASCULARES DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON β -BLOQUEANTES O AMLODIPINA EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS" de Julieta S. Del Mauro, Paula D. Prince, Martín Donato, Marcela A. Morettón, Germán E. González, Facundo M. Bertera, Andrea Carranza, Susana B. Gorzalczany, Diego A. Chiappetta, Celina Morales, Ricardo J. Gelpi, Carlos A. Taira, Christian Hocht.

Premio "Fernando Rusquellas", correspondiente al área Ciencias Biológicas, Bioquímicas, Biofísicas y Naturales al trabajo "ENTEROCINA AP-CECT7121: ACTIVIDAD BACTERICIDA, SINERGIA ANTIMICROBIANA Y EVIDENCIAS DE PREVENCIÓN Y EFECTO ANTI-BIOFILM SOBRE STAPHYLOCOCCUS AUREUS MULTI-RESISTENTE" de Gastón Delpech, Mónica Cecí, Sabina Iíssarrague y Mónica D. Sparo.

Premio "Vicente Colobrero", correspondiente al área Ciencias Aplicadas a la Salud Humana, al trabajo "PREMEZCLAS COMERCIALES LIBRES DE GLUTEN Y DESARROLLO DE NUEVAS FORMULACIONES. SITUACIÓN DE ESCOLARES CELÍACOS RESPECTO AL HIERRO Y ZINC" de Luis Dyner, Verónica Ferreyra, Ricardo Wright, Silvina Márquez, Carolina Cagnasso y Margarita Olivera Carrión.

Ver anexo 6

PREMIO JORNADA 161° 2017

El 10 de agosto de 2018 como parte de la 161° Jornada Científica 2017 se realizó una exposición de trabajos en formato de posters otorgándose entre ellos dos premios y dos premios accésit de acuerdo al siguiente detalle:

Premio Jornada 2017 de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica al mejor trabajo de investigación presentado "ESTRATEGIAS BASADAS EN MICRO- Y NANO-PARTICULAS HÍBRIDAS PARA AUMENTAR LA BIODISPONIBILIDAD DE ANTIBIÓTICOS EN INFECCIONES PULMONARES DE DIFÍCIL ERRADICACIÓN." Autores: German A. Islan; María E. Ruiz; Sebastián Scioli Montoto; José F. Morales; María L. Sbaraglini; Alan Talevi; Luis Bruno-Blanch; Nelson Durán; Guillermo R. Castro.

Premio Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica-Fundación Argentina de Nanotecnología al mejor trabajo con aplicación industrial presentado. a "DESARROLLO DE UN GEL NANOCOSMÉTICO ANTIOXIDANTE." Autores: P. Bucci; S. Alonso; J. Montanari

Premio Accésit Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica - Fundación Argentina de Nanotecnología al mejor trabajo con aplicación industrial a "DESARROLLO DE MATRICES DE FOSFATOS CON PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS". Autores: Bernardo Bayón, Guillermo R. Castro.

Premio Accésit de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica al mejor trabajo de investigación a "MICELAS POLIMÉRICAS CARGADAS CON VERDE DE INDOCIANINA COMO POTENCIALES AGENTES TERAGNÓSTICOS." Autores: N. Lecot, M. Fernández Lomonaco, P. Cabral y R.J. Glisoni.

PREMIO TRIENAL

Cuando se celebra un 60º Aniversario de una institución es imposible dejar de referirse a los antecedentes que llevaron a ese acontecimiento. Cuando se trata del Aniversario de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires es asimismo impensado no mencionar la estrecha relación que une a esta Facultad con nuestra Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica.

Tal es así que nuestra Academia es la ineludible consecuencia de la Asociación Farmacéutica Bonaerense fundada en esta Ciudad de Buenos Aires el 12 de agosto de 1856, en los albores de la organización nacional y en los comienzos de la profesión farmacéutica como una actividad independiente en las profesiones de la Salud.

Entre los primeros objetivos científico-profesionales de esa naciente Asociación se encontraban la promulgación de una Ley del ejercicio de la Farmacia, el establecimiento de una Farmacopea Argentina y, aquí el objetivo de esta enumeración, la creación de facultades para la enseñanza y la investigación farmacéutica.

Cuando la Provincia de Buenos Aires pasa a integrarse a la Confederación Argentina esta Asociación cambia su nombre por el de Sociedad Nacional de Farmacia y con esta denominación consigue el objetivo primigenio, al realizar la petición y obtener la creación de la Escuela de Farmacia de la Facultad de Medicina en el año 1864. Tan imbricadas estaban en sus comienzos que fue en esta Sociedad donde se redactó el Reglamento y el Plan de Estudios.

También propició y creó las Cátedras de Farmacología y de Historia Natural donde fueron designados los científicos Murray y Burmeister fundadores de nuestra Asociación.

Es entonces, desde antes de la misma creación de la Escuela de Farmacia que ambas instituciones desarrollaron sus caminos, una en la representación científico profesional primero y luego en la científico académico al constituirse como Academia y la otra a través de la enseñanza y la investigación de las Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas procurando su estructuración como facultad independiente a lo largo de cien años.

La Facultad de Farmacia y bioquímica de la Universidad de Buenos Aires cumple 60 años y la Academia quiere hacer el reconocimiento a esta noble institución por su labor a lo largo de su existencia y a sus docentes que con su extraordinaria vocación y dedicación han logrado sostener el nivel académico y a realizar investigaciones que nos enorgullecen.

Por ello es que el Claustro de la Academia ha resuelto adjudicar el PREMIO ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

CONVENIOS POR NUEVOS PREMIOS

El Acad. Mato informa que juntamente con el Acad. Limeres sostuvieron una reunión con la Sra. Maria Luisa Macchiavello, responsable de Droguería del Sud, fundada en 1950 por el Dr. Silvio Macchiavello, con el objeto de proponerle la creación de un premio bienal con el nombre de su padre, para lo cual se requeriría de un aporte de la mencionada Droguería, destinado a premiar a sus ganadores. En octubre se concretó el acuerdo de un aporte equivalente \$ 50000 destinado al premio “Silvio Macchiavello” y que los premios serán otorgados a trabajos de las áreas biotecnología y farmacia, respectivamente

Los Acad. Limeres y Mato se reunieron con el Dr. Álvaro López Rosende, de Laboratorio Domínguez S.A., como resultado de lo cual el Laboratorio Domínguez se comprometió a realizar un aporte de \$ 50.000 con destino a un premio de asignación bienal titulado “Juan A. Domínguez”, destinado a investigadores jóvenes farmacéuticos o bioquímicos.

PUBLICACIONES

La Academia publicó el libro “El saneamiento al alcance de todos: problemas que afectan a la salud y medidas de protección en el hogar” escrito por el Acad. Miguel D’Aquino.
140 páginas. Edición Prosa Editores ISBN 978-987-729-262-6

(Prólogo de la Comisión de Publicaciones)

En opinión de la Organización Mundial de la Salud, la difusión de conocimientos básicos sobre salubridad, así como la promoción de hábitos que eviten la contaminación y la transmisión de enfermedades, constituyen aspectos de la educación sanitaria que representan una parte vital del servicio de salud, por lo que es necesario que la población en su conjunto tenga acceso a dicha información. En el mismo sentido cabe destacar que existe consenso en la comunidad académica sobre el rol del farmacéutico como agente sanitario, así como el del bioquímico en el diagnóstico y prevención de afecciones y contaminantes.

De allí la importancia de esta contribución al tema de la educación sanitaria realizada por uno de nuestros Académicos Titulares, el Dr. Miguel D’Aquino, Profesor Emérito de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Como el mismo autor señala en el prefacio de esta obra, su objetivo es brindar a la población, en lenguaje coloquial y comprensible, los conocimientos científico-técnicos necesarios para encarar cualquier situación sanitaria que pudiera surgir en su vida cotidiana, brindándole ayuda para resolverla o -mejor aún- para evitar que se produzca y que puede tener lugar tanto en el hogar como en colegios, instituciones laborales o establecimientos de salud, entre otros.

Los distintos aspectos del saneamiento son abordados por el Dr. D’Aquino con la misma sencillez y claridad con la que desarrollaba sus clases durante su dilatada carrera en la docencia universitaria. Sin actitudes alarmistas, pero con firmeza, va previniendo al lector sobre los cuidados que se deben tener ante distintas situaciones con la que a diario se enfrenta el ciudadano común y que pueden entrañar un riesgo para su salud. Sólo queda brindar una calurosa bienvenida a este valioso aporte a la educación sanitaria y agradecer a quien, como el colega académico, ha destinado parte de su tiempo a pensar generosamente en sus conciudadanos.

RELACIONES CON OTRAS ACADEMIAS NACIONALES
PARTICIPACIONES

VII Encuentro de AIAF

En la ciudad de Asunción, la Academia Nacional de Ciencias Farmacéuticas del Paraguay, entidad organizó, entre el 19 al 22 de setiembre, el VII Encuentro de la Asociación Iberoamericana de Academias de Farmacia (AIAF).

El Acad. Alberto Gurni concurrió en representación de la academia donde disertó sobre Aporte de la Sistemática Clásica en la Búsqueda de Principios Activos.

Durante el encuentro Academia de Farmacia de Brasil que cumplió 50 años entregó medallas destinadas a los presidentes de las Academias integrantes de la AIAF.

El informe de la exposición del Acad. Gurni será remitido a Revista Farmacéutica con la coautoría de la Acad. Martino, para su publicación.

VI ENCUENTRO INTERACADÉMICO 2017, “LAS UNIVERSIDADES Y LA INVESTIGACIÓN EN LA ARGENTINA DEL MAÑANA”

El 31 de octubre de 2017 se realizó el “VI Encuentro Interacadémico” del que participaron las Academias Nacionales de Medicina de Buenos Aires, Derecho y Ciencias Sociales de Buenos Aires, Ciencias Morales y Políticas, Periodismo, Ciencias Económicas, Educación, Ingeniería, Agronomía y Veterinaria, Geografía, Ciencias de Buenos Aires, Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Bellas Artes, Ciencias de la Empresa, Farmacia y Bioquímica e Historia presidido por el Dr. Manuel Luis Martí y el Ing. Manuel Solanet, representantes de las Academias Nacionales de Medicina y de Ciencias Morales y Políticas, respectivamente. El encuentro se realizó en el Aula Magna de la Academia Nacional de Medici

La Academia Nacional de Farmacia presentó el trabajo **“Las Academias y su Interacción con la Investigación en las Universidades: Aspectos Teóricos y Prácticos realizado por Juan Pablo Rossi, Néstor Caffini y Francisco Stefano, publicado en la Revista Farmacéutica N° 159-1 (Dic.2017). Expuso el Acad. Rossi**

**VI JORNADA INTERACADEMICA INTERNACIONAL
“RESISTENCIA MICROBIANA: ABORDAJE TRANSDISCIPLINARIO”**

ARGENTINA

ACADEMIA NACIONAL DE AGRONOMIA Y VETERINARIA

ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA

ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

URUGUAY

ACADEMIA NACIONAL DE VETERINARIA

ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA

Buenos Aires, 23 y 24 de noviembre de 2017

El Acad. Dr Gabriel Gutkind disertó sobre “Mecanismos de resistencia microbiana” en la Jornada Interacadémico Internacional titulada “Resistencia microbiana: abordaje transdisciplinario” organizado por la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria de la que participan además las Academias Nacionales de Medicina y de Farmacia y Bioquímica de Argentina y las Academias Nacionales de Veterinaria y de Medicina del Uruguay, que se realizarán el 23 y 24 de noviembre en la sede de la entidad organizadora

SEGUNDAS JORNADAS FARMACÉUTICAS FUEGUINAS

El Acad. Gabriel Mato concurrió a las Segundas Jornadas Farmacéuticas Fueguinas que con el título “El Farmacéutico Baluarte en el Cuidado de la Salud”, auspiciadas por la COFA y organizó el Colegio de Farmacéuticos de Tierra del Fuego entre los días 1 al 3 de junio en Ushuaia. En la oportunidad disertó sobre “La Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica”

REUNION DE PRESIDENTES DE ACADEMIAS NACIONALES EN TUCUMAN

Invitado por el gobernador de esa Provincia Tucumán, Dr. Juan Luis Manzur, el Acad. Limeres concurrió junto con presidentes de doce Academias Nacionales y el Presidente de la Academia Argentina de Protocolo y Ceremonia a una reunión realizada entre el 24 y 28 de agosto de 2017 de la que participaron también miembros de las Academias de la Pcia. de Tucumán.

**23° CONGRESO FARMACÉUTICO ARGENTINO – SERVICIOS FARMACÉUTICOS PARA LA SALUD DE LA
COMUNIDAD: DE LA TEORÍA A LA ACCIÓN”**

El Acad. Manuel Limeres concurrió al “23° Congreso Farmacéutico Argentino – Servicios Farmacéuticos para la salud de la comunidad: de la teoría a la acción”, organizado por la COFA, realizado en Bariloche entre el 30 de noviembre y el 2 de diciembre de 2017. El Acad. Limeres disertó sobre el tema “*Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica De dónde venimos.*”

CONCURRENCIAS

El 4 de mayo de 2017, los Acad. Limeres, Caso y Squassini concurren a la Academia Argentina de Letras donde asumió como miembro el escritor Jorge Fernández Díaz quien disertó sobre “el Articulismo como una de las Bellas Artes”.

El 9 de mayo de 2017 el Acad. Caso concurre a la conferencia del Dr. Eduardo González Toledo sobre “Cerebro y Drogadicción”

El 17 de mayo de 2017 el Acad. Limeres y Caso concurren a la Academia Nacional de Ciencias Morales y Políticas a la sesión pública extraordinaria de incorporación del Académico de Número doctor Marcos Aguinis, quien disertó sobre el tema: “La persecución de los cristianos en el Medio Oriente”.

El 24 de Mayo de 2017 los Acad. Limeres, Mato y Squassini concurren al acto de celebración del 60º aniversario de la creación de Facultad de Farmacia y Bioquímica, en el acto que se realizó en el Aula Magna se hizo entrega a la Institución del Premio Trienal Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica.

El 8 de junio de 2017 los Acad. Squassini y Coco concurren a la Academia Nacional de Periodismo a la entrega del Premio Pluma de Honor 2017 al Dr. Guillermo Jaim Etcheverry realizado en la Sala Jorge Luis Borges de la Biblioteca Nacional.

El 20 de junio de 2017 El Acad. Squassini concurre a la conmemoración del 197º aniversario del Fallecimiento del Gral. Belgrano Día de la Bandera y 73º aniversario de la Creación el Instituto Nacional Belgraniano realizada en el Atrio del Convento de Santo Domingo

El 22 de junio de 2017 los Acad. Limeres, Mato y Squassini concurren al brindis que en celebración del día del Bioquímico se realizó en la sede del COFyBCF

14 de agosto de 2017 en el Aula de Conferencias Facultad de Farmacia y Bioquímica – UBA se desarrolló la JORNADA de ACTUALIZACIÓN y DEBATE 2017 sobre “Incumbencias Farmacéuticas y Bioquímicas informe de situación. Riesgos y acciones”. se expusieron los riesgos que se plantean a la salud pública y a la situación laboral y profesional de farmacéuticos y bioquímicos cuando se intenta avanzar sobre las incumbencias Concurrieron los Acad. Limeres, Mato, Baratti, Gurni, Gutkind.

El 29 de agosto de 2017 Los Acad. Limeres y Mato concurren, en el marco del 25º aniversario de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), al espacio de trabajo “Medicamentos para terapias avanzadas- Avances y Desafíos” realizado en el salón Cezanne B del Palacio San Miguel.

El 31 de agosto de 2017 Los Acad. Limeres, Mato, Salseduc y Squassini concurren al oficial de conmemoración del 25 aniversario de fundación del ANMAT realizado en el Aula Magna de la Academia Nacional de Medicina.

El 25 de septiembre de 2017 El Acad. Squassini participo de la ceremonia por el 205º aniversario de la Batalla de Tucumán, que se realizó en el Salón Saavedra del Regimiento de Infantería 1 "Patricios".

El 2 de octubre de 2017 los Acad. Limeres, Mato, Squassini y Caso concurren al Acto de declaración de Personalidad destacada de la Cultura de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires en el ámbito de la Ciencia y la Tecnología en el campo de la salud a la Dra. Graciela Ciccía realizado en el Salón Dorado de la legislatura de la CABA

El 11 de octubre de 2017 el Acad. Caso informa sobre su participación, junto con el Acad. Squassini, a la reunión celebrada en la Academia Nacional de la Historia, donde el Centro de Historia Argentina y americana realizó la presentación de la versión digital de La Gaceta Mercantil (1823-1852), realizada por el Archivo Histórico de la Provincia de Buenos Aires.

El 1 de noviembre de 2017 el Acad. Caso concurre a la Academia de Ciencias de Buenos Aires-Sección Química Biológica donde el Dr. Eduardo Castaño disertó sobre “Enfermedad de Alzheimer: certezas, dudas y perspectivas “

AUSPICIO DE LA ACADEMIA

XII Congreso Argentino de Virología, V Simposio Argentino de Virología Clínica y III Simposio Argentino de Virología Veterinaria, que se llevó a cabo del 26 al 18 de junio de 2017.

I Simposio Internacional de Fitocosmética Sustentable, realizado el 28 y 29 de Septiembre en la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Congreso denominado “Drug Discovery for Neglected Diseases International Congress 2018” que se realizará entre el 4 y el 6 de diciembre de 2018 y que coincide con la celebración de los 35 años de creación del Instituto de la Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA)

La Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica, en el marco de los festejos del 160 aniversario de su fundación y en adhesión al 60 aniversario de creación de la Facultad de Farmacia y Bioquímica auspicia la presentación del libro **“Radiofármacos: del laboratorio al paciente”** cuyos autores son Carlos Oscar Cañellas, María Jimena Salgueiro y Marcela Zubillaga, con prólogos de los Acad. Dres. De Paoli y Rubio y de dos capítulos escritos por el Acad. Caro, que se realizó el 17 de mayo de 2017 en la Sala de conferencias “Pbro. Antonio Sáenz” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica – UBA

PUBLICACIONES

Revista Farmacéutica 159 nº1 (2017 versión electrónica).

Anales de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica (Año 2016) versión electrónica.

ACTO DE FIN DE AÑO

El 6 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 FARMACEUTICOS Y BIOQUIMICOS DE CAPITAL FEDERAL (COFYBI)
- CONFEDERACION FARMACEUTICA ARGENTINA (COFA)
- CAMARA ARGENTINA DE ESPECIALIDADES MEDICINALES (CAEME)
- COLEGIO DE FARMACEUTICOS DE LA PCIA. DE BUENOS AIRES (COLFARMA)
- CÁMARA INDUSTRIAL DE LABORATORIOS FARMACÉUTICOS ARGENTINOS (CILFA)

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. Carlos H. Gaozza
Acad. Dr. Hector I. Giuliani
Acad. Dr. Gabriel O. Gutkind
Acad. Dr. Alberto Gurni
Acad. Dr. Carlos A. Gotelli
Acad. Dr. Alfredo A. Hager
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. Dra. Norma Sterin de Speziale
Acad. Dr. Francisco J.E. Stefano
Acad. Dra. Regina L. W. de Wikinski

ANEXO II

ACADEMICOS CORRESPONDIENTES

ARGENTINA

Acad. Dr. Daniel A. Allemandi
Acad. Dr. Carlos Bregni
Acad. Dr. Marcelo O. Cabada
Acad. Dr. Jorge Errecalde
Acad. Dr. Oscar H. Fay
Acad. Dr. Raul C. Fazio
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. Daniel O. Sordelli
Acad. Dr. Marcelo D. Squassini
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

ECUADOR

Acad. Dr. Julio F. Araoz

ANEXO II

ACADEMICOS CORRESPONDIENTES

ESPAÑA

Acad. Dr. María del Carmen FrancésCausapé

Acad. Dr. Tomás Adzet Porredón

Acad. Dr. Francisco Zaragoza García

Acad. Dr. Eduardo Mariño Hernández

Acad. Dr. Miguel Ylla Catalá Genis

Acad. Dr. Antonio Monge Vega

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. Fernando Quevedo Ganoza

Acad. Dr. José Amiel Pérez

VENEZUELA

Acad. Dr. José Luis Andrade

URUGUAY

Acad. Dr. Jorge Ares Pons

Acad. Dr. Cayetano Cano Marotta

Acad. Dr. Cosme de los Santos Carvallido

Acad. Dr. Uberfil Delbene Garate

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

ANEXO II

ACADEMICOS EMERITOS

Acad. Dr. Sem M. Albonico
Acad. Dr. Arnaldo L. Bandoni
Acad. Dr. Rodolfo Brenner
Acad. Dr. Mateo Chekherdeman
Acad. Dr. Ronaldo Meda
Acad. Dr. Modesto C. Rubio

ACADEMICOS HONORARIOS

ARGENTINA

Acad. Dr. Juan Carlos Bagó

BRASIL

Acad. Dr. Evaldo De Oliveira

ESPAÑA

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

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
Acad. Dr. Osvaldo Cascone
Acad. Dr. Silvia Hajos (**Coordinador Alterno**)
Acad. Dr. María L. Pita Martín de Portela
Acad. Dr. Edgardo Poskus
Acad. Dr. Otmaro E. Roses
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
Acad. Dr. Víctor Romanowski (Correspondiente)
Acad. Dr. Daniel O. Sordelli (Correspondiente)

• **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. Dr. Carlos A. Gotelli (**Coordinador**)
Acad. Dr. Alfredo A. Hager
Acad. Dr. Manuel R. Limeres
Acad. Dr. Horacio J. G. Mato
Acad. Dr. Marco Pizzolato
Acad. Dr. Francisco J. E. Stefano

- **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. Carlos H. Gaozza
Acad. Dr. Alberto Gurni
Acad. Dr. Gabriel O. Gutkind
Acad. Dr. Mario A. Los
Acad. Dra. Virginia Martino (**Coordinador alternativo**)
Acad. Dr. Marcelo C. Nacucchio
Acad. Dr. Marta M. Salseduc (**Coordinador**)
Acad. Dr. Marcelo Squassini (Correspondiente)
Acad. Dr. María Guillermina Volonté

ANEXO III

COMISIONES 2016

(Por orden alfabético)

- **REUNIONES CIENTÍFICAS, CURSOS Y CONFERENCIAS**

Acad. Carlos M. Baratti (Coordinador), Acad. Maria C. Añon, Acad. Alberto Diaz, Acad. Silvia Hajos, Acad. Manuel R. Limeres, Acad. Marcelo Nacucchio, Acad. Edgardo Poskus.

- **PUBLICACIONES, BIBLIOTECA Y CANJE**

Acad. Dr. Nestor Caffini (Coordinador), Acad. Alberto Gurni (Coordinador Alterno), Acad. Gabriel Gutkind, Acad. Silvia Hajos, Acad. Virginia Martino, Acad. Marcelo C. Nacucchio, Acad. María Luz Pita Martín. Acad. Dr. Marco Pizzolato

- **VINCULACIONES Y RELACIONES PÚBLICAS**

Acad. Miguel A. Caso (Coordinador), Acad. Mirta Biscoglio, Acad. Miguel D´Aquino, Acad. Carlos Gotelli, Acad. Manuel R. Limeres y Acad. Marcelo Squassini.

- **EDUCACIÓN FARMACÉUTICA Y BIOQUÍMICA Y ÉTICA**

Acad. Maria C. Añon, Acad. Alberto Boveris, Acad. Nestor Caffini, Acad. Ricardo Caro, Acad. Tomás Di Paoli, Acad. Carlos Gaozza, Acad. Regina Wikinski (Coordinadora).

- **PREMIOS Y DISTINCIONES**

Acad. Osvaldo Cascone (Coordinador), Acad. Clyde N. Carducci, Acad. Roberto Coco, Acad. Mario Los, Acad. Virginia Martino, Acad. Alfredo Salibián, Acad. Francisco Stefano.

- **ESTATUTO Y REGLAMENTO**

Acad. Gabriel Mato (Coordinador), Acad. Carlos Gotelli Acad. Juan Pablo Rossi y Acad. Marta Salseduc.

**VI JORNADA INTERACADEMICA INTERNACIONAL
“RESISTENCIA MICROBIANA: ABORDAJE TRANSDISCIPLINARIO”
BUENOS AIRES, 23 Y 24 DE NOVIEMBRE DE 2017**

ARGENTINA

ACADEMIA NACIONAL DE AGRONOMIA Y VETERINARIA

ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA

ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

URUGUAY

ACADEMIA NACIONAL DE VETERINARIA

ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA

CONCLUSIONES

La resistencia microbiana (RAM) es un problema muy grave que enfrenta la humanidad, está entre los temas prioritarios de las Naciones Unidas (ONU), Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Internacional de la Salud Animal (OIE). La RAM produce directamente aumentos en la morbilidad, mortalidad y costos de los servicios sanitarios. Si no se actúa en forma coordinada e inmediata, en pocos años, no habrá antimicrobianos eficaces disponibles y las enfermedades infecciosas nos retrotraerán por lo menos un siglo. Los antimicrobianos son el único grupo de fármacos en los que el uso frecuente induce una más rápida obsolescencia y en los que las consecuencias del tratamiento de los pacientes actuales comprometen la utilidad del medicamento a futuro. Esto afecta a otros miembros de la sociedad que los requieran y a las futuras generaciones.

Alerta a esta crisis, la Asamblea Mundial de la Salud (el órgano decisorio supremo de la OMS) de mayo de 2015 adoptó un Plan de Acción Mundial para contrarrestar la RAM. A la vez, encomendó a los países elaborar sus respectivos planes nacionales de acción de acuerdo con el plan mundial.

Emergencia y diseminación de resistencias

Hasta hace un tiempo, se consideraba en la categoría de multirresistentes a los gérmenes más peligrosos. Se debió reconsiderar esto, para agregar dos categorías más, la de resistencia extrema y la de panresistencia (en éste último caso, no hay tratamiento disponible). Actualmente se reconoce la circulación de clones bacterianos “híper epidémicos”, que han tenido un papel esencial en la diseminación global de la RAM en las dos últimas décadas. Esos clones proveen una plataforma estable para el mantenimiento y la propagación de los genes de RAM. Son clones exitosos, de alto riesgo e internacionales. Existe un intenso intercambio de genes de resistencia entre el hombre, los animales de producción, las mascotas, la vida silvestre, los alimentos, el agua, el suelo y el medio ambiente. Ese

intercambio se ve favorecido por la utilización de antibióticos, su presencia en el medio ambiente y el movimiento de las poblaciones humanas y animales. Sin embargo, existen otros factores que contribuyen a la diseminación de RAM, entre los que se destacan la escasez de agua potable, la pobreza, la sobrepoblación humana y animal, la falta de prevención y control de infecciones en la salud humana y animal y, esencialmente, la poca comprensión del fenómeno por quienes tienen responsabilidades en el mismo.

La comunicación de riesgos

Se debe enfatizar en estrategias de comunicación de riesgos asociados con la RAM en distintos niveles, incluidas las campañas de contención de la contaminación con microorganismos (potencialmente resistentes) a partir de alimentos y agua, en toda la cadena de producción y los hogares. Por otra parte, dada la selección de resistencia aun sin presión antibiótica, es insuficiente fundar los programas de control de la resistencia sólo en las políticas de uso o control de antibióticos. Es por eso imperioso mantener una estricta adherencia a las medidas de prevención y control de las infecciones.

Utilización de antimicrobianos en el hombre

El uso de antimicrobianos sin prescripción y la automedicación son variables claves que deben ser abordadas a través de un proceso de concientización destinada a las autoridades sanitarias, los médicos y la comunidad en general. La OMS desarrolló Guías de Práctica Clínica basadas en evidencia científica para fortalecer esta comunicación. En este contexto, se recomendaron diferentes acciones para la promoción de un uso racional de los antimicrobianos: pueden ser estrategias globales, nacionales o supranacionales (OMS, OPS, etcétera), o medidas locales, ya sean hospitalarias o comunitarias.

Los objetivos por alcanzar pueden agruparse en tres categorías principales:

Monitorización de la prescripción y uso de antimicrobianos y del desarrollo de RAM. Implica la recolección de datos del consumo de antimicrobianos, los niveles de resistencia en los microorganismos problema y las infecciones más comunes, tanto en el hospital como en la comunidad. La herramienta es la vigilancia.

Control y reducción del consumo de antibióticos. Su implementación es relativamente simple, aunque la realidad demuestra la dificultad de mantener las medidas en el tiempo. Entre las buenas prácticas se destaca la importancia del diagnóstico de laboratorio temprano y de ratificar o rectificar el tratamiento antimicrobiano luego de conocer los resultados del análisis microbiológico. La implementación de planes de administración en consideración de parámetros farmacocinético/farmacodinámicos es una herramienta crítica.

Disminución y/o mitigación de la emergencia y diseminación de bacterias resistentes y determinantes de resistencia. Sin embargo, no se ha otorgado la suficiente relevancia a la comunicación de este tema. Y con ello nos referimos a mejorar el entrenamiento de los médicos en la comunicación con los pacientes y a desarrollar estrategias comunicacionales de las autoridades sanitarias hacia el personal de salud y la población que permitan transmitir la información con rigor y de manera oportuna. Además, se debe mejorar la comunicación entre quienes disponen de la información apropiada y todos los integrantes del sistema sanitario, facilitando que información de un nivel adecuado llegue a los consumidores.

La producción animal

La utilización en forma masiva de antimicrobianos en la producción animal, sin protocolos basados en la evidencia científica es un potencial riesgo de desarrollo y propagación de resistencia con impacto directo en la medicina humana y veterinaria.

Para indicar un tratamiento racional es importante conocer los microorganismos que con más frecuencia producen las diversas enfermedades, en cada zona, así como también conocer los patrones

de sensibilidad antimicrobiana y su evolución en el tiempo. En los sistemas de producción intensiva de animales para consumo, los antimicrobianos se pueden utilizar con diferentes esquemas:

Promotores de crecimiento. Es el uso de antimicrobianos de clases normalmente no usadas en medicina humana, a dosis bajas durante tiempos prolongados a efectos de obtener mayores ganancias de peso. Los antimicrobianos utilizados como promotores del crecimiento actúan sobre la flora gastrointestinal, en una forma no estrictamente definida.

Profilácticos o metafilácticos. Para la prevención de brotes de infecciones.

Terapéuticos. También se los puede utilizar en forma terapéutica en grandes poblaciones (vía oral o inyectables) o en forma individual.

La necesidad de implementar políticas de Estado en salud pública, salud animal, sanidad ambiental y seguridad alimentaria

En la Argentina, hace dos años se diseñó el Plan Nacional para el Control de la Resistencia Microbiana¹. Actualmente, se trabaja en su perfeccionamiento y puesta en marcha. El Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) implementó en el 2015 el Programa Nacional para la Vigilancia de la RAM en los animales de consumo. Cuenta con un laboratorio especializado que, en 2017, permitió iniciar la determinación de resistencia en aislamientos de *Escherichia coli* y *Salmonella* a partir de muestreos oficiales en aves y cerdos.

Uruguay, en 2017, inició un proceso de trabajo interdisciplinario e interinstitucional dirigido a diseñar del Plan Nacional de Resistencia Antimicrobiana de Uruguay orientado a la salud animal y las cadenas productoras de alimentos para el período 2018-2022 y tomando como variables claves la vigilancia, las medidas de prevención y control, la investigación, la formación y la comunicación y la gobernanza del propio plan. Las instituciones del sector público y privado, la investigación y la academia definieron objetivos específicos, líneas estratégicas, medias y acciones para cada variable clave con el enfoque de “una salud”. En esa línea es que se recomienda el fortalecimiento de las acciones conjuntas entre el Ministerio de Salud Pública (MSP) y el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP).

La iniciativa de “Una Sola Salud”

El aumento de la RAM implica una responsabilidad compartida entre los sectores de la salud humana, la salud animal, la salud vegetal y la protección del medioambiente, y requiere de una respuesta global, multisectorial y coordinada en el marco del concepto de “Una Sola Salud”.

El resurgimiento global de este enfoque fundamental fue propuesto y adoptado en el año 2001 por la alianza de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) para resolver los complicados asuntos que se registran en la interface entre la salud pública, la salud animal, la vegetal y los ecosistemas. Es un abordaje integrado y colaborativo para solucionar problemas que se plantean en la detección y gestión de enfermedades emergentes, reemergentes, infecciosas y no infecciosas, la seguridad de los alimentos, el medio ambiente y el comercio mundial.

Un enfoque transdisciplinario y análisis de riesgos

Esto sólo puede lograrse de forma **transdisciplinaria**, mediante formas de investigación integradoras de acuerdo con los principios de unidad del conocimiento más allá de las disciplinas. Un abordaje holístico que trasciende las divisiones tradicionales, cuyo objetivo es apreciar cada campo de

(1) <http://www.anlis.gov.ar/wp-content/uploads/2017/11/Lazovski-Estrategia-ARGRAM2017.pdf>

estudio, con la capacidad de ver más allá de sus barreras y límites convencionales. Es un abordaje complejo y permanente, que aspira al diálogo y a la continua revisión

En este contexto, el **Análisis de Riesgos** permite consolidar el abordaje integral de esta temática. Este proceso de evaluación, gestión y comunicación de riesgos es estructurado y sistemático: permite examinar los posibles efectos nocivos para la salud como consecuencia de un peligro y establecer opciones para mitigar esos riesgos. Este enfoque brinda una base de prevención para las medidas regulatorias tanto en el nivel nacional como internacional.

Hasta hace pocos años, en la Argentina no existían mecanismos ni estructuras institucionales que favorecieran un abordaje transdisciplinario de la resistencia microbiana. Uno de los objetivos de esta jornada fue fortalecer los emprendimientos y esfuerzos realizados tanto en Uruguay, como en la Argentina para trabajar de forma transdisciplinaria en materia de RAM.

Por lo expresado es que las cinco academias participantes acuerdan en la necesidad de seguir trabajando de manera conjunta, conscientes de que los antimicrobianos son esenciales para preservar la salud humana y animal, y que su uso inadecuado e imprudente favoreció la emergencia y diseminación de bacterias resistentes, y proponen:

- Implementar sistemas de formación de recursos humanos a efectos de entrenar actores con capacidad operativa en los sistemas de salud pública, animal y ambiental.
- Extremar los esfuerzos en el registro preciso de datos e información sobre producción, importación, industrialización y utilización de agentes antimicrobianos y sus destinos específicos.
- Contribuir a la aplicación de medidas tendientes a lograr que la adquisición de fármacos antimicrobianos destinados tanto a seres humanos como animales sólo sea posible si cuenta con una prescripción emitida por un profesional de la salud.
- Reducir progresivamente el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en producción animal, en ausencia de un análisis de riesgo.
- Promover estrategias para reducir la necesidad del uso de los antibióticos en animales a través de la mejora en prácticas zootécnicas, de higiene e inmunoterapia.
- Alentar el fortalecimiento de los emprendimientos en la Argentina y Uruguay en materia de RAM para implementar un sistema de vigilancia integral.
- Favorecer y estimular el abordaje transdisciplinario para incrementar el conocimiento del estado de situación en ambos países con el fin de realizar evaluaciones de riesgos que permitan dirigir las medidas a adoptar en gestión de riesgos.
- Consolidar las estrategias de comunicación de riesgos a los distintos estamentos involucrados en RAM.

Las Academias Nacionales de Medicina y de Veterinaria de Uruguay, y las Academias Nacionales de Agronomía y Veterinaria, Medicina y Farmacia y Bioquímica de la Argentina exhortan a todos los actores vinculados a la Salud, al medio ambiente y al público en general a asumir la responsabilidad de mitigar la emergencia y diseminación de la RAM a través de un uso racional y prudente de los antimicrobianos, y de la intervención a nivel de los vectores ambientales riesgosos, con el fin de preservar estos recursos terapéuticos esenciales para la humanidad en los años por venir.



*Academia Nacional
de Farmacia y Bioquímica*

La **ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA** tiene el agrado de invitar a usted a la Jornada Científica 2017 organizada por la Sección Ciencias Farmacéuticas y Farmacológicas **“ESTADO ACTUAL DE LA NANOTECNOLOGIA Y SUS APLICACIONES EN LAS CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS”** que se realizará el 10 de Agosto próximo, de 10:00 a 18.00 horas en su sede Facultad de Farmacia y Bioquímica, Salón de Conferencias “Pbro. Antonio Sáenz”, Junín 956, Buenos Aires.

PROGRAMA	
09:00 - 10:00 hs	Acreditación
10:00 - 10:10 hs	Palabras de apertura del Simposio por el Sr. Presidente de la Academia Dr. Manuel Limeres
10:15 - 10:45 hs	Conferencia: "Nanotecnología: el desafío del Siglo XXI" Prof. Dr. Galo Soler Iliá. (Univ. Nacional de San Martín)
10:45 - 11:30 hs	Mesa redonda Aplicaciones Biomédicas. Moderador: Acad. Marcelo Nacucchio Panelistas:
	Prof. Ma. Celina Lamas (Universidad Nacional de Rosario) "Perspectivas nanotecnológicas empleando benzimidazoles para el tratamiento de la trichinelosis"
	Prof. Santiago Palma (Universidad Nacional de Córdoba) "Sistemas nanométricos basados en lípidos destinados al tratamiento de enfermedades de retina"
	Dra. María Emilia Villanueva (Universidad de Buenos Aires) "Material antimicrobiano inteligente a base de queratina y nanopartículas de óxido de Zinc"
11:30 - 12:00 hs	Conferencia "Cristales líquidos como sistemas de liberación de fármacos" Acad. Daniel Allemandi (Universidad Nacional de Córdoba)
12:00 - 12:30 hs	Conferencia "Nanosistemas como potenciales agentes de diagnóstico por imágenes" Prof. Dr. Romina Glisoni. (Universidad de Buenos Aires)
12:30 - 13:00 hs	Conferencia "Herramientas para la promoción de la Nanotecnología" Ing. Daniel Lupi (Presidente Fundación Argentina de Nanotecnología)
13:00 - 14:30 hs	Presentación de trabajos en formato posters.
14:30 - 15:00 hs	Conferencia "Desarrollo de nanosistemas para liberación controlada de fármacos empleando sistemas biológicos" Prof. Dr. Guillermo R. Castro (Universidad Nacional de La Plata)
15:00 - 15:30 hs	Conferencia "Aplicaciones micro- y nanotecnológicas para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas" Prof. Dr. Claudio Salomón (Universidad Nacional de Rosario)
15:50 - 16:20 hs	Conferencia "Aspectos regulatorios aplicados a productos nanotecnológicos" . Dra. Marta Spinetto – Dra. Patricia Aprea (ANMAT)
16:20 - 17:00 hs	Mesa redonda Experiencias y Visión del sector industrial. Moderador: Acad. Marcelo Nacucchio Panelistas: Dr. Santiago Sanguinetti (Inmunova) Dr. Diego Comerci (Chemtest) Ing. Daniel Miguez (Mabb Biomaterial)
17:30 hs	Anuncio de Premios: Premio Jornada 2017 de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica al mejor trabajo de investigación presentado.

"NANOTECNOLOGÍA: EL DESAFÍO DEL SIGLO XXI"

Prof. Dr. Galo Soler Illia

Univ. Nacional de San Martín -
e-mail: galo.soler.illia@gmail.com

La nanotecnología ha abierto las puertas a un mundo nuevo y fascinante, que ya está entre nosotros. En realidad, puede hablarse un conjunto de numerosas *nanotecnologías* que se desarrollan a partir del cruce interdisciplinario de conocimientos básicos en química, física, biología, ciencia de materiales e ingenierías, y que hoy en día están presentes en nuestros autos, nuestra ropa, los deportes, los alimentos, nuestra salud y medio ambiente. Vivimos rodeados de nanotecnologías, aunque no lo sepamos. Pro en los próximos cien años, el impacto va a ser aún más impresionante. Las nanotecnologías van a cambiar el mundo tal como lo conocemos: nos van a curar, dar energía, alimentar y mejorar nuestro medio ambiente. Nuestros hijos y nietos las van a considerar moneda corriente. Las nanotecnologías son centrales para nuestra civilización actual, y la base de su desarrollo futuro.

Las nanotecnologías se basan en nuestra capacidad de diseñar, fabricar, ver, controlar y ensamblar *nanomateriales*. Los nanomateriales son materiales como los que conocemos y utilizamos todos los días (metales, cerámicos, vidrios, polímeros) cuyas dimensiones están reducidas a algunos nanómetros (un nanómetro es 0,000000001 metros, o 10^{-9} m). Para tener una idea de la diferencia de escalas, la diferencia relativa de tamaño entre un científico y la nanopartícula que está fabricando o manipulando es la misma que entre el tamaño de nuestro planeta y el de una aceituna: unos nueve órdenes de magnitud.

Existen dos aspectos esenciales de las nanotecnologías: uno, la posibilidad de manejar sistemas de pequeño tamaño, que permiten, por ejemplo, empaquetar información de manera muy densa, u optimizar la conducción eléctrica. El otro, que es muy relevante, remite al dramático cambio de propiedades de los materiales nanoestructurados, cuyas propiedades intensivas dependen de su tamaño y forma, además de la composición. Esto cambia radicalmente nuestro conocimiento de la materia, y abre la puerta a nuevas propiedades explotables.

En los últimos sesenta años, el avance en la electrónica y los materiales avanzados, demostrado por la miniaturización de circuitos electrónicos ha permitido llegar al nanómetro “desde arriba hacia abajo”, enfoque llamado “top-down”. Los químicos, físicos y biólogos moleculares han venido acercándose al nanómetro por así decirlo, “desde abajo hacia arriba”, o “bottom-up”, manejando los fenómenos que ocurren en los procesos de formación de átomos y moléculas. Hoy en día, existe una variedad impresionante de nano objetos que conforman un zoológico de formas, texturas y propiedades.

En esta presentación, discutiremos algunos aspectos de la nanoescala, una apasionante “escala en el medio”, una doble frontera que nuestra curiosidad natural, y la enorme riqueza de nuevas tecnologías nos hace explorar y comprender. Y es en este inicio del Siglo XXI en el que las dos aproximaciones van convergiendo. La convergencia de las escuelas “top-down” y “bottom-up” es posible gracias al trabajo interdisciplinario, y da frutos impresionantes, en los cuales el dominio sobre la materia es total.



Galo Soler Illia nació en Buenos Aires en 1970. Es licenciado y doctor en Química (FCEN, UBA), y realizó un postdoctorado en nanomateriales en la Universidad de París VI. Fundó y dirigió por más de 10 años el grupo Química de Nanomateriales en la CNEA, en el que actualmente trabajan unos 20 investigadores y becarios. Actualmente, es decano fundador del Instituto de Nanosistemas de la UNSAM, que cuenta con siete investigadores de CONICET dedicados a la investigación interdisciplinaria.

Es Investigador Principal del CONICET, y profesor en la UNSAM y la UBA y fue profesor invitado en las universidades de París VI, Osaka Prefecture y Melbourne. Por sus investigaciones recibió numerosas distinciones entre las que se destacan dos Premios Houssay, y un Konex de Platino. Se dedica a diseñar y producir nuevos nanosistemas con arquitecturas inteligentes y propiedades a medida, utilizando métodos químicos inspirados en la Naturaleza. En particular, su interés se dirige al campo de los materiales mesoporosos multifuncionales, con aplicaciones en salud, medio ambiente y energía. Ha formado numerosos recursos humanos, y dirigido proyectos científicos y de colaboración con la industria, en el ámbito nacional e internacional. Ha publicado más de 130 trabajos científicos, y obtenido 5 patentes. Además, es asesor de la Fundación Argentina de Nanotecnología, publicó tres libros de divulgación sobre química y nanotecnología, y participó como columnista del programa televisivo "Científicos industria Argentina" durante diez años.

MESA REDONDA. “APLICACIONES BIOMÉDICAS”**"PERSPECTIVAS NANOTECNOLÓGICAS EMPLEANDO BENZIMIDAZOLES PARA EL TRATAMIENTO DE LA TRICHINELOSIS."****Prof. Ma. Celina Lamas**

Universidad Nacional de Rosario

E-mail: celinalamas98@gmail.com

La aplicación de la nanotecnología para el tratamiento, diagnóstico, y control de enfermedades emergentes ha experimentado un notable desarrollo en los últimos años. Entre estos sistemas se encuentran las nanopartículas poliméricas y metálicas, liposomas, micelas, puntos cuánticos, dendrímeros, microcápsulas, células, lipoproteínas, y nanoensambles. El paradigma del uso de transportadores farmacéuticos nanométricos tiene como objetivo minimizar la degradación del fármaco luego de la administración, prevenir efectos secundarios y aumentar la biodisponibilidad y la fracción del fármaco acumulado en el sitio de acción. Los agentes terapéuticos pueden encapsularse, unirse covalentemente o adsorberse sobre nanocarriers. Estos enfoques pueden superar con facilidad los problemas de solubilidad de fármacos insolubles en agua. En general, el desarrollo de nanotransportadores para fármacos poco solubles representa una tarea especial y aún enfrenta algunos problemas no resueltos. La aplicación de agentes poco solubles en agua se asocia con algunos problemas graves, ya que una baja solubilidad acuosa puede corresponderse a escasa biodisponibilidad. Teniendo en cuenta que las enfermedades parasitarias, siguen siendo uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, particularmente en los países en vías de desarrollo y actualmente, la quimioterapia es una de las mejores alternativas para el control de estas enfermedades; los tratamientos disponibles para parasitosis como la leishmaniasis, las helmintiasis y la tripanosomiasis (Enfermedad de Chagas), por citar algunas, no son efectivos para los casos crónicos ya que producen efectos secundarios severos. No se dispone de vacunas ni tratamientos preventivos, y otro factor a tener en cuenta es que el uso indiscriminado y prolongado de algunos antiparasitarios ha generado resistencia a los fármacos usados, observándose falla terapéutica. La problemática se incrementa cuando la administración de los benzimidazoles se realiza por vía oral, ya que son prácticamente insolubles en agua, siendo que la disolución de los principios activos en los fluidos biológicos es un factor indispensable para poder atravesar las membranas biológicas y absorberse.

Considerando lo anterior, hay una necesidad urgente de desarrollar nuevos sistemas terapéuticos de rápida absorción para combatir estas enfermedades, mejorando el perfil terapéutico de estos principios activos y minimizando los efectos tóxicos no deseados. La aplicación de nuevos sistemas terapéuticos a la práctica clínica ha aportado un importante avance en el campo de la tecnología farmacéutica, y ha sido posible gracias a la introducción de nuevos materiales, especialmente polímeros biocompatibles. Algunas de las ventajas que ofrecen estos sistemas es la capacidad de modificar ciertos parámetros cinéticos (velocidad de disolución y absorción) y la biodistribución de las moléculas transportadas, mejorando las alternativas terapéuticas disponibles actualmente.



Maria Celina Lamas es profesora adjunta, responsable de la asignatura Tecnología Farmacéutica, correspondiente al cuarto año de la carrera de Farmacia, dictada en la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Actualmente es la directora de la Carrera de Especialización en Esterilización. Es investigadora independiente del CONICET, cuenta con más de 40 trabajos publicados. Está dirigiendo actualmente 3 tesis doctorales y una beca postdoctoral. La principal línea de trabajo que dirige está relacionada con la síntesis de nuevos derivados de beta ciclodextrina para el diseño de sistemas terapéuticos de uso médico y su evaluación biofarmacéutica.

"SISTEMAS NANOMÉTRICOS BASADOS EN LÍPIDOS DESTINADOS AL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DE RETINA"

Santiago Daniel Palma¹ -2

UNITEFA- CONICET

Departamento de Ciencias Farmacéuticas Facultad de Ciencias Químicas – Universidad Nacional de Córdoba

E-mail: sdpalma@fcq.unc.edu.ar

La nanomedicina, considerada como uno de los campos de la nanotecnología con aplicaciones directas en medicina, se puede definir como la ciencia y la tecnología utilizada en el diseño y evaluación de sistemas complejos, a escala nanométrica, formados por al menos dos componentes, uno de los cuales es el principio activo o molécula biológicamente activa y, el segundo, es el propio sistema que genera una aplicabilidad especial relacionada con el diagnóstico, tratamiento, o prevención de una enfermedad. Estos "nanodispositivos" incluyen componentes activos u objetos en el rango comprendido desde un nanómetro hasta varios cientos de nanómetros. Los sistemas utilizados son de variada naturaleza tanto en su composición como en su estructura y podemos citar nanopartículas, nanotubos, nanocápsulas, liposomas, niosomas, nanocristales, entre otros. Nuestro grupo de investigación lleva a cabo un esquema de Investigación, Desarrollo e innovación (I+D+i) para este tipo de sistemas donde se pueden discernir tres niveles que retroalimentan las actividades previstas I) el diseño, desarrollo y caracterización de la plataforma tecnológica propiamente dicha (sistema portador), II) la optimización de procesos potencialmente escalables con base tecnológica racional (por ejemplo, operaciones de precipitación, cambios de fase, fluidos supercríticos, homogeneización, secado, etc.) y III) la evaluación de las propiedades in vivo/ex vivo, de los sistemas desarrollados incluyendo la puesta a punto de modelos experimentales en animales y los estudios de eficacia (fase preclínica). Uno de los abordajes actuales de nuestro equipo está relacionado al aumento de la permeación y/o retención de fármacos de uso oftalmológico mediante estrategias nanotecnológicas. El globo ocular se divide en dos segmentos, cada uno de los cuales contiene líquido. El segmento frontal (anterior) se extiende desde la córnea hasta el cristalino; el segmento dorsal (posterior) se extiende desde el límite posterior del cristalino hasta la retina. El segmento anterior contiene un líquido llamado humor acuoso que nutre sus estructuras internas; el segmento posterior contiene una sustancia gelatinosa llamada humor vítreo. El segmento anterior se divide en dos cámaras: la cámara frontal (anterior) y la cámara dorsal (posterior). Normalmente, el humor acuoso se genera en la cámara posterior, atraviesa la pupila y llega a la cámara anterior, y luego sale del globo ocular a través de los canales específicos para tal fin, que se encuentran en el borde del iris. Se pueden establecer prioridades en cuanto a la necesidad de mejora en la farmacoterapia oftálmica a nivel de segmento posterior:

a) Lograr mantener concentraciones prolongadas de principios activos en el vítreo con el objetivo de espaciar las inyecciones intraoculares.

b) Lograr niveles terapéuticos de fármacos o moléculas bioactivas en vítreo mediante una administración tópica excluyendo así la necesidad de inyecciones.

c) Disminuir los efectos adversos de la administración intravítrea de principios activos

La córnea es uno de los obstáculos más selectivos para la permeación de moléculas extrañas al interior del ojo, y el diseño de nuevos sistemas que permitan alcanzar tejidos intraoculares para el tratamiento de patologías del segmento anterior (por ejemplo, glaucoma) sigue siendo una problemática altamente relevante. Sin embargo, la permeación transcorneal de fármacos administrados por vía tópica destinados al segmento posterior, es una de las grandes metas de la farmacoterapia moderna. La razón es que, actualmente, la mejor manera de tratar patologías del segmento posterior (por ejemplo, inflamación intraocular, edemas maculares, neovascularizaciones) es mediante la inyección de fármacos en el vítreo. El humor vítreo es una estructura gelatinosa, libre de células, que es capaz de retener las moléculas y entregarlas a las estructuras cercanas, como el cuerpo ciliar o el epitelio pigmentario retinal (EPR), un componente vital de la retina. Además del neto carácter invasivo de una inyección intraocular y la escasa o nula aceptación por parte del paciente, para la mayoría de los trastornos de la retina, es necesario un número importante de aplicaciones. Estas inyecciones presentan posibles efectos secundarios como mayor riesgo de desarrollo de cataratas, hemorragias del vítreo, desprendimiento de retina y endoftalmitis. Por otra parte, representan un

mayor riesgo de infecciones. Por estos motivos y, considerando el creciente aumento de patologías del segmento posterior (entre otros factores, como consecuencia del incremento de la expectativa de vida), se hace preciso el diseño de nuevas plataformas tecnológicas que permitan a los fármacos alcanzar tejidos intraoculares, y particularmente el humor vítreo, desde el exterior del ojo (aplicación tópica o periocular). En particular, las patologías que afectan al segmento posterior del ojo se caracterizan por ser devastadoras y comprometer la visión en un gran número de sujetos. Dada la gravedad de estas enfermedades, resulta primordial tanto la instauración rápida del tratamiento como el mantenimiento de concentraciones eficaces, en el lugar de acción, durante el mayor tiempo posible.

El acceso de fármacos y/o moléculas bioactivas al segmento posterior del ojo es un importante desafío debido a las limitaciones anatómicas y fisiológicas antes descritas. Existe una creciente necesidad de lograr soluciones terapéuticas innovadoras, problema que se acentúa por el aumento del número de nuevas entidades terapéuticas (por ejemplo, oligonucleótidos, aptámeros y anticuerpos) y la necesidad de terapia crónica. Actualmente, las inyecciones intravítreas son ampliamente utilizadas para alcanzar concentraciones terapéuticas a nivel de retina. Sin embargo, la administración frecuente de este tipo de formulaciones por esta vía puede conducir a diferentes efectos no deseados graves como el desprendimiento de retina, endoftalmitis y el aumento de la presión intraocular. Las enfermedades neurodegenerativas son en la actualidad uno de los grandes desafíos de la investigación básica y clínica. A nivel retinal, varias patologías como el glaucoma, las retinopatías proliferativas como la retinopatía diabética proliferativa (RDP), la retinopatía del prematuro (ROP), la Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE) y la Retinitis Pigmentosa no cuentan hasta el momento con cura o tratamiento efectivo. La incidencia de este grupo de enfermedades está aumentando en la actualidad como consecuencia de la extensión de la expectativa de vida en el mundo occidental. Independientemente de su origen, todas estas enfermedades tienen como característica común la muerte de neuronas, provocando discapacidad visual y hasta ceguera. Esto se traduce en una inversión económica en políticas de salud muy importante dado que en muchos casos estas cegueras podrían ser prevenibles o curables. De esta manera cobra gran importancia el hallazgo de nuevos enfoques terapéuticos para evitar la muerte neuronal involucrada en la mayoría de las patologías oculares. En ese marco, durante la ponencia en la JORNADA CIENTIFICA – ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA 2017 se mostrarán algunos resultados obtenidos con nanocápsulas basadas en lípidos cargadas con triamcinolona y/o Bevacizumab y su potencial aplicación al tratamiento de patologías degenerativas de retina.



Daniel Palma es FARMACÉUTICO (1996), BIOQUÍMICO (1998) y DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS (2003) todos los títulos obtenidos en la Universidad Nacional de Córdoba (UNC), Argentina. Realizó su estancia posdoctoral en la Università degli Studi di Firenze (Italia) durante el año 2005.

Actualmente es Investigador Principal de CONICET y Profesor Asociado de la Universidad Nacional de Córdoba. Su proyecto de Investigación relacionado al “diseño, desarrollo y evaluación de Plataformas tecnológicas de liberación de fármacos” recibe financiamiento de diferentes organismos Nacionales e internacionales como CONICET, SECyT-UNC, FONCyT, MAE-MINCYT. Ha publicado más de 75 trabajos científicos en revistas internacionales y posee 5 Patentes de Invención. Ha contribuido con más de 170 trabajos científicos en Congresos Nacionales e internacionales y ha recibido numerosos premios vinculados a su actividad científica y profesional.

Es miembro titular de la comisión directiva de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE) y miembro de la Cátedra Iberoamericana Suiza de Medicamentos. Participa de diferentes sociedades científicas entre las que se destacan la Asociación Argentina de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO) y su participación en el comité ejecutivo de la Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas, RICIFA. Ha sido Director del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas - UNC, Director del Centro de Información de Medicamentos (CIME) de la Universidad Nacional de Córdoba y consejero de la Facultad de Ciencias Químicas en dos oportunidades.

"MATERIAL ANTIMICROBIANO INTELIGENTE A BASE DE QUERATINA Y NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC"

Dra. María Emilia Villanueva

Universidad de Buenos Aires
E-mail: mevillanueva@ffyb.uba.ar

Los apósitos constituyen el tratamiento más utilizado para curar heridas crónicas (por ejemplo, escaras y úlceras diabéticas) ya que crean una barrera que las aísla del medio ambiente, protegiéndola de traumatismos y la contaminación microbiana.¹ En las últimas décadas, se han utilizado los hidrogeles para diseñar apósitos, ya que pueden hincharse (*swelling*) en medio líquido y mantener un ambiente húmedo, evitando así la deshidratación de la herida. Esto provee condiciones óptimas para reducir el dolor, promover la movilidad celular y mantener la hidratación y estructura tisular. Para evitar la contaminación bacteriana, en numerosos casos se han incorporado agentes antibacterianos para prevenir y/o tratar la infección.

Dentro de los precursores para la obtención de hidrogeles, de bajo costo y alta disponibilidad, se encuentra la queratina. La misma puede obtenerse a partir de materiales residuales de la industria ganadera y avícola, tales como pelo, lana, pezuñas, cuernos, plumas, etc.²⁻⁴ Debido a las características del material pueden obtenerse estructuras porosas tipo esponja o películas flexibles.^{5,6} Así surge el actual interés de la obtención de materiales híbridos a base de queratina, dentro de los cuales pueden mencionarse principalmente desarrollos que conjugan estas proteínas con contrapartes orgánicas, por ejemplo quitosano-queratina, poliláctico-queratina o gelatina-queratina.^{7,8}

La incorporación de materiales nanoparticulados en diferentes matrices ha atraído la atención por haber demostrado la capacidad de reforzar la estructura de biomateriales^{9,10} y de adicionar otras características como ser el poder antimicrobiano, entre otras.¹¹⁻¹³ En este sentido el estudio de la incorporación de nanopartículas presenta una prometedora alternativa para la obtención de híbridos orgánico-inorgánico para ser utilizados como apósitos.¹⁴⁻¹⁶ Las nanopartículas de Óxido de Zinc (nZnO) poseen actividad antibacteriana y actualmente se utilizan en muchos productos cosméticos.¹⁷ Se ha demostrado que las nZnO poseen una potente actividad antibacteriana y no generan efectos adversos en células eucariotas.¹⁸ Es más, los iones de zinc liberados desde las nanopartículas promueven la migración de queratinocitos hacia la herida, favoreciendo la sanación de la misma.¹⁹⁻²¹

Por otro lado, el desarrollo de materiales inteligentes representan la base para el desarrollo de nuevas tecnologías, en el futuro serán éstos los que se utilizarán como materia prima. Un tipo de material inteligente son aquellos sensibles al cambio de pH, que pueden ser utilizados en numerosos campos como ser terapia génica y manipulación celular.

En el presente trabajo se abordó el estudio en lo referente a la obtención de hidrogeles antimicrobianos inteligentes para su potencial uso como apósitos, en los cuales el agente biocida se libera en mayor medida de existir una contaminación bacteriana. El pH de una herida crónica es básico debido a los productos del metabolismo bacteriano y, a medida que la herida sana, se vuelve cada vez más ácido. De esta forma, cuando la contaminación bacteriana sea baja, el pH del medio será más bajo con lo que la hinchazón del gel, el tamaño del poro y la liberación de las nanopartículas serán menores. Con el cambio de pH que ocurre como consecuencia de la contaminación bacteriana, el apósito de hidrogel de queratina se hinchará, aumentará el tamaño del poro y la liberación del agente biocida nanoparticulado ocurrirá en mayor medida.

En este proyecto se buscó desarrollar técnicas y utilizar materiales que signifiquen una mejora, no sólo en lo referente a lo tecnológico y sanitario, sino también en cuanto a la protección del medio ambiente. Es por esto que como material de base para la preparación de los hidrogeles, se utilizó queratina, una proteína biodegradable y biocompatible y que además es un producto de desecho de la industria ganadera. Como agente biocida se utilizaron nZnO. El hidrogel se realizó con queratina obtenida a partir de cuerno de bovino, gracias a la hidrólisis suave realizada en etanol, baja concentración de NaOH y una temperatura moderada (45 °C). Las nanopartículas se obtuvieron en medio acuoso para garantizar que su producción provoque el menor impacto posible al medio ambiente. De esta forma también se previene una posible mayor toxicidad - tanto para el usuario del producto como para los operarios- que podría ocurrir al utilizar solventes no acuosos.

Es más, dado que en la actualidad se sostiene que la forma más segura de manipulación de las nanopartículas es en suspensión, al evitar que éstas deban ser secadas, se generara un beneficio extra para contribuir a la seguridad de los operarios.

Se obtuvo como producto un material maleable, con buena resistencia mecánica, adaptable, flexible y de fácil manipulación. Además, se ha obtenido un material inteligente el cuál responde a los cambios de pH del medio. Se detectaron dos extremos, a pH básico la matriz del gel se expande aumentando el *swelling* y a pH ácido colapsa, disminuyéndolo. Se evaluaron las características fisicoquímicas y funcionales de hidrogeles dopados con diferentes concentraciones de nZnO (1, 5 y 10 %). La caracterización del material se llevó a cabo mediante diferentes técnicas, Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier, Microscopía electrónica de barrido y ensayos de *swelling* a diferentes pHs. Al analizar los espectros de FT-IR de las nZnO y de los geles, se encontraron bandas características del ZnO y de la queratina respectivamente. En el caso de los hidrogeles con las nZnO, no se observaron las bandas correspondientes a las nanopartículas probablemente debido a la baja concentración de las mismas. Al realizar la caracterización mediante SEM de las nZnO se observó que las mismas tienen dimensiones de nanoescala, forma de nanoplatos y son polidispersas. El diámetro promedio de las nanopartículas es $342,0 \pm 69,2$ nm y el espesor $31,1 \pm 8,8$ nm. Para estudiar la topografía microscópica de los geles, éstos fueron también observados en el SEM. Se observaron estructuras porosas, que se corresponden con las imágenes obtenidas anteriormente para los geles equilibrados a pH 7. Se comprobó la presencia de nZnO en las diferentes concentraciones. Solo se observó una distribución heterogénea en cuando estas se encuentran en un 10%. Se realizaron ensayos antimicrobianos en los cuáles se comprobó la capacidad biocida de las nZnO frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Todos los hidrogeles conteniendo nanopartículas mostraron actividad antibacteriana y esta fue mayor con concentraciones mayores de las mismas. Al evaluar la liberación de las nanopartículas a diferentes valores de pH se comprobó que la liberación del agente antimicrobiano ocurre efectivamente en mayor medida a pHs más básicos. Los ensayos de citotoxicidad realizados revelaron que los hidrogeles son citotóxicos si la concentración de nZnO es mayor 10 %. A concentraciones menores no se observa este efecto, con viabilidades superiores al 90 %. Es por esto que se propone utilizar los hidrogeles que poseen un 5% de nZnO. En estos geles se observa una buena actividad biocida sin actividad citotóxica y una respuesta al pH óptima.

REFERENCIAS

- 1 L. G. Ovington, Clin. Dermatol., 2007, 25, 33–38.
- 2 P. Gao, K. Li, Z. Liu, B. Liu, C. Ma, G. Xue and M. Zhou, Water. Air. Soil Pollut., 2014, 225, 1–13.
- 3 P. Gao, Z. Liu, X. Wu, Z. Cao, Y. Zhuang, W. Sun, G. Xue and M. Zhou, CLEAN–Soil Air Water, 2014, 42, 1558–1566.
- 4 F. Banat, S. Al-Asheh and D. Al-Rousan, Adsorpt. Sci. Technol., 2002, 20, 393–416.
- 5 R. C. de Guzman, M. R. Merrill, J. R. Richter, R. I. Hamzi, O. K. Greengauz-Roberts and M. E. Van Dyke, Biomaterials, 2011, 32, 8205–8217.
- 6 P. Hill, H. Brantley and M. Van Dyke, Biomaterials, 2010, 31, 585–593.
- 7 M.-S. Kim, Y.-J. Choi, I. Noh and G. Tae, J. Biomed. Mater. Res. A, 2007, 83, 674–682.
- 8 C. M. Hassan and N. A. Peppas, in Biopolymers • PVA Hydrogels, Anionic Polymerisation Nanocomposites, Springer, 2000, pp. 37–65.
- 9 K. A. M. Amin, Polymers, 2012, 4, 590–599.
- 10 C. Rodríguez-González, A. L. Martínez-Hernández, V. M. Castaño, O. V. Kharissova, R. S. Ruoff and C. Velasco-Santos, Ind. Eng. Chem. Res., 2012, 51, 3619–3629.
- 11 N. Padmavathy and R. Vijayaraghavan, Sci. Technol. Adv. Mater.
- 12 C. Wang, L.-L. Liu, A.-T. Zhang, P. Xie, J.-J. Lu and X.-T. Zou, Afr. J. Biotechnol., 2016, 11, 10248–10254.
- 13 C. Marambio-Jones and E. M. Hoek, J. Nanoparticle Res., 2010, 12, 1531–1551.
- 14 P. T. Kumar, V.-K. Lakshmanan, R. Biswas, S. V. Nair and R. Jayakumar, J. Biomed. Nanotechnol., 2012, 8, 891–900.
- 15 K. T. Shalumon, K. H. Anulekha, S. V. Nair, S. V. Nair, K. P. Chennazhi and R. Jayakumar, Int. J. Biol. Macromol., 2011, 49, 247–254.
- 16 P. T. Sudheesh Kumar, V.-K. Lakshmanan, T. V. Anilkumar, C. Ramya, P. Reshmi, A. G. Unnikrishnan, S. V. Nair and R. Jayakumar, ACS Appl. Mater. Interfaces, 2012, 4, 2618–2629.



María Emilia Villanueva es Farmacéutica de la UBA (2011) y realizó su doctorado en la UBA (2015) el desarrollo de superficies y materiales nanoestructurados como estrategia para el control de la colonización bacteriana/ de la formación de biofilms, bajo la dirección del Dr. Guillermo Copello y el Profesor Sergio Téves. Actualmente es Jefe de Trabajos Prácticos en la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, becaria de posdoctorado CONICET en el IQIMEFA-UBA-CONICET y forma parte del Grupo de Investigación en Nanotecnología y Polímeros Sustentables. En el año 2016 fue

ganadora de la Beca de L'Oréal-UNESCO "Por las mujeres en la ciencia" por su proyecto "Apósitos antibacterianos inteligentes a base de queratina y nanopartículas de Óxido de Zinc". Su línea de investigación actual se focaliza en la combinación de polímeros naturales y nanotecnología para desarrollo, caracterización y aplicación de materiales sustentables. Esta línea se apoya en la idea de rediseñar productos o reemplazarlos para que sus procesos de producción, etapa de uso y fin de vida útil sean amigables con el medio ambiente, la sociedad y al mismo tiempo sustentables económicamente.

"CRISTALES LÍQUIDOS COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS"**Acad. Daniel Allemandi**

Universidad Nacional de Córdoba

E-mail: dalemand@gmail.com

Un **cristal líquido liotrópico** consiste en un sistema de dos o más componentes que presentan propiedades de cristales líquidos en cierto rango de concentración. Los lípidos polares que forman este tipo de estructuras son capaces de absorber cierta cantidad de agua y formar espontáneamente fases viscosas (tipo gel) con una conformación interna única en las cuales se pueden incorporar fármacos, tanto hidrofílicos como hidrofóbicos. Además, generalmente presentan propiedades no tóxicas, biodegradables y bioadhesivas lo cual transforman a estos sistemas como potencialmente útiles para la administración de fármacos por distintas vías. Sumado a esto, al alta viscosidad del sistema posibilita la obtención de sistemas nanoparticulados (cubosomas, hexosomas) que han mostrado ser muy promisorios como sistemas transportadores de fármacos.

La versatilidad de estos sistemas permite el diseño de distintas formulación tales como geles o nanopartículas. De este modo, se han desarrollado sistemas muy fluidos que, luego de ponerse en contacto con el medio biológico acuoso (ej. saco ocular, tejido subcutáneo, etc) adquiere consistencia rígida transformándose en una sistemas con capacidad de liberar el fármaco de forma sostenida. Estos sistemas pueden ser de gran utilidad como sistemas depot. Además, el agregado de distintos excipientes y sustancias adyuvantes pueden optimizar la performance de estas nanopartículas. Por ejemplo, pueden ser modificados en superficie y pueden responder a distintos estímulos del medio (pH, luz, temperatura, radiación). De este modo, han mostrado ser útiles para su utilización en terapia, diagnóstico y como biosensores.

Por otro lado, estos geles rígidos formados a partir de la hidratación de estos lípidos polares pueden ser nanoparticulados, dando origen a sistemas transportadores con las variadas ventajas que presentan los sistemas nanoparticulados en cuanto a la vectorización y aumento de biodisponibilidad de diferentes fármacos. Estos sistemas han sido estudiados para la vehiculización de fármacos muy diversos, y para su administración por diferentes vías. Incluso, han sido explorados como vehículos de activos utilizados en disciplinas diferentes a las nanomedicinas (ej. aplicación de agroquímicos).

En esta presentación, se abordará esta temática, focalizando principalmente en las características generales de estos sistemas, algunos sistemas desarrollados y aplicaciones de los mismos.



Daniel Allemandi es Farmacéutico y Dr. en Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Se desempeña como Profesor Titular, Dpto. de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNC y como Investigador Principal, CIC CONICET. Su área de trabajo abarca la tecnología farmacéutica, nuevos sistemas de liberación modificada de fármacos. También es Director de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica, UNITEFA CONICET-UNC. Es autor de más de 90 publicaciones en revistas científicas nacionales e internacionales. Dirige investigadores, becarios y tesis (6 finalizadas, 1 en curso). Titular de numerosos subsidios otorgados por distintas instituciones tales como SECyT-UNC, CONICET y FONCyT, entre otros. Ha participado como par evaluador de carreras de posgrado y subsidios de investigación de diversas instituciones. Es miembro de la Comisión Permanente de Farmacopea Argentina.

"NANOSISTEMAS COMO POTENCIALES AGENTES DE DIAGNÓSTICO POR IMÁGENES"**Prof. Dr. Romina Glisoni N. Lecota, M. Fernández Lomonaco*^a, P. Cabrala y R.J. Glisoni*^b**

*^a Laboratorio Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay. *^b Instituto NANOBIOTEC UBA-CONICET, Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

E-mail: romy.glisoni@gmail.com

La cirugía guiada por imagen (IGS) se encuentra ampliamente utilizada en la clínica actual para localizar los ganglios centinela (SLN) provenientes de tumores primarios de mama, piel, colorectal, pulmón, entre otros procedimientos [1]. IGS es asistida por un agente de contraste fluorescente de infrarrojo cercano (NIR) para localizar la posición de SLN. Una biopsia de ganglio linfático centinela (SLNB), es un procedimiento en el que se identifica, se extirpa y se analiza SLN para determinar si contiene células cancerosas. Un resultado positivo de SLNB indica que el cáncer está presente en SLN y posiblemente puede estar presente en otros ganglios linfáticos regionales, así como en ciertos órganos [1]. Indocianina verde (ICG) es un fluoróforo NIR soluble en agua aprobado por la FDA, utilizado para diversos fines de diagnóstico, entre ellos IGS/SLNB [1,2]. ICG tiende a la autoagregación en solución acuosa para formar dímeros y oligómeros, dependiendo de la concentración utilizada [1,2]. Como resultado de esto, se produce la extinción de la fluorescencia de ICG, reduciendo la eficacia. Es así que, en los últimos años, se han investigado nanosistemas que encapsulan ICG para aumentar su estabilidad fisicoquímica y que permitirían mejorar las imágenes obtenidas [1,2]. 99mTc-nanocoloides como, por ejemplo, aquellos a base de nanopartículas de albúmina y el fluoróforo ICG (ICG-99mTc-Nanocolloid) han sido los radiomarcadores estándares más utilizados para la cartografía del ganglio centinela en el último tiempo. A su vez, Lymphoseek® (99mTc-Tilmanocept), es un sistema polimérico novedoso, que ha sido aprobado por la FDA como un agente de localización linfática específica de tumores sólidos [3]. Este híbrido, de aproximadamente 16.7 KDa de peso molecular (MW), está compuesto por una cadena polimérica de dextrano unido de forma covalente a: (i) múltiples unidades de manosa y (ii) 99mTc-dietilentriaminopentaacético (99mTc-DTPA) [3]. Su estructura agregada despliega un tamaño hidrodinámico de aproximadamente 7 nm en dispersión. La manosa posee elevada afinidad por los receptores CD-206 altamente sobreexpresados en la superficie de los macrófagos y células dendríticas. Al unirse firmemente a estos receptores de manosa, Lymphoseek® se acumula en el tejido linfático en pocos minutos y localiza los ganglios linfáticos que drenan el tumor [3].

Los copolímeros anfifílicos en bloque a base de poli(óxido de etileno)-b-poli(óxido de propileno) (PEO-PPO) tienen la propiedad de formar PMs estables en medio acuoso por arriba de su concentración micelar crítica (CMC), con un tamaño hidrodinámico promedio de 15 a 25 nm, dependiendo el material utilizado [4,5]. El núcleo permite la solubilización y/o estabilización fisicoquímica de moléculas hidrófobas mientras que la corona hidrofílica estabiliza el sistema [4,5]. PMs a base de PEO-PPOs han sido también investigadas en el direccionamiento pasivo de fármacos a tumores capitalizando el efecto de permeación y retención mejorada (EPR) [5,7]. Nuestro grupo ha trabajado exhaustivamente, en los últimos años, en el recubrimiento de PMs con residuos del tipo glucosa (Glu), que no sólo estabilizarían el sistema coloidal debido a formación de múltiples enlaces de hidrógeno en la corona micelar, sino que también favorecerían la internalización mediada por receptor a la célula diana y la potencial acumulación en el tumor debido a una mayor captación celular a expensas del aumento exacerbado del metabolismo de dicho azúcar en las células tumorales [6,8]. En este contexto, es que resultó de nuestro interés explorar el diseño y desarrollo de una nueva formulación micelar que incorpore eficientemente ICG con propiedades fisicoquímicas mejoradas tales como: (i) una fluorescencia óptima, (ii) una mejor estabilidad en medio acuoso y (iii) una semivida más larga en circulación, utilizando PMs a base de PEO-PPO (F127, MW~12.6 KDa y T1307 MW~18 KDa) y sus novedosos derivados glucosilados sintetizados (F127-Glu, MW~13 KDa y T1307-Glu, MW~19 KDa). Dichos nanosistemas cargados con ICG, así como ICG libre comercial en solución, fueron evaluados en cuanto a su captación por el ganglio centinela, post-administración intradérmica de modelos murinos los cuales fueron analizados in vivo, a distintos intervalos pre-establecidos de tiempo, utilizando un equipo FX-MX-Pro camera (Bruker). Los

resultados obtenidos revelaron una captación eficiente de la fluorescencia en el ganglio primario hasta dos horas post-inyección para T1307-Glu/ICG PMs, mientras que se evidenció permanencia de la fluorescencia en el sitio de inyección para la ICG libre comercial. Si bien, esta estrategia se ha investigado con propósitos de diagnóstico en una primera instancia, similares enfoques podrían ser explorados para la administración de diversas moléculas antitumorales en el futuro. Es por ello, que también se ha estudiado la captación preferencial (FX-MX-Pro camera) de estos nanosistemas cargados con ICG, en ratones BALB/C portadores de tumores de mama inducidos con células 4T1 (modelo de tumor de mama murino símil estadio IV humano), con resultados muy alentadores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Hill TK, et al. Image-guided tumor surgery: will there be a role for fluorescent nanoparticles? Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2016; 8, 4, 498–511.
- [2] Schaafsma BE, et al. The Clinical Use of Indocyanine Green as a Near-Infrared Fluorescent Contrast Agent for Image-Guided Oncologic Surgery. Journal of Surgical Oncology 2011; 104, 323-332.
- [3] Surasi DV, et al. ^{99m}Tc-Tilmanocept: A Novel Molecular Agent for Lymphatic Mapping and Sentinel Lymph Node Localization. J. Nucl. Med. Technol. 2015; 43, 87-91.
- [4] Glisoni RJ, et al. Encapsulation of the Antimicrobial and immunomodulator agent nitazoxanide within polymeric micelles. J. Nanosci. Nanotechnol. 2014, 14, 4670-4682.
- [5] Sosnik A, et al. Poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2007; 66, 303–317.
- [6] Glisoni RJ, et al. Novel Poly(Ethylene Oxide)-b-Poly(Propylene Oxide) Copolymer-Glucose Conjugate by the Microwave-Assisted Ring Opening of a Sugar Lactone. Macromolecular Bioscience. 2014; 14, 1639-1651.
- [7] Torchilin V, et al. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. Advanced Drug Delivery Reviews. 2011; 63,131-135.
- [8] Carvalho KC, et al. GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. Clinics. 2011, 66, 965-972



Romina J. Glisoni es farmacéutica (FFyB-UBA, 2008), Doctora de la Universidad de Buenos Aires, Área Farmacia y Bioquímica (2012) e Investigadora Adjunta del Instituto NANOBIOTEC UBA-CONICET (FFyB-UBA). Se desempeña como Profesora Adjunta de la Cátedra de Tecnología Farmacéutica II y Profesora Responsable y Coordinadora Docente de la Materia Desarrollo Galénico perteneciente a la Carrera de Especialización en *Desarrollo Galénico y Producción Farmacéutica*, FFyB-UBA desde el año 2014. Desde el 2013, RJ Glisoni se desempeña como miembro de la Comisión

Directiva de la Asociación Argentina de Nanomedicinas (NANOMED-AR). Es coautora de numerosos artículos científicos internacionales con referato y lleva adelante colaboraciones científicas nacionales e internacionales en áreas de investigación relacionadas. RJ Glisoni cuenta con más de 12 años de experiencia en la síntesis química y estudio de polímeros anfífilos, micelas poliméricas, nanopartículas, ciclodextrinas y otros nanotransportadores para la encapsulación, estabilización y liberación de fármacos. En los últimos años, se encuentra fuertemente abocada a la modificación química de la superficie de nanoestructuras para el direccionamiento activo en el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Por último, RJ Glisoni realiza asesorías técnicas y actividades de I&D relacionadas en el marco de transferencia tecnológica para reconocidos laboratorios de la industria farmacéutica.

“DESARROLLO DE NANOSISTEMAS PARA LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS EMPLEANDO SISTEMAS BIOLÓGICOS”

Prof. Dr. Guillermo R. Castro

Universidad Nacional de La Plata
E-Mail: grcastro@gmail.com

La administración de fármacos presenta serios desafíos en ciertas patologías agudas y crónicas. La mayoría de los fármacos disponibles en el mercado están asociados a alguna patología secundaria indeseable. Típicamente, en algunas terapias se manifiestan visualmente, como en el caso de las quimioterapias oncológicas, en cuyos pacientes se pueden observar problemas de motricidad, náuseas y vómitos, cansancio, caída de cabello, entre otros, efectos que van en detrimento de la calidad de vida de los pacientes. En los últimos 40 años, algunos avances se han realizado a ese respecto mediante el desarrollo de vehículos para el transporte y posterior administración de unas pocas moléculas de uso terapéutico. Uno de los casos más emblemáticos es el Doxil™, doxorubicina liposomal, que ha mejorado la eficiencia terapéutica del fármaco. Sin embargo, los avances en sistemas de liberación controlada de moléculas son todavía escasos (i.e. anticonceptivos, calmantes, nicotina) y representan un desafío a nivel terapéutico e industrial. Los avances científicos en las últimas décadas han abierto nuevos horizontes que han permitido el desarrollo de las nano- y micro-tecnologías, las cuales han empezado a cristalizarse en nuevos dispositivos con una gran variedad de aplicaciones industriales en diversos campos.

Es en este marco que desde 2007, el Laboratorio de Nanobiomateriales desarrolla sistemas inteligentes, sensibles a cambios ambientales, de liberación controlada de moléculas basados en biopolímeros. Los estudios han sido enfocados al desarrollo de micropartículas, parches, sistemas mesoporosos híbridos inorgánicos-biopoliméricas, y nanopartículas sólidas lipídicas. Los modelos moleculares de estudio han sido las antracilinas, dada su elevada toxicidad; y las fluoroquinolonas debido a su extensivo empleo y efectos secundarios. Y se ha estudiado la incorporación de enzimas con acción terapéutica en las formulaciones.

Nuestra opción por biopolímeros para el desarrollo de matrices se basa en la sustentabilidad de su síntesis (i.e. Química Verde), una gran diversidad estructural, molecular y funcional, poseen estereoespecificidad y regioselectividad, pesos moleculares establecidos (biosíntesis), son pasibles de efectuar cambios estructurales y funcionales en las moléculas mediante técnicas suaves, elevada capacidad de gelación empleando técnicas entrecruzamiento simples, su biodegradabilidad, la interacción con moléculas tanto hidrofóbicas como hidrofílicas, su elevada disponibilidad en el mercado, y sus bajos costos. Y desde el punto de vista regulatorio, se seleccionaron aquellas que son consideradas seguras para uso humano (*Generally Regarded As Safe, F.D.A., EE.UU.*). Entre los biopolímeros seleccionados se pueden mencionar las pectinas (con diversos grados de metoxilación), alginatos, carrageninas, celulosa bacteriana, gelatina, gomas arábica y guar, kefiran, quitosanos.

Para el encapsulamiento de los activos se procedió a realizar un previo *screening* con diversos biopolímeros. Se estudiaron las interacciones de las moléculas a transportar y los biopolímeros bajo diferentes condiciones fisicoquímicas. Con los polímeros seleccionados se desarrollaron las formulaciones y las estructuras obtenidas (e.g. nanopartículas, películas) fueron sometidos a análisis biofísicos y cinéticos de liberación de las moléculas cargo y de degradación de las matrices. De manera subsecuente, los comportamientos de las formulaciones seleccionadas fueron estudiadas en cultivos celulares microbianos y de mamíferos, dependiendo de la molécula cargo y a su vez, se realizaron estudios de citotoxicidad. Fue observado que las moléculas de uso terapéutico que presentan problemas de solubilidad, y/o agregación y/o precipitación en condiciones fisiológicas, en las formulaciones mostraban mejor actividad terapéutica contra tumores y antimicrobiana en los casos respectivos. Lo cual induce a considerar la posibilidad de disminución de las dosis a administrar.

A su vez, se pudo establecer que las adiciones de enzimas en las formulaciones poseen un efecto sinérgico con las moléculas biológicamente activas, el cual permite incrementar la efectividad terapéutica del tratamiento sugiriendo que pares antibióticos-enzimas podrán mejorar las terapias. Este hecho es particularmente relevante en el caso de moléculas de elevada citotoxicidad y en los casos en donde la

erradicación de la patología requiere de elevadas concentraciones de fármacos. Sin embargo, se debe considerar que es necesario desarrollar técnicas de estabilización de las enzimas, debido a que son catalizadores biológicos, no de procesos.

Por último, el uso de biomoléculas como transportadores constituye un campo promisorio de explorar para la administración de fármacos, lo cuales pueden complementarse con otras biomoléculas (i.e. enzimas, proteínas terapéuticas, etc...) para mejorar la efectividad de los tratamientos y la calidad de vida de los pacientes.



Guillermo Raúl Castro es Lic. en Química y Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Argentina, posiciones posdoctorales en el *Dept of Chemistry, Massachusetts Institute of Technology* (1996-1998, Cambridge, EE.UU.) y en *Tufts University* (Boston, EE.UU.), posteriormente Investigador Asociado y luego Profesor Adjunto en el *Dept of Biomedical Eng., Tufts University* (2001-2006, EE.UU.). Posiciones presentes: Investigador (cat. Principal, CONICET, Argentina); Profesor (cat. Titular Ordinario, Área Biotecnología, Depto. de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina). Responsable del Laboratorio de Nanobiomateriales (CINDEFI, La Plata, Argentina). Producción científica: 5 patentes, más de 130 publicaciones and capítulos de libros. Áreas de interés: liberación controlada de moléculas, biocatálisis, biopolímeros, caracterización de micro- y nano-matrices.

“APLICACIONES MICRO- Y NANOTECNOLÓGICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS”

Prof. Dr. Claudio Salomón

Universidad Nacional de Rosario
E-Mail: claudiojsalomon@gmail.com

Las enfermedades olvidadas o desatendidas (neglected diseases) son aquellas que afectan a un número importante de personas a nivel mundial, pero carecen del interés de las políticas públicas y privadas de producción de medicamentos. Ciertos estudios estiman que más de 1 billón de personas padecen enfermedades olvidadas, como las helmintiasis, malaria, tuberculosis, enfermedad de Chagas y leishmaniasis, entre otras. Estas infecciones afectan exclusivamente a las poblaciones de los países en desarrollo, las cuales permanecen fuera del mercado, así como de los esfuerzos y los objetivos de I+D de la industria farmacéutica.

La enfermedad de Chagas es la principal endemia en la República Argentina, con un estimado cercano a 2.5 millones de personas infectadas y más de 7 millones en riesgo de contraer la enfermedad, de acuerdo a datos del año 2009. Argentina es el tercer país en el mundo con prevalencia serológica de Chagas, después de Bolivia (18%) y Paraguay (9,2%). Además de las cifras mencionadas, se debe tener en cuenta como problema sanitario agregado, la fuerte migración desde los dos países de mayor endemidad, hecho que aumenta la casuística nacional. La región más afectada es la del centro y noroeste, disminuyendo la infección hacia el sur y el este del país. En Argentina, la cantidad de niños menores de 15 años con Chagas se estima en 306.000, es decir, un 3,4% de la población total de ese grupo etáreo. Esta cifra tiene particular importancia dado que el 98% de los casos nuevos de Chagas ocurren en menores de 15 años siendo en este rango de edad cuando el tratamiento específico resulta más efectivo. Hasta la actualidad y desde hace casi 40 años, hay solamente dos drogas para el tratamiento del Mal de Chagas.: nifurtimox y benznidazol. El nifurtimox (Bayer 2502, Lampit®) [5-nitrofurán (3-methyl-4-(5'-nitrofururylideneamine) tetrahydro-4H-1,4-tiazine-1,1-dioxide (Bayer 2502)] fue aprobado para su uso en 1965, en tanto que el benznidazol (RO7-1051, Rochagam® en Brasil, Radanil® en Argentina) [2-nitroimidazole (Nbenzyl-2-nitroimidazole acetamide (RO7-1051)] En nuestro país y en gran parte del continente americano y europeo, benznidazol es el fármaco de elección para el tratamiento de esta parasitosis. Sin embargo, presenta propiedades físicoquímicas desfavorables, las que comprometen su eficacia o seguridad y en consecuencia, se requieren nuevas estrategias de formulación para superar tales deficiencias. Se debe mencionar que hasta la fecha no hay un criterio único sobre dos propiedades fundamentales de dicha molécula:

La solubilidad y la permeabilidad. Algunos autores describen que Benznidazol pertenece a la clase II del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (CBS) indicando una baja solubilidad y alta permeabilidad, mientras que otros lo incluyen en la clase III, que indica una alta solubilidad y baja permeabilidad. En todo caso, la formulación de este tipo de fármacos plantea numerosos e importantes problemas derivados del hecho de que su biodisponibilidad oral es incompleta, variable y dependiente de factores como la ingestión concomitante de alimentos.

De acuerdo con la OMS, la dosificación de Benznidazol en adultos es: 5-7,5 mg/kg por vía oral en dos tomas separadas, administradas a diario durante 30 o 60 días, mientras que en niños (hasta 12 años) es 10 mg/kg por vía oral en dos tomas separadas, administradas a diario durante 60 días.⁸ Este fármaco presenta efectos secundarios, caracterizados por reacciones cutáneas (exantema macular pruriginoso), polineuropatías, trastornos gastrointestinales (náuseas, diarreas), síndrome febril, cefalea y vértigo, con una incidencia del 25% en los casos agudos y del 40% en los crónicos. A pesar del incremento de esta parasitosis en niños, el Benznidazol tiene una única presentación farmacéutica en comprimidos de 100 mg. que impide el correcto tratamiento pediátrico. Recientemente se ha inscripto en la ANMAT una nueva presentación, producida por un laboratorio argentino, de comprimidos de 50 y 100 mg. También se encuentra en estudios clínicos y ya registrado en Brasil, un comprimido de rápida disolución de 12.5 mg, por parte de un laboratorio de Brasil en conjunto con la organización DNDI. Sin embargo, hasta la fecha no se han desarrollado formulaciones alternativas sólidas tales como micropartículas y nanopartículas que podrían ser una alternativa de primera elección para el tratamiento de pacientes pediátricos.

Como se puede observar, el desarrollo de una alternativa segura y eficaz para el tratamiento del Mal de Chagas, indicado particularmente para pacientes pediátricos, empleando un fármaco ya conocido, tendría un significativo impacto social y económico: se podría mejorar y ampliar el tratamiento a neonatos e infantes, y se lograría una reducción de la morbilidad y mortalidad prematura debido a la infección. Al mismo tiempo se evitaría el tedioso, extenso y poco exitoso camino hacia el desarrollo de nuevas moléculas con actividad igual o superior a benznidazol. En el marco de la presente charla discutiremos distintas estrategias de diseño de micropartículas y nanopartículas de benznidazol para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Se presentarán los avances y resultados in-vitro/in-vivo obtenidos hasta la actualidad.



Claudio J. Salomon es profesor asociado de Tecnología Farmacéutica y director académico del Departamento Farmacia de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario. Recibió su título de Farmacéutico por la Universidad Nacional de Rosario (1986) y su Doctorado en Química en la misma universidad (1993). Fue becario postdoctoral en la Universidad Hebrea de Jerusalén (Israel) de 1993 a 1997. El Dr. Salomon ha pertenecido a la investigación de Consejo Nacional de Argentina desde 1999. Sus responsabilidades docentes abarcan a la carrera de grado y de doctorado. En los últimos años ha sido director de diversas actividades de intercambio con universidades de América Latina y la Unión Europea. Sus intereses de investigación se relacionan con las áreas de Tecnología Farmacéutica, con énfasis en formas de dosificación de liberación modificada, técnicas de microencapsulación para drogas y microorganismos y nanotecnología farmacéutica. En los últimos años sus actividades de investigación se han centrado en el desarrollo de sistemas de administración de fármacos para el tratamiento de varias enfermedades desatendidas, incluyendo la enfermedad de Chagas. Ha sido galardonado con el premio Mercosur-UNESCO en Ciencia y Tecnología 2012. Ha publicado más de 50 trabajos de investigación en las principales revistas internacionales. Es Editor Asociado de AAPS PharmSciTech (<http://www.aaps.org/PharmSciTech>). Es miembro de comités editoriales de distintas revistas científicas. Es co-fundador de RICIFA (Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas).

MESA REDONDA “EXPERIENCIAS Y VISIÓN DEL SECTOR INDUSTRIAL”

Dr. Santiago Sanguinetti
INMUNOVA

Inmunova S.A. es una empresa biotecnológica, surgida hace 8 años de la Fundación Instituto Leloir, a partir de los descubrimientos del Laboratorio de Inmunología Estructural y Molecular, dirigido por el Dr. Fernando Goldbaum.

Nuestra tecnología central es una plataforma llamada Inmuno Multi Carrier (IMC®), basada en la enzima lumazina sintasa de *Brucella* spp. El IMC® es una estructura altamente inmunogénica debido a su estructura polimérica, a su notable estabilidad y a su potencial para interactuar con las células dendríticas activadas. Inmunova ha establecido un sistema para producir proteínas quiméricas utilizando la estructura IMC® como *carrier* de distintos antígenos. Estas quimeras poseen la capacidad de provocar una fuerte respuesta inmune humoral y celular, permitiendo, entre otras cosas, el diseño de vacunas y tratamientos innovadores.

La bacteria *Escherichia coli* Productora de toxina Shiga (STEC) está implicada en el desarrollo del síndrome urémico hemolítico (SUH). El SUH es una enfermedad infecciosa poco frecuente pero grave, y la mayoría de los casos son observados en niños. Entre el 10 y el 15% de los pacientes infectados con STEC progresará al SUH. Las personas afectadas a menudo requieren transfusiones de sangre, y en casos severos diálisis renal aguda. Con cuidados intensivos, la tasa de mortalidad por SUH es de 3-5%, sin embargo, el 40% de los pacientes con SUH desarrollará secuelas a largo plazo, tales como hipertensión y enfermedad renal crónica. A pesar de la magnitud de los problemas sociales y económicos causados por infecciones por STEC, hoy los pacientes solo reciben cuidados paliativos y tratamientos de sostén, pero no existen tratamientos terapéuticos específicos en el mundo para esta enfermedad.

La tecnología IMC® ha sido utilizada para desarrollar una gran variedad de potenciales soluciones contra diferentes enfermedades. En el caso de SUH, la plataforma IMC® nos ha permitido acoplar y estabilizar, mediante ingeniería genética, la subunidad B de la toxina Shiga y desarrollar un potente inmunógeno. Esta quimera se utilizó para inmunizar y obtener sueros de caballo hiperinmunes, policlonales, contra la toxina Shiga. A partir de dichos sueros se purificó la fracción F(ab')₂, se formuló un producto GMP, y se hicieron numerosos ensayos preclínicos bajo la supervisión de ANMAT. Los resultados de los ensayos preclínicos fueron muy buenos, permitiendo avanzar en una solicitud para comenzar un ensayo clínico fase I en el último trimestre de 2017.



Santiago Sanguinetti es Doctor en Química Biológica (UBA), Lic. Ciencias Biológicas (UBA) y MSc. Technology Entrepreneurship (University College of London- London Business School).

Es un profesional enfocado en el desarrollo de nuevos negocios y gestión de emprendimientos tecnológicos. Sólida formación en biología molecular y bioquímica. Comprometido con el cumplimiento de objetivos. Actitud proactiva en la constante búsqueda de mejoras y nuevos desafíos.

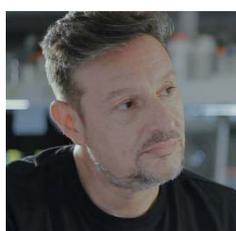
BIONANOTECNOLOGÍA EN EL ÁREA DIAGNÓSTICA, EL CASO DE CHEMTEST ARGENTINA

Dr. Diego Comerci

CHEMTEST

E-Mail: dcomerci@iibintech.com.ar

El acceso a herramientas apropiadas de diagnóstico es un componente esencial para la evaluación y el mejoramiento de la salud a nivel global. Sin embargo, a pesar de este papel fundamental, la investigación y desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico ha recibido mucho menos atención comparado con los esfuerzos en investigación orientados al desarrollo y descubrimiento de nuevas estrategias de tratamiento. La mayoría de las herramientas de diagnóstico disponibles hasta el momento han sido desarrolladas para su uso en laboratorios moderada o altamente equipados y, por lo tanto, inadecuadas para cubrir las necesidades de diagnóstico en países o regiones donde la infraestructura de los centros de salud es mínima o directamente inexistente. En los últimos años la nanotecnología ha adquirido relevancia en el área diagnóstica. En particular la bionanotecnología, definida como “la aplicación de la biología a la nanotecnología; es decir el uso de moléculas biológicas en nanomateriales, instrumentos en la nanoescala o sistemas en la nanoescala” ha ganado un lugar de relevancia en las ciencias biomédicas en general y en las técnicas diagnósticas en particular. A través del uso de nanopartículas y de películas de monocapas autoensambladas portantes de biocomponentes de reconocimiento específicos, pueden obtenerse nanosensores de altísima sensibilidad y especificidad. Por otra parte la reducción a escala nano de las matrices y/o soportes conlleva no solo a un incremento significativo de la sensibilidad, sino también a una reducción de los límites de detección y los tiempos del ensayo. Cuando estos bionanosistemas se combinan con dispositivos microelectrónicos tales como lab-on-a-chip pueden obtenerse sistemas de detección altamente innovadores, tanto en el nivel regional como en el mundial. El grado de desarrollo logrado por la nanotecnología sumado a la capacidad de miniaturización de la microelectrónica y a la alta especificidad de los sistemas biológicos permite plantear el desarrollo de plataformas donde converjan estas tres tecnologías para generar nuevos dispositivos portátiles, robustos, fáciles de operar, económicos y de alta sensibilidad y especificidad aplicables al diagnóstico rápido de enfermedades tanto humanas como animales. La visión de que la aplicación de tecnologías de punta puede ser accesible en nuestro país, dando lugar a desarrollos innovadores de base nacional, que impacten en el área de la salud y abran un nicho tecnológico prácticamente no explotado y de amplio alcance en el contexto social, tecnológico, científico y comercial, fue la fuerza motora que nos impulsó junto a un grupo de químicos, ingenieros electrónicos, desarrolladores de software, físicos, biotecnólogos y empresarios locales a crear en 2010 el consorcio asociativo público-privado *Nanopoc* que recibió el apoyo financiero del Fondo Argentino Sectorial de la ANPCyT. A lo largo de cinco años de funcionamiento, este consorcio instaló exitosamente infraestructura, formó recursos humanos y desarrolló distintos tipos de biosensores para la detección *in situ* de enfermedades infecciosas. Como parte de los objetivos de mediano plazo, esta plataforma promovió la incorporación de emprendedores y creación de spin-off, una de las cuales es CHEMTEST ARGENTINA. Esta empresa, fundada en 2015 por un grupo de emprendedores científicos y empresarios locales, se centró en el desarrollo de sistemas de diagnóstico *personales, in situ* o *Point of Care (POC)* que al principio de esta década representaban un tercio del mercado diagnóstico global y es el subsector más dinámico y con mayor tasa de crecimiento. CHEMTEST ARGENTINA desarrolla, produce y comercializa diagnósticos POC de alta performance para enfermedades infecciosas utilizando plataformas inmunocromatográficas que combinan el uso de anticuerpos y/o *nanobodies* acoplados a nanopartículas metálicas o de látex con la tecnología propietaria *GlycoEng* para producir glicoproteínas recombinantes con propiedades antigénicas óptimas.



Diego J. Comerci es Licenciado en Ciencias Biológicas (UBA) y Doctor en Biología Molecular y Biotecnología (UNSAM). Investigador CNEA/CONICET y Profesor Asociado de Microbiología UNSAM. Dirige un grupo de investigación en patología microbiana en el IIB-UNSAM donde también dirige distintos proyectos de desarrollo biotecnológico, como la plataforma Público-Privada de innovación en nanotecnología Nanopoc, el Fondo de Innovación Tecnológica Regional en Agroindustria Bovitec y el Fondo de Innovación Tecnológica en Salud “Diarreas Bacterianas”. Es cofundador de CHEMTEST ARGENTINA S.A.

Ing. Daniel Miguez
MABB - BIOMATERIAL

E-mail: dmiguez@mabbiomaterial.com

INTRODUCCIÓN

Somos una empresa de reciente creación con una propuesta de alto impacto económico y social global. Contamos con 10 años de experiencia en I+D+i en nanocerámicas y bioingeniería. Nos apoya una importante red local e internacional de: empresas, universidades, instituciones públicas y sin fines de lucro, entre las que destacamos a la ONG EMPREAR y la FAN - FUNDACION ARGENTINA DE NANOTECNOLOGÍA. Integramos un equipo de prestigiosos médicos, científicos, ingenieros, empresarios, inversionistas y constructores de negocios, para desarrollar y producir soluciones para el sector de la implantología dental, que sean libres de metal, de alta calidad, utilizando nanobiomateriales disruptivos y revolucionarias tecnologías libres de contaminación. Nuestro foco es lograr las soluciones más competitivas para expandir globalmente e integrar nuevas tecnologías exponenciales para generar una revolución positiva en toda la cadena de valor en el área de implantes dentales para mejorar la calidad de vida de toda la humanidad, sin distinción de clase social, y la conservación del planeta.

PROBLEMA

Según la OMS, en el mundo, se colocan 30 millones de implantes dentales de titanio por año, pero hay más de 500 millones de personas que los necesitan y no pueden pagarlo. Estas personas son incapaces de masticar normalmente, sufren gastritis, úlceras, depresiones, pérdida de empleo, entre otros problemas graves. Esta situación es responsable de enfermedades y muertes, generando trillones de dólares de gasto público para los Estados y Gobiernos de países desarrollados y en vía de serlo.

Sólo 1,5 millones de implantes dentales se colocan al año en EEUU, pero más de 50 millones de personas los necesitan y no pueden pagarlos, considerando que la cirugía de implantes dentales cuesta promedio 5000 usd por unidad.

Sólo el 5% de la población mundial que necesita implantes dentales puede pagar por ellos. Este nicho de mercado está enfáticamente aumentando su demanda de implantes dentales libres de metal, para evitar la vista de bordes metálicos ante retracción de encías, así como la oxidación que afectan a la estética y la salud. Asimismo, el uso de implantes metálicos genera otros problemas potenciales, como el electromagnetismo provocado por la señal de los teléfonos celulares, que actúa como mini antena receptora, calentando el seno maxilofacial y acelerando la oxidación de las células circundantes de los implantes, aumentando la probabilidad de rechazo.

Ante esta demanda, se crearon hace unos 10 años los Implantes cerámicos, hechos de Zirconia Yttria, una nanocerámica con propiedades extraordinarias tales como: Nunca Corroe, Sin Reacción Inmune, Material Resiliente y permite traslucir la luz natural. Son ideales para alcanzar los más altos estándares proporcionando estética superior y ventajas higiénicas contra las piezas metálicas que acumulan la placa y las bacterias. La situación actual es que estos productos son 2 a 3 veces más caros que los metálicos, reduciendo aún más su accesibilidad a la clase media y pobre.

Hoy en día, sólo hay 5 fabricantes de implantes de cerámica calificados con aprobaciones FDA o CE y más de 400 fabricantes de implantes de titanio, quienes facturan anualmente 6.000 millones de dólares aproximadamente. Otro problema es que estos productos libres de metal se están posicionando como Premium y sólo la clase social más alta puede acceder.

Según el reconocido especialista en implantología dental suizo Stefan Rohling, en 20 años, el 50% de los implantes colocados serán cerámicos, lo que significa que muchos fabricantes de implantes de titanio se convertirán en proveedores de implantes sin metal, en la medida que se adapten o adquieran las nuevas tecnologías requeridas.

SOLUCIÓN

MABB ha sido capaz en un plazo de 10 años, adquirir las tecnologías y desarrollar los procesos que nos permite producir piezas para la industria de la implantología dental global utilizando nanocerámicas de Zirconia Yttria de la más alta calidad y alcanzando los costos más competitivos del mercado.

Nuestros clientes, los fabricantes de implantes de titanio, pueden por ende integrar una nueva línea de productos libre de metal y colocar estos productos médicos al mercado implantológico internacional para que su colocación pueda llegar un tercio del valor actual de los productos libres de metal disponibles, satisfaciendo así no solo los más altos estándares de las clases sociales altas, sino también expandiendo la base de la pirámide social, permitiendo que la clase media pueda pagarlos, y a través de entidades públicas y ONG`s especializadas, a la gente sin recursos económicos.



Daniel Miguez es Ingeniero Industrial recibido en el Instituto Tecnológico de Buenos Aires – ITBA. Especializado en Management por Universidad de California. Cuenta con dos décadas de experiencia creando, desarrollando y dirigiendo organizaciones de alto impacto, con y sin fines de lucro. Co-fundador y Vice-Presidente de la ONG EMPREAR. Co-fundador y Presidente de MABB | Bioingeniería | Nanobiomateriales. Autor del Libro “El emprendedor profesional”, 2007, del modelo SYSTEMIC CANVAS y coautor del Modelo PENTAGONO EMPREAR. Profesor Creador de la Cátedra y Centro de Emprendedores del ITBA. Miembro del Comité Local IRAM y Subcomité Internacional

ISO/279 para el Desarrollo de la Norma Internacional ISO 50500 (Innovation Management Systems). Entre otros.

TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN PRESENTADOS

1 - USO DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA PARA OPTIMIZAR LA SIMBIOSIS SOJA- BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM

Zawoznik, M.S.¹; Groppa, M.D.^{1,2}; de Valois, N.¹; Alfonso, C.E.¹; Di Baggio Vega, E.G.¹; Benavides, M.P.^{1,2};
Iannone, M. F.^{1,2*}

¹Cátedra de Química Biológica Vegetal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Junín 956 (1113), CABA, Argentina ²Universidad de Buenos Aires. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB). Fac. de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires, Argentina. Junín 956 (1113), CABA, Argentina

*correo electrónico: mflorenciaiannone@gmail.com

En el campo de la agricultura, el uso de las nanopartículas con diversos fines es relativamente nuevo y está en constante crecimiento. El riesgo potencial de su uso y la eventual nanotoxicidad debe ser estudiada cuidadosamente. El cultivo de soja es de gran importancia siendo nuestro país el tercer exportador mundial del grano y el primer exportador de sus productos procesados. Por su parte, la bacteria *Bradyrhizobium japonicum* establece una asociación simbiótica con dicha especie vegetal, a través de la cual incorpora nitrógeno de la atmósfera en los agrosistemas. Este sistema biológico es clave para la agricultura, por su implicancia en el ciclo global del nitrógeno y, por ende, en la producción de alimentos.

En este trabajo se analizó el impacto de la aplicación de nanopartículas (NPs) de magnetita, Fe₃O₄, sobre la viabilidad de semillas de soja (*Glycine max* L.) y sobre algunos indicadores biológicos relevantes en términos de la asociación que establece con el citado microsimbionte, con la intención futura de evaluar el uso de los nanomateriales en el desarrollo de nuevos productos de uso agrícola como inoculantes para leguminosas.

Para ello, semillas de soja previamente inoculadas con una suspensión de *B. japonicum* se sembraron en macetas con vermiculita y se hicieron crecer en cámara de cultivo regadas periódicamente con solución Hoagland sin nitrógeno. Los tratamientos realizados fueron los siguientes: plantas control, plantas expuestas a 50 ppm de NPs de magnetita y plantas expuestas a una cantidad equivalente de hierro soluble como Fe-EDTA. Se determinó la tasa de germinación y a los 30 días de crecimiento las plantas fueron descalzadas para evaluar número de nódulos por planta, contenido de leghemoglobina de los nódulos, superficie radical, peso fresco y seco de la parte aérea y de las raíces.

La tasa de germinación no varió a causa de los tratamientos. El crecimiento global de la planta no se alteró en las plantas expuestas a la NP, a excepción de un incremento en la biomasa de la parte aérea. La exposición al Fe soluble no afectó la viabilidad, pero llevó a significativas reducciones de la biomasa aérea y radical. La superficie radical aumentó un 32 % en los tratamientos con NPs y se redujo a la mitad con Fe-EDTA. El contenido de clorofila aumentó con ambos tratamientos (Fe-EDTA y NPs), pero con una mayor significancia estadística al adicionar NPs. El tamaño promedio de cada nódulo fue mayor en las plantas en contacto con NPs y el contenido de leghemoglobina de ellos fue ligeramente superior comparado con el control.

Concluimos que a la dosis probada, las NPs de magnetita no sólo carecen de fitotoxicidad en las plantas de soja, sino que estimulan el crecimiento de las plántulas y la biosíntesis de la clorofila, como así también impactan favorablemente en la nodulación y en el contenido de leghemoglobina, convirtiéndose así en buenos candidatos para el diseño de nuevos productos destinados al uso agrícola.

2 - DESARROLLO DE UN GEL NANOCOSMÉTICO ANTIOXIDANTE

P. Bucci; S. Alonso; J. Montanari*

Laboratorio de Biomembranas - GBEyB (IMBICE, CCT-La Plata, CONICET), Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Bernal (1876), Argentina, Tel: +54 11 43657100 int. 5625, *correo electrónico: jmontanari@unq.edu.ar

RESUMEN:

A partir de un extracto etanólico de arándanos (*Vaccinium myrtillus*), rico en compuestos polifenólicos, se obtuvo una formulación liposomal ultradeformable, con un tamaño promedio de liposomas alrededor de los 100 nm. Esta formulación pudo ser incluida en un gel de uso corriente en la industria cosmética y demostró ser efectiva tanto para el transporte de antioxidantes a la epidermis viable de humanos como para proteger a cultivos celulares del ataque de radiación UV. Además, la formulación estimuló el crecimiento celular de queratinocitos en ensayos de herida. La formulación pudo obtenerse con características similares por dos métodos de preparación distintos y actualmente se está desarrollando la etapa de su escalado para producción industrial con el fin de utilizarse como aditivo en una línea de productos cosméticos *antiage* con una empresa nacional con la que se ha suscripto un convenio.

INTRODUCCIÓN:

El arándano (*Vaccinium myrtillus*) es un cultivo con creciente importancia en el país, cuyos compuestos polifenólicos, entre los que se encuentra gran cantidad de antocianinas, presentan propiedades antioxidantes¹. El consumo por vía oral es insuficiente para que, una vez metabolizados, los compuestos antioxidantes puedan ejercer una acción protectora ante el daño ambiental, debida a la baja absorción en intestino². Por ello se planteó y optimizó la inclusión de un extracto etanólico de arándanos en liposomas ultradeformables para ser utilizados en delivery tópico, debido a la capacidad de esta clase de nanotransportadores para penetrar a través del estrato córneo³, barrera impermeable de la piel que hace que otros tipos de liposomas solo puedan actuar como un depósito desde el exterior. En etapas previas se caracterizó biofísica y bioquímicamente tanto al extracto libre como al nanosistema, encontrándose baja toxicidad (*in vitro* e *in vivo*) y alta capacidad antioxidante⁴. En esta última etapa, con el objetivo de desarrollar una aplicación nanocosmética, se probó tanto la penetración del nanosistema en piel humana como su capacidad de absorber radiación UV, así como su acción estimulante de regeneración epitelial.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Obtención de extracto y carga en liposomas: Los extractos y liposomas ultra-deformables se prepararon en base a los trabajos previos en esta línea de investigación⁴. Brevemente, a partir de arándanos disgregados se realizó extracción con etanol, luego eliminado por rotoevaporación. El extracto seco se disolvió en el buffer utilizado para resuspender una película lipídica de fosfatidilcolina de soja obteniéndose liposomas, que fueron reducidos en tamaño y en lamellaridad por extrusión automática o sonicación. Las formulaciones obtenidas en cada batch fueron caracterizadas (tamaño, potencial Z, etc) por métodos previamente descriptos, y luego incluidas en gel de Carbopol⁵.

Penetración en piel: Se profundizaron estudios previos⁶ en Modelo de Penetración de Saarbrücken en condición no oclusiva sobre explantos de piel humana obtenidos como descartes de cirugía estética para determinar transporte a la epidermis viable de los polifenoles del extracto formulado en el nanosistema incluido en el gel de carbopol. El extracto se cuantificó por espectrometría a distintas profundidades en el estrato córneo, luego de someter a la piel a la técnica de *tape stripping*.

Fotoprotección: Se expusieron cultivos de líneas celulares HaCaT (derivada de queratinocitos humanos) y HEK 293 a radiación UV y se determinó la dosis letal de energía para cada uno. Luego, se irradió esa dosis en presencia de concentraciones atóxicas de la nanoformulación y se determinó viabilidad por el método de MTT a 24 hs.

Estímulo de reepitelización: Se realizaron heridas lineales con una punta plástica en cultivos de HaCaT a un 80% de confluencia, se incubó con el extracto de arándanos y se determinó el crecimiento de células desde los márgenes de la herida tras 36 hs.

RESULTADOS:

Penetración en piel: La nanoformulación incluida en el gel penetró en mayor cantidad y se acumuló a mayor profundidad que el extracto libre aplicado sobre la piel y que una formulación de liposomas convencionales (no ultradeformables).

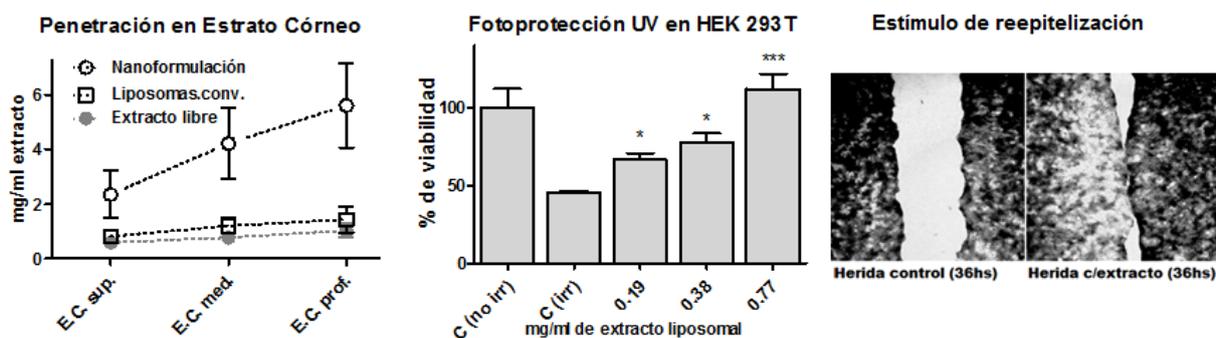
Fotoprotección: Las células expuestas a dosis de 0,5 J/cm² en presencia de la nanoformulación presentaron diferencias significativas respecto del control en todas las concentraciones, llegando a mantener el 100% de la viabilidad para la más alta probada.

Estímulo de reepitelización: Sólo en presencia del extracto, las células crecieron cubriendo casi toda la placa donde había sido atacado mecánicamente el cultivo.

Aplicación industrial: Se propuso la utilización de la nanoformulación como aditivo para la industria cosmética, el cual añadido a la base en una proporción de 8% en masa proporcionará antioxidantes *in situ* a la epidermis viable con presencia bloqueadora de radiación UV en el estrato córneo. A tal fin se ha suscripto un convenio de confidencialidad con una empresa nacional para el desarrollo de una línea *premium* para uso en el mercado profesional de la cosmetología y se están llevando a cabo procesos de escalado.

CONCLUSIÓN:

Se logró desarrollar un producto nanotecnológico de aplicación industrial a partir de un extracto natural cuyas propiedades antioxidantes y su nanoformulación habían sido estudiadas en etapas previas de investigación, llegando finalmente a su aplicación.



REFERENCIAS:

- ¹ Kähkönen et al. (2001), *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(8), 4076-4082
- ² Manach et al. (2005), *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 230-242
- ³ Cevc & Blume (1992), *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1104(1) 226-232
- ⁴ Montanari et al (2013), *Journal of cosmetic science*, 64 (6), 469-481
- ⁵ Bucci et al (enviado 2017, *Journal of cosmetic dermatology*)
- ⁶ Bucci et al (2015), *Cosmética*. ISSN 0326-7385, Vol 89(1), 41-47

3 - POLÍMEROS DE POLIETILENIMINA COMO PLATAFORMA PARA DESARROLLAR NANOSISTEMAS DE TRANSFECCIÓN Y SENSORES ELECTROQUÍMICOS

A.J. Byrne,¹ P. Bosch,² V. Campodall'Orto,¹ J.M. Lázaro-Martínez^{1,*}

¹Departamento de Química Orgánica-IQUIFIB-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956 (1113) CABA, Argentina. ²Departamento de Biología Molecular, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

*correo electrónico: lazarojm@ffyb.uba.ar; jmlazaromartinez@gmail.com

El desarrollo de nuevos materiales económicos con alto valor agregado conlleva un gran desafío actual para hacer frente a problemas puntuales no sólo en el área medioambiental sino también en las áreas de química y biotecnología. En este contexto, la química macromolecular es de gran interés para producir materiales procesables con propiedades únicas y valiosas. Entre ellos, los polímeros ofrecen nuevas posibilidades a los científicos para la creación de materiales artificiales. En particular, nuestro grupo de investigación ha estudiado la incorporación de complejos de coordinación en arquitecturas poliméricas ya que abren la posibilidad de impartir las propiedades fisicoquímicas de ambos al material resultante. En los últimos años, los materiales poliméricos con ligandos quelantes tienen gran interés debido a sus aplicaciones industriales, tales como la eliminación de iones de metales pesados en efluentes y aguas contaminadas.¹⁻⁴ Particularmente, los polímeros lineales de polietilenimina (PEI) presentan un amplio campo de aplicaciones, sin embargo, su importancia en el área de transfección en líneas celulares presenta una alternativa eficiente y económica a la utilización de vectores virales o reactivos comerciales. Por tal motivo y para profundizar el conocimiento de los factores estructurales presentes en polímeros de PEI que podrían comprender la eficiencia en procesos de transfección es que en el período 2015-2016 se llevó a cabo la síntesis de nuevos polímeros de PEI y se estudió la dinámica estructural, en términos de cristalinidad, en diversas muestras sintéticas de PEI teniendo en cuenta su peso molecular, su forma química (clorhidrato: PEI·HCl o base libre= PEI_{base-libre}) como así también si los productos de PEI son cristalizados o liofilizados en diversas condiciones (Esquema 1).^{5,6}



Esquema 1. Obtención de las diversas muestras de PEI estudiadas.

La importancia de estudiar las formas sólidas radica en que los polímeros de PEI bajo la forma química de clorhidratos (PEI·HCl), como otros reactivos de transfección, pueden ser conservados en su forma liofilizada por extensos períodos de tiempo sin pérdida de su actividad y reconstituirse de una manera rápida antes de su uso. Además, permite obtener valiosa información relacionada con la arquitectura polimérica que adoptan las distintas cadenas de PEI en el arreglo cristalino. Para ello, se llevaron a cabo estudios de RMN en estado sólido (*ss*-RMN) (Fig. 1). Los resultados obtenidos indican que las muestras cristalizadas del medio de reacción presentaron los porcentajes mayores de cristalinidad y una única señal a 42.9 ppm en los espectros de ¹³C-RMN CP-MAS, mientras que las muestras liofilizadas mostraron dos componen-

tes a 42.9 y 44.4 ppm siendo esta última la asociada a regiones amorfas. A su vez, pudo evidenciarse la heterogeneidad estructural a partir diferentes soluciones acuosas de PEI causan el incremento de regiones amorfas incluso cuando algunos de los experimentos 2D ^1H - ^{13}C HETCOR (Fig. 1G).⁵ La ss-RMN permitió comprender que la liofilización de dominios cristalinos permanecen presentes, aunque en menor proporción en comparación con las muestras cristalizadas del medio de reacción. Esto pudo ser demostrado a partir de los experimentos de edición de los espectros de ^{13}C CP-MAS y con la determinación de experimentos de polarización directa de ^{13}C -RMN en el estado sólido. Por otra parte, la captación de iones cobre por parte de los polímeros de PEI produjo una significativa reducción de la movilidad molecular en las cadenas poliméricas produciéndose un material ordenado a partir de las mediciones de los tiempos de relajación transversal de ^1H (T_2^H) en donde se observa un decaimiento biexponencial en donde los tiempos cortos (~ 60 μseg) y largos (0.2-1 msec) se asocian a regiones cristalinas y amorfas, respectivamente (Fig. 1F). En particular las regiones amorfas presentaron un comportamiento diferente en cuanto al peso molecular asociado a un mayor desorden al aumentar el peso molecular. Es importante remarcar que el orden y rigidez producida en las cadenas lineales de PEI fue el resultado de la captación de un 3-4 %P/P y 40-52 %P/P de iones cobre y sulfato, respectivamente, de acuerdo con las mediciones de XPS, XRF y análisis elemental en los complejos de Cu(II)-PEI. La completa desorción de iones Cu(II) demostró que los iones sulfato son los responsables del alto grado de orden en términos estructurales tanto en los complejos de Cu(II) como en las muestras desorbidas del ión metálico (Esquema 1). Recientemente hemos profundizado el estudio estructural en diversas formas sólidas de PEI mediante el empleo de técnicas de alta resolución en el estado sólido como ser como ser experimentos ^1H -MAS, 2D ^1H - ^1H SQ/DQ BaBa a una velocidad de rotación en el ángulo mágico (MAS) de 60 kHz como así también experimentos de ^{13}C CP-MAS y 2D ^1H - ^{13}C HETCOR en conjunción con la determinación de los difractogramas de rayos-X de polvo, SAXS y WAXS.

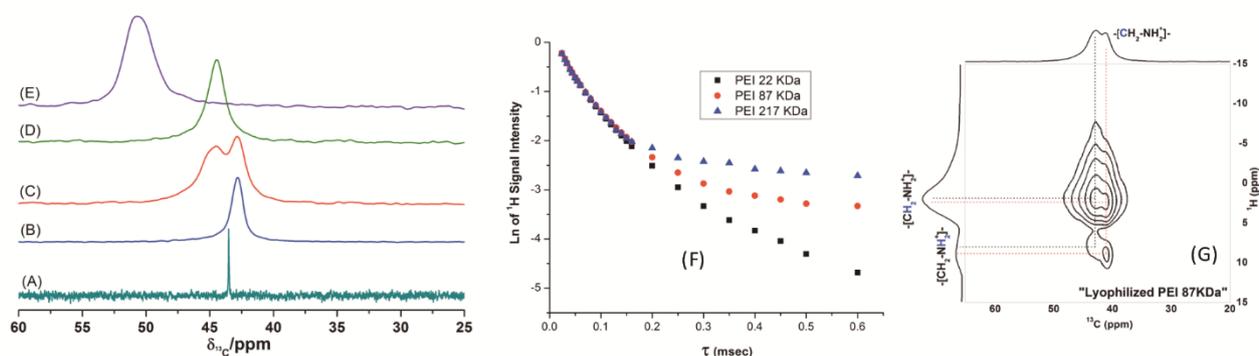


Figura 1. Espectros de ^{13}C -RMN para una muestra de PEI·HCl en D_2O (A), ^{13}C -RMN CP-MAS para los sólidos de PEI·HCl cristalizados en el medio de reacción (B), una muestra liofilizada (C), un complejo de PEI con iones Cu(II) (D) y para el PEI_{base-libre} (E). Decaimiento de la magnetización transversal de protones en muestras desorbidas de Cu(II) con distintos pesos moleculares (T_2^H) (F). Espectro 2D ^1H - ^{13}C HETCOR en el estado sólido para una muestra liofilizada de PEI·HCl (G).

Por último, se estudió la eficiencia de transfección sobre diversas líneas celulares y en el desarrollo de nanosistemas con diversos materiales derivados de PEI. Los diversos polímeros de PEI mostraron buenos y superiores porcentajes de transfección en diversas líneas celulares en comparación con reactivos comerciales, demostrando que los PEI de alto peso molecular (87 y 217 kDa, tamaño de partículas 356 ± 4 y 670 ± 13 nm, respectivamente) mostraron una elevada eficiencia en la transfección de fibroblastos fetales bovinos de importancia para el desarrollo de animales transgénicos, a la vez que la citotoxicidad pudo ser disminuída por el agregado de suero fetal bovino.⁶ En lo referido a la obtención de inmunosensores, la conjunción de PEI y nanopartículas de oro ofrece la posibilidad de obtener plataformas de sensores electroquímicos con notable amplificación de respuesta y óptima sensibilidad de calibrado. Se modificarán superficies conductoras mediante la electro-reducción de HAuCl_4 en presencia de PEI·HCl. Las cadenas poliméricas serán activadas con el propósito de unir covalentemente diferentes proteínas de interés analítico, para el desarrollo de inmunosensores. Particularmente se utilizará seroalbúmina bovina (SAB) en la exploración de las condiciones óptimas de inmovilización. Posteriormente se inmovilizará la proteína

GP120 correspondiente a la cápside del virus de inmunodeficiencia de simio, para la detección selectiva de anticuerpos en muestras biológicas. Se probarán diferentes métodos de transducción física del evento de unión, tales como voltametría de onda cuadrada (SWV) con sonda rédox, o espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) habitualmente empleada en sensores libres de marca.

REFERENCIAS:

(1) Lázaro-Martínez et al. *J. Phys. Chem.* **C2016**, 120, 29332–29347. (2) Lombardo-Lupano et al. *Langmuir***2014**, 30, 2903–2913. (3) Lombardo Lupano et al. *Appl. Catal. A Gen.***2013**, 467, 342–354. (4) Lázaro-Martínez et al. *Polymer* **2013**, 54, 5214–5221. (5) Lázaro-Martínez et al. *Macromolecules***2015**, 48, 1115–1125. (6) Forcato et al. *Cytotechnology***2017**, 69, 1–11.

4 - NANODELIVERY DE MELATONINA PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA FARMACOTERAPIA DEL GLAUCOMA DE ÁNGULO ABIERTO

J.C. Imperiale^{1,2}, A. Sosnik³, G. Acosta²

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Tecnología Farmacéutica, Cátedra de Tecnología Farmacéutica II. Buenos Aires, Argentina. ² CONICET - Universidad de Buenos Aires. Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA). Buenos Aires, Argentina. ³ Laboratory of Pharmaceutical Nanomaterials Science, Department of Materials Science and Engineering, Technion-Israel Institute of Technology, Technion City, Haifa, Israel. *correo electrónico: julietaimperiale@gmail.com

1. INTRODUCCION

El glaucoma es una enfermedad que en la Argentina afecta aproximadamente a un millón de personas y que provoca alrededor del 20% de las cegueras a nivel mundial. Se ha demostrado que la melatonina es una sustancia natural que posee propiedades neuroprotectoras en modelos animales de glaucoma a través de múltiples mecanismos. Sin embargo, su aplicación tópica ocular, que es la vía de administración preferida por los pacientes para tratar afecciones oftálmicas, se ve obstaculizada por las barreras físicas, bioquímicas y fisiológicas que presenta el ojo. En este contexto, en el presente trabajo se investiga la nano-encapsulación de melatonina en partículas de Eudragit® RLPO, un polímero que confiere liberación sostenida y propiedades muco-adhesivas. De esta forma se podría prolongar el tiempo de residencia de la melatonina para mejorar su absorción y biodisponibilidad ocular

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. *Materiales.*

Eudragit® RLPO fue gentilmente donado por Etilfarma® (Argentina). La melatonina fue comprada en Sigma-Aldrich®. El etanol y la acetona (grado analítico) fueron compradas en Sintorgan® (Argentina).

2.2. *Preparación de nanopartículas de Eudragit® cargadas con melatonina.*

Se prepararon nanopartículas de Eudragit® RLPO por el método de nanoprecipitación. Brevemente, se inyectó una solución mezcla de melatonina y Eudragit® en acetona sobre una fase acuosa bajo agitación hasta total evaporación del solvente orgánico. El contenido de fármaco encapsulado se cuantificó por espectroscopía ultravioleta ($\lambda = 278$ nm). Se prepararon también nanopartículas blanco (sin fármaco) como control. A todas las muestras se les agregó dextrosa como crioprotector, se congelaron a -80°C y se liofilizaron (Liofilizador Unit GAMMA A, Christ, Alemania).

2.3. *Caracterización de nanopartículas poliméricas.*

2.3.1. *Dispersión dinámica de la luz.* Se determinó el tamaño de partícula y distribución de tamaño de partícula (PDI) de las nanopartículas frescas blanco y cargadas con melatonina por difracción dinámica de la luz (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, Reino Unido). Todas las mediciones fueron realizadas a 25° con un ángulo de dispersión de 173° .

2.3.2. *Microscopía electrónica de transmisión (TEM).* El tamaño y la morfología de las nanopartículas blanco se examinó por microscopía electrónica de transmisión (TEM, Zeiss EM109T, Oberkochen, Alemania). Las muestras liofilizadas se resuspendieron y se secaron a temperatura ambiente previa tinción con acetato de uranilo.

2.3.3. *Espectroscopía infrarroja.* Las nanopartículas blanco liofilizadas y el polímero fueron analizados por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflexión total atenuada (Espectrómetro Nicolet 380 ATR/FT-IR, Avatar Combination Kit), con Smart Multi- Bounce HATR con reflexión ATR ZnSe cristal (ángulo 45°) (Thermo Scientific, Waltham, MA). Los espectros fueron obtenidos con el software OMNIC 8.

2.3.4. *Cromatografía gaseosa.* La presencia de trazas de acetona en las nanopartículas de Eudragit® frescas fue determinada por cromatografía gaseosa (Hewlett Packard 6890 Gas Chromatograph, Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

3. RESULTADOS.

Se obtuvieron nanopartículas de Eudragit® RLPO por el método de nanoprecipitación. El espectro infrarrojo de las nanopartículas blanco mostró las típicas bandas de los grupos funcionales del Eudragit®, demostrando que el polímero no fue degradado durante el proceso de producción de nanopartículas. Tanto

las nanopartículas blanco como las cargadas con melatonina mostraron el mismo rango de tamaño, de 10 a 100 nm. El PDI también fue similar: 0.289 y 0.364 para las nanopartículas blanco y las cargadas con melatonina, respectivamente. Como pudo observarse por TEM, su morfología resultó esférica (**Figura 1**). La eficiencia de encapsulación fue cercana al 100%. Los resultados de cromatografía gaseosa indicaron ausencia de trazas de acetona en las nanopartículas producidas, confirmando la efectividad del método aplicado para remover el solvente orgánico.

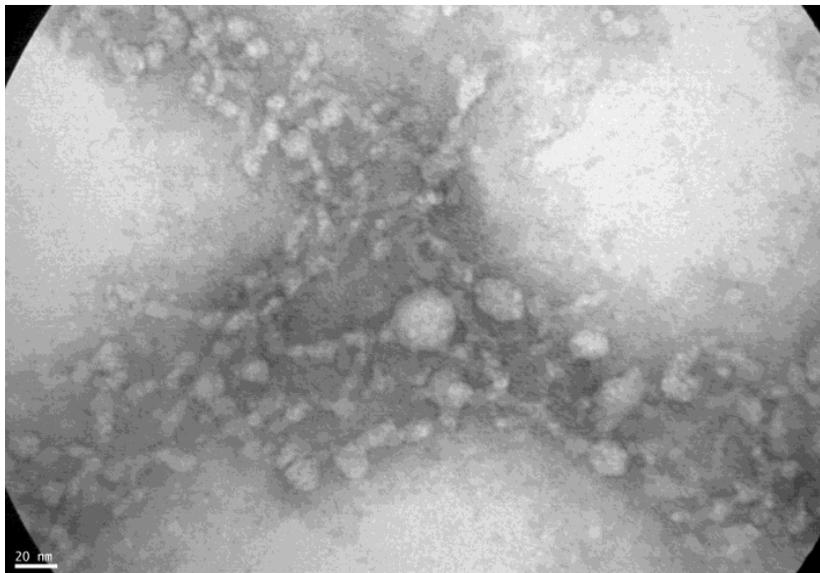


Figura 1. Imagen de TEM de las nanopartículas blanco de Eudragit®

4. CONCLUSIONES.

Se obtuvieron nanopartículas de Eudragit® RLPO cargadas con melatonina de 10 a 100 nm de tamaño con una alta eficiencia de encapsulación. Estos resultados preliminares resultan promisorios con miras a la formulación de un colirio que contenga dichas nanopartículas que sea capaz de mejorar la absorción de melatonina. Esto representaría una oportunidad de contar con una terapia co-adyuvante que permita mejorar la efectividad de la farmacoterapia actual.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Etilfarma® por haber donado gentilmente el polímero utilizado para este trabajo. También agradecen el apoyo de UBA, CONICET y FONCYT-ANPCYT-MINCYT para la realización de este trabajo.

5 - NANOSISTEMAS LIPOSOMALES DE APLICACIÓN TÓPICA CON PENETRACIÓN CUTÁNEA Y ACTIVIDAD ANTITUMORAL

N. Calienni^{1*}; R. Llovera²; F. Temprana³; S. Alonso¹; J. Montanari¹

¹Laboratorio de Biomembranas - GBeyB (IMBICE, CCT-La Plata, CONICET), Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Bernal (B1876BXD), Argentina, Tel: +54 11 43657100 int. 5625 ²Laboratorio de Expresión y Plegamiento de Proteínas - GBeyB (IMBICE, CCT-La Plata, CONICET), Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Bernal (B1876BXD), Argentina ³Laboratorio de Virología, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Bernal (B1876BXD), Argentina *correo electrónico: nati.calienni@gmail.com

Resumen: Se encapsularon dos fármacos con propiedades antitumorales en liposomas ultradeformables con el fin de desarrollar nuevos tratamientos de aplicación tópica. Los principios activos elegidos fueron el 5-Fluorouracilo (droga clásica) y el Vismodegib (droga de última generación). Ambos son utilizados durante la terapia contra algunos tipos de cáncer de piel, mediante administración parenteral con severos efectos secundarios no deseados. Los nanosistemas obtenidos fueron caracterizados fisicoquímicamente, se determinó su capacidad para penetrar la piel, y su toxicidad o actividad antitumoral *in vitro* en una línea celular derivada de queratinocitos humanos no tumoral y en una línea de origen melanómico. Por último, se estudió el efecto de la co-encapsulación del 5-Fluorouracilo con un extracto natural de arándanos.

Introducción: El 5-Fluorouracilo (5FU) es una droga que se usa desde hace más de 40 años en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, incluyendo algunos tipos de neoplasias de la piel. El Vismodegib (Vis) es una droga de última generación recientemente aprobada por la *Food and Drug Administration* de EE.UU., utilizada en el tratamiento de adultos con carcinoma de células basales. Si bien ambos principios activos han demostrado ser efectivos para revertir los eventos neoplásicos, presentan numerosos y severos efectos secundarios cuando son administrados por la vía parenteral. Por lo tanto, la encapsulación del 5FU y el Vis dentro de *nano-drug delivery systems* permite reducir los efectos secundarios y realizar una entrega sitio-específica en la zona del tumor.

Se seleccionó como nanosistema a los liposomas ultradeformables (UDL), porque son la única clase de liposomas capaces de penetrar el estrato córneo de la piel y liberar su contenido en la epidermis viable y dermis¹. Su elevada deformabilidad a temperatura ambiente y corporal se debe a las características físico-químicas que le aporta la presencia de la sal biliar colato de sodio en combinación con la fosfatidilcolina de soja.

Se llevó a cabo una exhaustiva caracterización físico-química de los nanosistemas con 5FU (UDL-5FU) y Vis (UDL-Vis). En el caso del 5FU, además, se co-encapsuló un extracto etanólico de arándanos (*Vaccinium myrtillus*) (UDL-5FU-EA), dado que existe evidencia de que su co-encapsulación con flavonoides produce un efecto sinérgico antitumoral².

Para el caso de UDL-5FU y UDL-5FU-EA, se estudió la actividad antitumoral *in vitro* mediante diversas técnicas, comparando su efecto en dos líneas derivadas de piel humana: HaCaT, proveniente de queratinocitos inmortalizados (no tumoral) y SK-Mel-28, derivada de melanoma (tumoral). Se estudió la penetración de UDL-5FU y UDL-Vis en piel humana en condiciones *ex vivo*, en las cuales se simulaban las condiciones *in vivo* de aplicación, tales como el gradiente de humedad transdérmico y la temperatura de la piel.

Materiales y métodos:

Obtención y caracterización de los nanosistemas: Los UDL fueron preparados a partir de la resuspensión con buffer Tris de un *film* lipídico de fosfatidilcolina de soja y colato de sodio que se formó mediante rotoevaporación³. El extracto fue obtenido a partir de arándanos disgregados a los cuales se les realizó una extracción con etanol ácido, eliminado por rotoevaporación⁴. El 5FU y el extracto de arándanos fueron añadidos durante la hidratación del *film*. Mientras que el Vis se añadió durante la formación del *film* lipídico. Los UDL-5FU y UDL-5FU-EA fueron sonicados, mientras que UDL-Vis extrudados por una membrana

de 100 nm de tamaño de poro, con el fin de obtener en todos los casos vesículas unilamelares de alrededor de 100 nm de tamaño. La droga no encapsulada fue removida mediante cromatografía de exclusión molecular.

Se estudió su tamaño y estabilidad en el tiempo mediante *dynamic light scattering*, potencial-Z y microscopía electrónica de transmisión. Se determinó la interacción de los principios activos con la membrana liposomal mediante calorimetría diferencial de barrido y se llevaron a cabo estudios de la deformabilidad de las formulaciones.

Actividad antitumoral e internalización: Los estudios *in vitro* se realizaron en las líneas celulares HaCaT y SK-Mel-28. Se determinó la citotoxicidad de UDL-5FU y UDL-5FU-EA mediante MTT, cristal violeta y rojo neutro a las 4 y 24 hs de tratamiento. Se determinó la inducción de apoptosis y necrosis mediante citometría de flujo luego de 6 hs de incubación, mediante el kit de detección con Anexina V-FITC. Por último, se estudió la internalización de las formulaciones marcadas fluorescentemente a 4 y 37°C.

Penetración en piel: Se estudió la capacidad de UDL-5FU y UDL-Vis para atravesar el estrato córneo de la piel humana mediante el Modelo de Penetración de Saarbrücken en condición no oclusiva⁵. En el caso del 5FU se cuantificó por espectrometría UV-Vis, mientras que el Vis mediante HPLC, a distintas profundidades en el estrato córneo, luego de someter a la piel a la técnica de *tape stripping*⁵. Además, se estudió el perfil de penetración de los UDL-5FU marcados con dos sondas fluorescentes mediante microscopía confocal de cortes histológicos y *z-stacking* de un fragmento intacto de piel.

Resultados:

Actividad antitumoral: UDL-5FU y UDL-5FU-EA mostraron efectos citotóxicos semejantes entre sí. Si bien afectaron tanto a la línea tumoral como la no tumoral, incrementaron de manera significativa el efecto citotóxico del 5FU en SK-Mel-28 después de 24 hs de tratamiento. Sin embargo, SK-Mel-28 mostró una mayor internalización de ambas formulaciones en comparación a HaCaT a 4 y 37°C, y a partir de los estudios de apoptosis se observó un efecto diferenciado entre ambas líneas. Después de 6 hs de incubación UDL-5FU y UDL-5FU-EA indujeron un elevado porcentaje de apoptosis sólo en la línea tumoral y mayor que el de 5FU libre. Sin embargo, UDL-5FU-EA incrementó el porcentaje de células necróticas en HaCaT en comparación con UDL-5FU y 5FU libre.

Penetración en piel: Tanto UDL-5FU como UDL-Vis lograron atravesar el estrato córneo de la piel, detectándose tanto 5FU como Vis en la epidermis viable y dermis. Sin embargo, el Vis fue hallado en mayor proporción en el estrato córneo (ambiente hidrofóbico), mientras que el 5FU se encontró en mayor proporción en la epidermis viable y dermis (ambiente más hidrofílico).

Conclusión: Se obtuvieron formulaciones liposomales estables que encapsulan 5FU y Vis, capaces de penetrar la piel humana intacta en menos de una hora. En el caso de la formulación con 5FU además se observó que presenta efecto antitumoral *in vitro*. La co-encapsulación del 5FU con un extracto etanólico de arándanos no modificó su actividad antitumoral, sin embargo, produjo una inducción de necrosis no deseada en la línea celular de queratinocitos humanos no tumoral.

Referencias:

¹Cevc & Blume (1992), *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*,1104(1) 226-232

²Cosco D., et al. (2015) *International journal of pharmaceutics*, 489(1):1-10

³Montanari J., et al. (2007), *International journal of pharmaceutics*, 330(1):183-94

⁴Montanari J., et al. (2013), *Journal of cosmetic science*, 64 (6), 469-481

⁵Montanari J., et al. (2010) *Journal of Controlled Release*,147(3):368-76

Agradecimientos: Roche Argentina por la donación del Vismodegib para poder llevar a cabo este trabajo.

6 - VEHICULIZACIÓN DEL APTÁMERO SGC-8C UTILIZANDO MATERIALES NANOESTRUCTURADOS PARA SU APLICACIÓN EN IMAGENOLÓGIA ONCOLÓGICA

J. Báez^a, R.J. Glisoni^b, A. Moglioni^c, P. Cabral^a, V. Calzada^a y H. Cerecetto^a

^aLaboratorio de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ^bInstituto NANOBIOTEC UBA-CONICET. Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. ^cInstituto IQUIMEFA UBA-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. *correo electrónico: romy.glisoni@gmail.com

Introducción

La imagen molecular, debido a su característica no invasiva, permite evaluar la patología en su contexto, siendo clave para entender el proceso tumoral, sin perturbar el ambiente y proporcionando información adicional a los métodos convencionales [1]. La estadificación tumoral, detección de las metástasis, la cirugía guiada por imagen, así como la cuantificación de una lesión son algunas de las diferentes aplicaciones en esta área [1]. Los aptámeros son oligonucleótidos de cadena sencilla (ADN o ARN) que tienen la característica de reconocer su diana con alta afinidad y especificidad, mediante un plegamiento tridimensional de su cadena. Los aptámeros tienen propiedades de reconocimiento equiparables a las de los anticuerpos; sin embargo, por la naturaleza de su composición tienen ventajas significativas en cuanto a su tamaño, producción y modificación [2]. Estas características los hacen excelentes candidatos para el desarrollo de nuevas plataformas biotecnológicas, así como la aplicación como agentes de imagen o terapia [2]. El Sgc8c es una secuencia truncada del aptámero Sgc8, el cual muestra una unión específica y con alta afinidad al receptor PTK7 [3]. Sgc8c tiene solamente 41 bases y una K_d de 0.78 nM para este receptor [3]. Si bien este receptor está presente en células normales, su sobreexpresión ha sido observada y reportada en cáncer de colon, tumores gástricos, cáncer de pulmón, próstata, mama y metástasis [3].

En trabajos previos realizados por el grupo del Área de Radiofarmacia se investigó el aptámero Sgc8c como agente de imagenología molecular en cáncer. Para este objetivo, Sgc8c fue modificado en su extremo 5' con un grupo $-(CH_2)_6-NH_2$ (aminohexilo) y el cual sirvió como *linker* para conjugar: (i) HYNIC (Sgc8c-HYNIC) o (ii) DOTA (Sgc8c-DOTA), dos agentes bifuncionales capaces de quelar metales, los que permitieron la unión a los radionucleidos Tecnecio-99m y Galio-67 (^{99m}Tc y ^{67}Ga), respectivamente [3]. Asimismo, el aptámero Sgc8c fue marcado con Alexa647 (Sgc8c-ALEXA), para su evaluación como agente de imagen óptica en el infrarrojo cercano. Con el objetivo de evaluar una mejora en su perfil farmacocinético, es que nos ha resultado de interés modificar estas entidades, a través de estrategias nanotecnológicas, teniendo en cuenta la experticia del grupo en estas aproximaciones [4-6], para estudiar la posibilidad de mejorar dichos comportamientos farmacocinéticos, sin alterar el reconocimiento molecular final de interés.

Materiales y Métodos

Vehiculización de Sgc8c y Caracterización Físicoquímica. Se estudió la vehiculización del aptámero Sgc8c- $(CH_2)_6-NH_2$ (Peso Molecular, M_w : 12,8 kDa), utilizando tres tipos de materiales nanoestructurados diferentes y con potencialidad para su encapsulación: (i) liposomas pegilados (LPS, dilución 1:50) a base de fosfatidilcolina de soja y colesterol, (ii) micelas poliméricas (PMs, 10% p/v) a base de poloxaminas prístinas T908 (M_w : 25 kDa), T1307 (M_w : 18 kDa), poloxámero prístino F127 (M_w : 12,6 kDa) y, (iii) hidroxipropil-beta-CD (HP β -CD, 10% p/v). La concentración de Sgc8c en todos los sistemas cargados fue de 10 μ g/mL. Los nanosistemas preparados fueron llamados: (i) LPS/Sgc8c, (ii) T908/Sgc8c, (iii) T1307/Sgc8c, (iv) F127/Sgc8c y (v) HP β -CD/Sgc8c. Se analizó el tamaño hidrodinámico de partícula (D_h), índices de polidispersión (PDI) y potencial-Zeta (Z-pot) mediante dispersión dinámica de luz láser (DLS, Zetasizer Nano-Zs, Malvern Instruments, UK), a 25 y 37°C y se monitoreó su estabilidad en el tiempo, en todos los sistemas vacíos y cargados con Sgc8c.

Estudios de Congelación/Liofilización de Sgc8c. Los parámetros críticos estudiados (DLS, más arriba) fueron re-analizados post-proceso de congelación/liofilización y posterior resuspensión en agua ultrapurificada, excepto en los sistemas LPS/Sgc8c, por encontrarse estabilizados estéricamente mediante pegilación.

Estudios de degradación *In Vitro*. Se cuantificó ($\lambda=260$ nm, H_2O) la integridad de Sgc8c (50 μ g/5mL) a distintos pH (pH 4, 7, y 10) y a diferentes intervalos de tiempo preestablecidos (10 minutos, 2 y 24 h), en los siguientes sistemas: (i) Sgc8c-libre en agua, (ii) LPS/Sgc8c, (iii) T908/Sgc8c, (iv) T1307/Sgc8c, (v) F127/Sgc8c y (vi) HP β -CD/Sgc8c.

Estudios de adsorción de Sgc8c. Se cuantificó Sgc8c ($\lambda=260\text{nm}$, H_2O) vehiculizado en LPS, PMs y HP β -CD antes y después de realizar un paso de clarificación utilizando filtros de nylon y ésteres mixtos de celulosa de $0,45\mu\text{m}$ de poro.

Ensayos de liberación *In Vitro*. Se estudió la liberación *in vitro* de Sgc8c vehiculizado en PMs a base de T908, utilizando una membrana de diálisis de 14 kDa con agitación constante. Para esto, se usaron $60\mu\text{g}/6\text{mL}$ (Sgc8c/T908), en un volumen final de medio acuoso de 50mL ($\text{pH} = 5,5$). Se cuantificó Sgc8c ($\lambda=260\text{nm}$, H_2O) en la solución interior y exterior a la membrana de diálisis, a diferentes intervalos de tiempo predeterminados (15, 30, 45 minutos, 1 y 24 h).

Resultados y Conclusiones Relevantes

Se logró vehiculizar eficientemente Sgc8c en todos los nanosistemas planteados. El tamaño medio de partícula de los sistemas estudiados y cargados con Sgc8c fue similar al de los sistemas vacíos en todos los casos. No se evidenciaron poblaciones con tamaños diferentes, por lo que se pudo concluir de manera preliminar que la encapsulación del aptámero habría sido exitosa y que no se vería alterada la agregación de las partículas dispersas en solución en presencia del aptámero. El Z-pot de los sistemas libres y cargados con Sgc8c resultó en todos los casos negativo y similar, mostrando evidencia de que el aptámero estaría incluido dentro de las partículas. Sgc8c resultó estable en función del tiempo, no evidenciándose procesos de degradación aparentes a distintos pH. Se observó que no hay una pérdida significativa de aptámero luego de filtrar los sistemas nanométricos utilizando filtros de ésteres mixtos de celulosa, siendo más significativa en el caso de los filtros de nylon. Asimismo, se realizó un estudio de congelación/liofilización y resuspensión en agua ultrapurificada de los distintos sistemas cargados, con el objetivo de observar cómo afecta a Sgc8c dicho proceso. Tanto para los sistemas PMs y HP β -CD cargados con Sgc8c no se observaron alteraciones en el proceso de liofilización y posterior resuspensión en medio dispersante, conservándose los tamaños de partícula, PDI y Z-pot, en todos los casos. En relación al ensayo de liberación *in vitro* de Sgc8c, se observó que a tiempos cortos del estudio (15-45min), Sgc8c no fue liberado del interior de las PMs y por lo tanto no fue hallado en el medio de liberación, pero al cabo de 24 h aproximadamente el 98% del mismo se encontró en el medio de liberación, manifestándose su liberación efectiva.

Por último, debido a los resultados satisfactorios de encapsulación de Sgc8c en distintas nanoestructuras y la buena estabilidad de los sistemas en función del tiempo, nos encontramos en condiciones de avanzar hacia los ensayos de farmacocinética y biodistribución *in vivo* en ratones BALB/c, con el objetivo de comprobar la optimización del perfil en relación a los agentes no encapsulados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Hill TK, Mohs AM. Image-guided tumor surgery: will there be a role for fluorescent nanoparticles? *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2016; 8, 4, 498–511.
- [2] Lakhin AV, Tarantul VZ, Gening LV. Aptamers: Problems, Solutions and Prospects. *Acta Naturae*. 2013; 5, 34-43.
- [3] Calzada V, Moreno M, Newton J, González J, Fernández M, Gambini JP, Ibarra M, Chabalgoity A, Deutscher S, Quinn T, Cabral P, Cerecetto H. Development of new PTK7-targeting aptamer-fluorescent and -radiolabelled probes for evaluation as molecular imaging agents: Lymphoma and melanoma *in vivo* proof of concept. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2017; 25, 1163-1171.
- [4] Glisoni RJ, Sosnik A. Encapsulation of the Antimicrobial and immunomodulator agent nitazoxanide within polymeric micelles. *J. Nanosci. Nanotechnol*. 2014; 14, 4670-4682.
- [5] Glisoni RJ, Sosnik A. Novel Poly(Ethylene Oxide)-*b*-Poly(Propylene Oxide) Copolymer-Glucose Conjugate by the Microwave-Assisted Ring Opening of a Sugar Lactone. *Macromolecular Bioscience*. 2014; 14, 1639-1651.
- [6] Glisoni RJ, Chiappetta DA, Moglioni AG, Sosnik A. Novel 1-indanone thiosemicarbazone antiviral candidates: Aqueous solubilization and physical stabilization by means of cyclodextrins. *Pharmaceutical Research* 2012; 29, 739

7 - DESARROLLO DE MATRICES DE FOSFATOS CON PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS

Bernardo Bayón^{1*}, Guillermo R. Castro¹

¹ Laboratorio de Nanobiomateriales, CINDEFI (CONICET, CCT La Plata), Depto. De Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 50 # 227, La Plata 1900, Argentina. *Expositor: Lic. Bernardo Bayón. *correo electrónico: bernibayon@gmail.com

La administración de fármacos a través de dispositivos locales podría reducir los efectos secundarios, mejorar la eficacia de los fármacos existentes y abrir la puerta a clases enteras de nuevos tratamientos. La administración local de agentes activos tiene numerosas ventajas en comparación con los tratamientos sistémicos en términos de eficacia terapéutica y tolerancia. Los sistemas híbridos son capaces de controlar con precisión la temporización de una liberación, logrando ajustarla a las propiedades del tejido objetivo. Un ejemplo de los materiales presentes en estos sistemas son los polímeros sintéticos, ampliamente utilizados como transportadores al no causar una reacción inflamatoria considerable en los tejidos en el sitio de implantación. En este caso, la velocidad de liberación del fármaco se puede controlar mediante diversos mecanismos: la difusión de la molécula desde la matriz que permanece intacta, la liberación simultánea del fármaco y la degradación de la matriz, o la expulsión del fármaco por presión osmótica. En este contexto, los fosfatos de calcio (CaPs), comúnmente utilizados como implantes para la reconstrucción ósea son buenos candidatos como portadores bioactivos y se encuentran disponibles en diversas formas, incluyendo cerámicas, cementos, espumas y recubrimientos. Los CaPs son considerados actualmente como una alternativa fiable al injerto óseo, pueden ser reabsorbidos por las células, presentan propiedades osteoinductivas evidenciadas y son eficientes en la mayoría de los casos clínicos como lo son cirugías ortopédicas y dentales.

Cualquier situación patológica (enfermedades tales como la osteoporosis u osteomielitis), afecta desfavorablemente al rendimiento del implante en términos del proceso de sustitución y/o reabsorción. En la actualidad, los esfuerzos centran en el desarrollo de sistemas mixtos que combinan sustitutos óseos de CaP con moléculas activas. Las investigaciones sobre estos sistemas de suministro de fármacos óseos tienen como objetivo mejorar el potencial osteogénico de los sustitutos y a su vez evitar o tratar posibles infecciones.

El uso y abuso de la utilización de antibióticos produce un surgimiento de cepas bacterianas multi-resistentes a estos antibióticos, siendo una problemática de suma importancia, causante de gran preocupación a nivel mundial. Las infecciones nosocomiales son recurrentes y una causa importante de complicaciones post-quirúrgicas, conduciendo en muchas ocasiones a la muerte del paciente.

Para intentar solucionar esta emergencia sanitaria, se establecieron dos estrategias para la administración de antimicrobianos, la primera consiste en el desarrollo de nuevos fármacos, y la segunda es la combinación de dos agentes con actividad microbicida diferentes que actúen conjuntamente en la formulación.

En particular, se ha demostrado un interés por la plata (Ag^{1+}) como antibacteriano desde tiempos antiguos y fue ampliamente estudiado en los últimos dos décadas. Las principales ventajas de los dispositivos de plata se basan en su relativamente baja toxicidad en humanos, amplio espectro antimicrobiano y baja probabilidad de producir resistencia en bacterias en comparación con los antibióticos tradicionales. De hecho, la plata sola o combinada con otras moléculas, se utiliza actualmente para controlar el crecimiento bacteriano en una amplia variedad de aplicaciones, incluyendo implantes dentales, cremas para la piel, parches, catéteres, ropa, productos de limpieza, entre otras.

La forma más común de utilización de la plata como agente antimicrobiano son las nanopartículas metálicas producidas a partir de la reducción del ión Ag^{1+} , siendo un eficaz antimicrobiano, aunque posee ciertas deficiencias en cuanto a la toxicidad producida sobre los tejidos humanos. Principalmente estas complicaciones son debidas a su pequeño tamaño y su capacidad de ingresar a través de las membranas celulares.

Enmarcado en este contexto, como objetivo de este trabajo se sintetizaron micropartículas de fosfato de plata, de un tamaño cercano al micrón, que conservan la actividad antimicrobiana del ión Ag^{1+} y a su vez son fácilmente incorporables a matrices de fosfatos de calcio generando un cemento apto para la

construcción de implantes óseos que presenten la capacidad de evitar una infección bacteriana y a su vez liberar de manera controlada un fármaco o un factor de crecimiento. Las matrices se desarrollaron combinando diversos tipos de fosfatos (tripolifosfato de sodio o α -trifosfato de calcio) con polímeros preferentemente naturales (quitano, pectina, alginato, celulosa bacteriana, etc.), incorporando a su vez las micropartículas de fosfato de plata. Los polímeros no sólo le ofrecen al *scaffold* propiedades estructurales y mecánicas interesantes, sino también que permiten lograr el perfil de liberación de fármacos deseado y a su vez contribuyen a la biodegradabilidad y biocompatibilidad del material.

Estos cementos híbridos son interesantes debido a que permiten la producción de matrices con una estructura tridimensional específica ya sea por la implementación de moldes, aprovechamiento de las estructuras poliméricas o utilización de impresoras 3D.

Estas variantes fueron evaluadas a lo largo de este trabajo concluyendo en el desarrollo de micropartículas de fosfato de plata capaces del transporte de biomoléculas, parches antimicrobianos de celulosa bacteriana y cementos de fosfato de calcio, con capacidad antimicrobiana y de transporte de fármacos, capaces de ser moldeados tridimensionalmente.

8 - NANOGELES BASADOS EN CELULOSA BACTERIANA Y NANOPARTICULAS SOLIDAS LIPIDICAS PARA TRATAMIENTO LOCAL DE TUMORES SOLIDOS

Maximiliano L. Cacicedo^{1*}, German A. Islan¹, Ignacio E. León², Vera A. Álvarez³, Igor Chourpa⁴, Emilie Allard-Vannier⁴, Natalia García-Aranda^{5,6}, Zamira V. Díaz^{5,6}, Yolanda Fernández^{5,6}, Simo Schwartz Jr.^{5,6}, Ibane Abasolo^{5,6}, Guillermo R. Castro¹

¹Laboratorio de Nanobiomateriales (CINDEFI, UNLP-CONICET CCT La Plata), Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, CP 1900 AJL Ciudad de La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina ² Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR, UNLP-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, CP 1900 AJL Ciudad de La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina ³ CoMP (Grupo de Materiales Compuestos), Instituto de investigación en Ciencia y Tecnología de los Materiales (INTEMA), Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Mar del Plata, Solís 7575, (B7608FDQ) Mar del Plata, Argentina ⁴ Universite Francois-Rabelais de Tours, EA6295 "Nanomedicaments et Nanosondes", 31 Avenue Monge, 37200, Tours, Francia ⁵ Functional Validation & Preclinical Research (FVPR), ⁶Drug Delivery and Targeting Group, CIBBIM-Nanomedicine, Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08035 Barcelona, España ⁶Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Barcelona, España *Expositor: Dr. Maximiliano L. Cacicedo. *correo electrónico: maximilianocacicedo@gmail.com

Se ha desarrollado un sistema implantable para liberación controlada de quimioterapéuticos a partir de hidrogel de celulosa bacteriana (BC) y nanopartículas lipídicas (NLCs). En primer término, NLCs fueron sintetizadas para encapsular y liberar de manera sostenida el fármaco doxorubicina. Dos tipos de formulaciones de NLCs fueron desarrolladas. La primera conteniendo doxorubicina monocationica (Dox-H), más hidrofílica. La segunda conteniendo doxorubicina neutra (Dox-N), más hidrofóbica. Aquellas NLCs cargadas con Dox-H (NLCs-H) mostraron los valores más bajos de eficiencia de encapsulación (EE), alcanzándose un 48%. En cambio, Dox-N mostró una buena capacidad de ser encapsulada en las NLCs (NLCs-N) alcanzando el valor de EE de 97%. Ambas formulaciones exhibieron perfiles hiperbólicos y de característica sostenida para la liberación del fármaco. NLCs-H liberaron más cantidad de fármaco por unidad de tiempo en comparación con la lenta liberación observada en las NLCs-N. Dicha característica se asignó a la diferente capacidad de interacción entre el fármaco y la matriz para cada especie iónica de doxorubicina. Mediciones realizadas mediante barrido de dispersión de la luz (DLS) permitieron observar un diámetro aparente de 150 nm en ambos tipos de nanopartículas. Dicho resultado fue confirmado al tomar imágenes de las NLCs por microscopia electrónica de transmisión. Además, se determinó la carga en la superficie de las NLCs mediante medidas de potencial zeta. Un valor promedio de +2,5 mV pudo ser observado. Análisis realizados por medio de termogravimetría y difracción de rayos X evidenciaron las interacciones existentes entre el fármaco y la matriz lipídica, siendo estas considerablemente más fuertes en el caso de las NLCs-N. Estas diferencias en las interacciones sugirieron ser las responsables de los diferentes perfiles de liberación y EE entre ambos tipos de formulación. A continuación, se evaluó la capacidad citotóxica de ambas formulaciones frente a la línea de cáncer de mama MDA-MB-231. Tiempos de exposición cortos generaron valores bajos de IC₅₀ para las NLCs en comparación con el fármaco libre. Al incrementar los tiempos de exposición de las NLCs con las células a 16 y 72 horas, los valores de IC₅₀ se vieron disminuidos considerablemente. Estos resultados demostraron que el fármaco liberado desde las NLCs es activo y que su efecto sobre células cancerígenas es modulado por las cinéticas de liberación. Nuestros resultados además sugieren que la doxorubicina fue internalizada por distintas vías. Imágenes adquiridas mediante microscopia confocal mostraron que las NLCs son internalizadas por vía endocítica, en contraste con la doxorubicina libre que ingresa a las células por difusión simple. En la etapa final de este trabajo, una mezcla de NLCs-H y NLCs-N fue incorporada en una matriz tridimensional de celulosa bacteriana (BC-NLCs-NH). Nuestros ensayos han demostrado que dicha matriz posee la capacidad de liberar las nanopartículas de manera sostenida en el tiempo. Imágenes de SEM y TEM permitieron observar como las NLCs se incluyen en la matriz del hidrogel conservando su morfología y tamaño e interaccionando con las nanofibras de BC. Finalmente, BC-NLCs-NH fue ensayada in vivo mediante su implantación sobre un modelo

tumoral ortotópico de mama. Dicho modelo se generó mediante la implantación de células MDA-MB-231 en la grasa intra-mamaria en el extremo inferior de una de las cadenas mamaria. Una vez crecido y desarrollado el tumor, se realizó la implantación de la matriz. Los resultados observados mediante tomografía computada mostraron una disminución del 50% en el crecimiento tumoral y una fuerte reducción en las incidencias de metástasis. Además, el tratamiento con BC-NLCs-NH también disminuyó los efectos tóxicos locales de la doxorubicina. Nuestros resultados exponen claramente la potencialidad de BC-NLCs-NH como un sistema de liberación local de nanopartículas terapéuticas contra tumores sólidos de mama.

9 - NANOCARRIERS DE DERMATAN SULFATO Y QUITOSANO FORMULADOS PARA EL DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO PRECOZ DE LA ENFERMEDAD VASCULAR

Blachman A¹.; Funez F¹.; Sosnik A³.; Glisoni R². y Calabrese G¹.

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedra de Biología Celular y Molecular. ² Universidad de Buenos Aires. Cátedra de Tecnología Farmacéutica II. CONICET. Instituto de Nanobiotecnología (NANOBIOTEC). Buenos Aires, Argentina. ³ Laboratory of Pharmaceutical Nanomaterials Science, Department of Materials Science and Engineering, Technion-Israel Institute of Technology Technion City, Haifa, Israel.

La enfermedad vascular; particularmente la aterosclerosis como origen subyacente, constituye una de las principales causas de muerte a nivel mundial y su incidencia crece continuamente como resultado de la epidemia internacional de obesidad y diabetes tipo 2 (Tabas, 2015). Llamativamente, a pesar que la aterosclerosis compromete la pared del vaso, aún no se han diseñado tratamientos capaces de controlar la aterogénesis en la pared vascular atero-propensa. Mientras, que las terapias actuales tienen como blancos fundamentales a los factores de riesgo asociados a la enfermedad: hipertensión, hiperlipemia, tabaquismo, obesidad, entre otros (Little, 2011). La aterosclerosis es considerada una enfermedad inflamatoria crónica que resulta de la interacción de diferentes componentes de la matriz extracelular vascular, lipoproteínas y componentes celulares como las células endoteliales, los monocitos/macrófagos, los linfocitos T y las células musculares lisas (Libby, 2013). El rol activo de los proteoglicanos de la matriz extracelular vascular adquiere particular interés en las etapas tempranas de la enfermedad (Nakashima, 2008). Nuestro grupo de trabajo ha descrito el remodelado cuali y cuantitativo de los proteoglicanos del endotelio murino y humano frente a dietas hipercolesterolémicas y a las lipoproteínas aisladas a partir de una población joven sana, respectivamente (Oberkersch 2014, 2016). Sobre la base de lo anteriormente expuesto, hemos diseñado complejos de polielectrolitos (PECs) formulados con dermatán sulfato (polisacárido polianiónico) y quitosano (QT) (polisacárido policatiónico); ambos de bajo peso molecular (Rasente, 2016). El DS de bajo peso molecular, sería el biomaterial responsable de la interacción específica de estos nuevos nanosistemas con el endotelio vascular murino, a través de receptores CD44 (Vasta, 2016).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar las características de la interacción de estos PECs con el endotelio; de manera de establecer su potencial empleo como nanocarriers con especificidad vascular.

Los PECs y los PECs marcados con fluoresceína (PECs-FITC), fueron obtenidos según el protocolo descrito previamente (Rasente, 2016). El tamaño (D_h), la distribución del tamaño (PDI) y el potencial Z de los PECs fue determinado por dispersión dinámica de la luz (DLS) con Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) equipado con laser He-Ne (630 nm). El estudio de la interacción e internalización de los nanosistemas con las células endoteliales venosas humanas aisladas a partir del cordón umbilical (HUVEC) y con macrófagos humanos, fue abordado a través de microscopía de fluorescencia y citometría de flujo, en presencia de PECs-FITC durante diferentes períodos de incubación (entre 30 a 180 min). Mientras que la expresión del receptor CD44 fue determinada por RT-PCR sobre células endoteliales murina (H5V) en condiciones normales de cultivo y frente a hipoxia química, inducida por cloruro de cobalto 250 mM.

Ambas poblaciones de PECs (con y sin marca) registraron un radio hidrodinámico entre 420–690 nm, con un PDI 0.45 ± 0.085 y un potencial Z de 31.3 ± 1.63 mV. Por otra parte, la microscopía de fluorescencia reveló la interacción específica de los nanosistemas con las HUVECs, sin detección de fluorescencia en el caso de los macrófagos humanos. El puntillado fluorescente difuso, luego de 30 min de incubación en presencia de los PECs-FITC se transformó paulatinamente en agregados fluorescentes intracelulares, conforme se incrementó el tiempo de incubación (120 y 180 min). Estos resultados fueron confirmados por la citometría de flujo a través del corrimiento de los histogramas hacia mayores valores en la escala de la fluorescencia ($2.83 < 18.8$, 30 min vs 180 min; respectivamente). Los resultados obtenidos sugieren que este nuevo sistema nanoparticulado fue capaz de interactuar específicamente y luego ser internalizado por endocitosis por el endotelio vascular. Por su parte, la hipoxia generó el incremento significativo en la expresión del receptor CD44 (0.1 ± 0.04 vs 0.5 ± 0.19 , control vs cobalto; $P < 0.1$). Estos registros indican que el nuevo sistema nanoparticulado sería capaz de distinguir entre un endotelio normal quiescente y un endotelio activado frente a la injuria por hipoxia.

En conclusión, el estudio describe un método simple y reproducible para formular un nuevo sistema nanoparticulado, el cual reconoce precoz y específicamente al endotelio vascular injuriado. La inclusión de QT en su formulación favorece la captación de los PECs a través de la vía endocítica y su posterior escape del endosoma; evitando de esta manera la degradación lisosomal (Malatesta, 2015). Los PECs DS/QT constituyen un novedoso nanocarrier para la liberación gradual de la molécula encapsulada en el endotelio injuriado.

Referencias

- Libby, P. *Atherosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 32, 2045–2051, 2013.
- Little P. J., Chait A., Bobik A. *Pharmacology & Therapeutics*, 131(3), 2011.
- Malatesta M., Grecchi S., Chiesa E., Cisterna B., Costanzo, M., Zancanaro, C. *Eur. J. Histochem* 59, 61-65, 2015.
- Nakashima, Y., Wight, T. N. & Sueishi, K. *Cardiovascular Research* 79, 14–23, 2008.
- Oberkersch R. Dinámica de los proteoglicanos en la injuria vascular inducida por lipoproteínas ricas en triglicéridos. Tesis Doctoral, 2016.
- Oberkersch, R., Maccari, F., Bravo, A., Volpi, N., Gazzaniga, S., Calabrese, G.C. *International Journal of Experimental Pathology* 95, 181-90, 2014.
- Rasente, R.Y., Imperiale, J.C., Lázaro-Martínez, J.M., Gualco, L., Oberkersch, R., Sosnik, A., Calabrese G.C. *Carbohydrate Polymers* 144, 362–370, 2016.
- Tabas I., García-Cardena G., Owens G. *J Cell Biol.* 209 (1), 2015.
- Vasta M, Bariandarán A, Funez F1, Glisoni R, Sosnik A, Calabrese. *Translational Medicine Congress*, Buenos Aires Argentina, Noviembre 2016.

Bioética Comité de Ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires y del Sanatorio Güemes (EXP-UBA 36310/16).

10 - ESTRATEGIAS BASADAS EN MICRO- Y NANO-PARTICULAS HÍBRIDAS PARA AUMENTAR LA BIODISPONIBILIDAD DE ANTIBIÓTICOS EN INFECCIONES PULMONARES DE DIFÍCIL ERRADICACIÓN

German A. Islan^{1*}; María E. Ruiz^{2,3}; Sebastián Scioli Montoto^{2,3}; Jose F. Morales^{2,3}; María L. Sbaraglini³; Alan Talevi³; Luis Bruno-Blanch³; Nelson Durán⁴; Guillermo R. Castro¹

¹Laboratorio de Nanobiomateriales, CINDEFI, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina ²Control de Calidad de Medicamentos, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Calle 47 y 115, La Plata, Argentina ³Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Bioactivos, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Calle 47 y 115, La Plata, Argentina ⁴Instituto de Química, Laboratorio de Química Biológica, *Universidade Estadual de Campinas*, C.P. 6159, CEP 13083-970 Campinas, SP, Brazil *Expositor: Dr. Germán A. Islan. *correo electrónico: germanislan@gmail.com

Actualmente, los tratamientos médicos contra las infecciones pulmonares causadas por patógenos oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa*, y tal como ocurre en la fibrosis quística (FQ), implican la administración de antibióticos en altas dosis y de forma recurrente, con la consecuente aparición de efectos secundarios no deseados. El reto principal es, sin embargo, la erradicación de los biofilms microbianos que se encuentran inmersos en una densa capa de mucus, lo cual dificulta la biodisponibilidad de los antibióticos administrados por vía inhalatoria. Por consiguiente, el desarrollo de nuevos sistemas de administración de fármacos capaces de proporcionar una liberación local y sostenida de los fármacos en la región pulmonar es un factor clave para mejorar el resultado terapéutico de tales infecciones. En este sentido, dos tipos de vehículos híbridos inhalables fueron diseñados para tal fin y seleccionados como transportadores eficientes del antibiótico Levofloxacina (LV). Por un lado, se prepararon micropartículas por co-precipitación de CaCO₃ en presencia de alginato y un posterior tratamiento con una alginato-liasa (AL) para modificar su estructura superficial y porosidad, y mejorar así la capacidad de carga del fármaco. Las micropartículas híbridas se cargaron con LV y DNasa, como agente mucolítico adicional, y mostraron porcentajes de encapsulación del 40 y 67 % respectivamente. Los estudios *in vitro* demostraron que las micropartículas fueron capaces de controlar la liberación de DNasa durante 24 h, mientras que el 30% de LV se liberó en 3 días. La caracterización morfológica se realizó por microscopía óptica, de fluorescencia y microscopía electrónica de barrido (SEM), así como dispersión dinámica de la luz (DLS), mostrando partículas esféricas con una superficie rugosa y una estrecha distribución de tamaños (5 µm). Por otro lado, se desarrollaron nanopartículas sólidas lipídicas (NSL) y transportadores lipídicos nanoestructurados (TLN) híbridos, mediante la técnica de emulsificación y ultra-sonicación. Los mismos, mostraron tamaños cercanos a los 200 nm y eficiencias de encapsulación de LV en el rango de 20-55%. A su vez, la DNasa fue incorporada como agente mucolítico para favorecer la capacidad de penetración de las nanopartículas en el biofilm bacteriano. Se observó una liberación controlada de LV durante 48 horas. Tanto para las micro- y nano- partículas se realizaron estudios de FTIR, XRD, DSC e isothermas de adsorción de nitrógeno que revelaron la presencia de los fármacos en un estado no cristalino. Se encontró en ambos casos un efecto bactericida contra *P. aeruginosa* en placas de agar y se corroboró con el kit Live/Dead y observaciones TEM. Además, se encontró una marcada disminución de los valores de concentración inhibitoria mínima respecto del antibiótico libre. Por último, se estudió la capacidad de los transportadores para mejorar la localización de LV en el pulmón por vía inhalatoria. Se realizaron así estudios *in vivo* en ratones sanos mediante la administración por nebulización e inhalación de polvo seco, seguido de la cuantificación de LV en tejido pulmonar por un método validado por HPLC. Particularmente se observaron resultados de gran interés para el caso de las micropartículas cargadas con LV, que fueron capaces de aumentar la biodisponibilidad del antibiótico en pulmón al menos 3 veces más eficientemente que la LV libre. Los presentes desarrollos abren la puerta a nuevos sistemas de administración de fármacos que pueden proporcionar soluciones terapéuticas mejoradas contra infecciones bacterianas y en particular como herramienta potencial en el tratamiento de patologías complejas como la FQ.

11 - NANOSISTEMAS DE FENAZINA COMO POTENCIALES AGENTES SELECTIVOS EN CONDICIONES DE HIPOXIA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA

N. Lecot^{a,b}, B. Davila^b, C. Sánchez^b, M. Fernández^a, P. Cabral^a, H. Cerecetto^{a,b}, M. González^b y R.J. Glisoni^c

^aLaboratorio de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ^bGrupo de Química Orgánica Medicinal. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. ^cInstituto NANOBIOTEC UBA-CONICET. Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

Introducción

El cáncer de mama es el más frecuente en las mujeres, con un aumento en los países en desarrollo, principalmente porque el diagnóstico se hace en las últimas etapas de la enfermedad [1]. El cáncer de mama es un tumor sólido que se caracteriza por un alto grado de zonas hipóxicas difícilmente tratables. Recientemente, hemos sintetizado un nuevo derivado de fenazina (FNZ; N^5, N^{10} -dióxido de 2-amino-7(8) - fluorofenazina), con buenos rendimientos sintéticos (~60%), que actúa como un agente selectivo en condiciones de hipoxia, considerado una de las dianas terapéuticas alternativas en el tratamiento de tumores sólidos [2,3]. Con el objetivo de aumentar la solubilidad acuosa de FNZ ($208 \pm 31 \mu\text{g/mL}$) y mejorar ciertos obstáculos existentes en la terapia antitumoral actual como una biodistribución no-específica, concentraciones intratumorales bajas o insuficientes y resistencia desarrollada por parte de ciertas células tumorales al tratamiento convencional, es que resultó de nuestro interés explorar la encapsulación de FNZ en micelas poliméricas (PMs) a base de poli(óxido de etileno)-*b*-poli(óxido de propileno) (PEO-PPO) y sus derivados glucosilados (Glu) [4,5]. Las PMs ofrecen diversas ventajas debido a sus propiedades singulares, incluyendo: (i) una buena estabilidad en agua por encima de su concentración micelar crítica (CMC), (ii) cargas de fármaco en el núcleo elevadas, (iii) la capacidad de modificar su superficie con una diversidad de ligandos activos y (iv) tamaños nanométricos, que son adecuados para aprovechar el efecto de permeación y retención mejorada (EPR) para el tratamiento del cáncer [6]. EPR es el único fenómeno que capitaliza las características de los tumores sólidos, relacionadas con las diferencias anatómicas y fisiopatológicas que poseen con los tejidos normales. Además del efecto EPR, la envoltura/núcleo de las PEO-PPO PMs proporcionaría una semivida más larga en circulación y la glucosilación no sólo estabilizaría el sistema coloidal debido a formación de múltiples enlaces de hidrógeno en la corona micelar, sino que también favorecería la internalización y la potencial acumulación en el tumor [5,7]. Por último, y para optimizar la estabilidad de la solubilidad de FNZ alcanzada con las PMs, se exploró por primera vez según nuestro conocimiento, la hidratación de PEO-PPO PMs utilizando liposomas-pegilados (LPS) preformados, con resultados muy alentadores.

Materiales y Métodos

Caracterización Físicoquímica. Se prepararon PMs vacías (15% p/v) a base de F127, F127-Glu, T1307, T1307-Glu y mezcla T1307:F127 (50:50) y sus respectivas PMs cargadas (15% p/v) con FNZ (2 mg/mL). Por otro lado, se exploró la hidratación de F127 y T1307 (10% p/v) utilizando LPS preformados a base de fosfatidilcolina de soja y colesterol. En este caso, los sistemas vacíos fueron llamados F127:LPS y T1307:LPS y aquellos cargados con FNZ (2 mg/mL): F127:LPS/FNZ y T1307:LPS/FNZ, respectivamente. Todos los sistemas fueron caracterizados por *Dynamic Light Scattering* (DLS, tamaño hidrodinámico promedio, índice de polidispersión (PDI) y potencial-Zeta) y por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Análisis de la Viabilidad Celular *In Vitro*. Se utilizaron células NIH 3T3 (normales) y 4T1 (células de tumor de mama murino similar estadio IV humano) con el siguiente protocolo de tratamiento (FNZ: 0-40 μM): (i) FNZ-libre, (ii) nanosistemas vacíos, (iii) nanosistemas cargados con FNZ y (iv) controles sin tratamiento (tres ensayos colorimétricos MTT por cuadruplicado).

Estudios *In Vivo*. Toxicidad Aguda en animales. Se trabajó con un grupo de ratones BALB/c sanos de 2 meses de edad. Posología: PMs vacías y cargadas (dosis única: 2000 mg/kg ratón) con FNZ (dosis única: 20 mg/kg ratón) y volumen de inyección (185 μL) por vía intraperitoneal (IP). Se evalúa la supervivencia de los animales durante 14 días, y siguiendo el protocolo de Irwin antes y después de la dosificación como: modificaciones de la piel y del pelo, los ojos, las mucosas, el aparato respiratorio, actividad somato-motriz, comportamiento, entre otras.

Evaluación de la reducción de volumen tumoral. A partir de los resultados obtenidos de la caracterización y estabilidad fisicoquímica, evaluación de la actividad antitumoral *in vitro* (viabilidad celular) y estudios de toxicidad aguda, se seleccionaron los nanosistemas óptimos y más seguros y se trataron ratones BALB/c inducidos con tumor de mama 4T1, por vía IP, con las siguientes preparaciones: (i) T1307:F127 (50:50), (ii) T1307:F127/FNZ (50:50) y (iii) controles sin tratamiento (n=3, en cada caso). La posología de FNZ fue de 20 mg/kg ratón, dosis única diaria con descanso de un día (sin inyección). Posteriormente, a los 18 días de tratamiento, se procedió a sacrificar por dislocación cervical y necropsia y se obtuvieron las imágenes *ex vivo* de los ratones BALB/c con tumor de mama inducido 4T1. Es así, que se inoculan las células en los ratones BALB/c, se aguarda el periodo de implantación del tumor (4 días) y se procede al inicio del tratamiento. Se mide el diámetro mayor y menor con un calibrador vernier (Ostrand-Rosenberg) antes de cada día de tratamiento, teniendo en cuenta la reducción al final del estudio, para la valoración sobre la eficacia del mismo.

Resultados

Las PMs vacías y cargadas con FNZ presentaron distribuciones de tamaño uniforme, índices de polidispersión (PDI) < 0,5 y Zeta-potenciales levemente negativos, que muestran ser compatibles con sistemas estables y que aumentaron hasta 10 veces la solubilidad de FNZ en agua. Se analizaron las estructuras cargadas con FNZ por TEM, en las que se observó morfologías esféricas del orden de los nanómetros. FNZ-libre no afecta la viabilidad celular en células normales NIH 3T3 y disminuye la misma al aumentar su concentración en células tumorales 4T1. Las PMs vacías no afectan las células NIH 3T3, mientras que PMs cargadas con FNZ, disminuyeron la viabilidad celular en células 4T1 a concentraciones menores del 50% y concentraciones de FNZ de ~30 μ M. Por último, los tratamientos realizados en ratones BALB/c con tumor de mama inducido 4T1, utilizando las preparaciones más promisorias y seguras (T1307:F127, así como sus respectivos sistemas cargados con FNZ), mostraron que se obtuvo una disminución del volumen de la masa tumoral en aquellos ratones que fueron tratados con T1307:F127/FNZ (**Figura 1**).

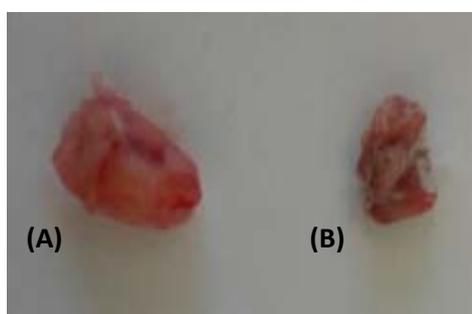


Figura 1. Imagen *ex vivo* de: **(A)** control del tumor sin tratamiento y **(B)** tumor post-tratamiento con T1307:F127/FNZ.

Conclusiones y Perspectivas

FNZ es un potencial agente antitumoral que combina la capacidad de intercalarse al ADN con un mecanismo de citotoxicidad selectivo en hipoxia. Su baja solubilidad en medios acuosos hace necesaria la implementación de estrategias nanotecnológicas para poder llevar adelante sus evaluaciones biológicas *in vitro* e *in vivo*. Las PMs prístinas, sus mezclas, como aquellas glucosiladas desplegaron alta capacidad de solubilización de FNZ y la estabilidad de estos sistemas se vio favorecida con la incorporación de LPS al medio. Si bien se requieren estudios más exhaustivos sobre la capacidad de estos nanosistemas cargados con FNZ para producir reducción considerable de la masa tumoral en ratones inducidos con tumor de mama 4T1, los resultados obtenidos hasta el momento indicarían la potencialidad de estos sistemas como agentes terapéuticos selectivos en condiciones hipóxicas en cáncer de mama.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Leyva, S.; Castanedo, V.; Leyva, E. Synthesis of novel fluorobenzofuroxans by oxidation of anilines and thermal cyclization of arylazides. *J. Fluor. Chem.* 2003, 121, 171–175.
- [2] Cerecetto H, González M, Lavaggi ML, Aravena MA, Rigol C, Olea-Azar C, Azqueta A, de Cerain AL, Monge A, Bruno AM. Phenazine 5,10-dioxide derivatives as hypoxic selective cytotoxins: Part II. Structure-activity relationship studies. *Med Chem.* 2006, 5, 511-21.
- [3] Cerecetto H, González M, Lavaggi ML, Azqueta A, López de Cerain A, Monge A. Phenazine 5,10-dioxide derivatives as hypoxic selective cytotoxins. *J Med Chem.* 2005, 48, 21-3.
- [4] Glisoni, R.; Sosnik, A. Encapsulation of the Antimicrobial and immunomodulator agent nitazoxanide within polymeric micelles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2014, 14, 4670-4682.
- [5] Glisoni RJ, et al. Novel Poly(Ethylene Oxide)-*b*-Poly(Propylene Oxide) Copolymer-Glucose Conjugate by the Microwave-Assisted Ring Opening of a Sugar Lactone. *Macromolecular Bioscience.* 2014; 14, 1639-1651.
- [6] Torchilin V, et al. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2011; 63,131-135.
- [7] Carvalho KC, et al. GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marke. *Clinics.* 2011, 66, 965-972.

12 - FORMULACIÓN Y ESTUDIOS *IN-VITRO* DE NANOCÁPSULAS LIPÍDICAS DE PRAZIQUANTEL PARA EL TRATAMIENTO DE LA ESQUISTOSOMIASIS.

E. Arrúa,¹ G. Bastiat,² C. Caffrey,³ C. Salomon.^{1,4}

¹IQUIR-CONICET, Rosario, Argentina. ²UFR Sciences Pharmaceutiques et Ingénierie de la Santé, MINT, UMR-S 1066. Angers, France.

³Center for Discovery and Innovation in Parasitic Diseases, Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of California San Diego, U.S.A. ⁴Área Técnica Farmacéutica, Departamento Farmacia. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, Suipacha 531, S2002LRK Rosario, Argentina. *correo electrónico: csalomon@fbioyf.unr.edu.ar

INTRODUCCIÓN

El Praziquantel (PZQ) es un antihelmíntico de amplio espectro utilizado para tratar helmintiasis producidas por tremátodos y céstodos (ej. *Schistosoma*, *Hymenolepis spp.*). PZQ pertenece a la clase II en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica y su solubilidad en agua es la etapa limitante de su absorción. La formulación de este tipo de fármacos plantea numerosos e importantes problemas derivados del hecho de que su biodisponibilidad oral es incompleta, variable y dependiente de diversos factores. En este contexto, una alternativa nanotecnológica es la formulación de nanocápsulas lipídicas. Éste es un proceso de recubrimiento de los fármacos con materiales de distinta naturaleza, para dar lugar a partículas de tamaño nanométrico. Una de las técnicas recientemente desarrolladas para la elaboración de este tipo de partículas es el método de inversión de fase, que permite la formación de nanocápsulas a través de una manipulación térmica de un sistema aceite/agua.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue formular, caracterizar y evaluar *in-vitro* nanocápsulas lipídicas (NCL) de PZQ para el tratamiento de la esquistosomiasis.

METODOLOGÍA

Formulación de NCL de 50 nm. Se mezclaron los componentes a temperatura ambiente durante 5 minutos, la emulsión resultante fue sometida a 3 ciclos de temperatura de entre 55 a 90 °C. En el tercer ciclo, durante el descenso de la temperatura se hizo el último agregado de agua a 4 °C para la dilución de la suspensión de NCL en el punto en que se da la inversión de fases. Para las nanocápsulas elaboradas se empleó: Kolliphor HS 15, Lipoid 75.3, NaCl y Labrafac. Para la elaboración de NCL conteniendo PZQ, se disolvió previamente en acetona en una concentración de 20 mg/ml, y la solución obtenida fue incorporada sobre Labrafac, manteniéndose en agitación constante. Una vez eliminada la acetona, se agregan los componentes en las proporciones antes mencionadas y se somete a los tres ciclos de temperatura de 55 a 90 °C. Las NCL fueron ensayadas por triplicado.

Diámetro hidrodinámico (DH), índice de polidispersidad (IP), potencial zeta (PZ) y conductividad (COND). Las medidas de DH, IP, PZ y COND fueron realizadas a 25 °C sobre las suspensiones de NCL diluidas en un factor de 60 en volumen.

Activación del complemento. Se evaluó la activación del sistema del complemento en suero humano normal mediante la medición de la capacidad hemolítica residual del sistema luego de estar en contacto con las NCL blanco y las NCL de PZQ. Para esto las suspensiones fueron diluidas hasta una concentración final de 5 mg/ml de NCL.

Cultivo celular. Se realizaron 6 diluciones de las NCL blancos y NCL conteniendo los fármacos para ensayar la viabilidad celular en presencia de estas. Las diluciones ensayadas fueron: 2, 4.5, 10, 20, 45 y 100 mg/ml.

Ensayos in vitro sobre gusanos *S. mansoni*. Se llevaron a cabo experimentos *in vitro* sobre gusanos adultos *S. mansoni* en placas. Se estudió el efecto de las NCL de PZQ y NCL blanco en diferentes concentraciones y distintos tiempos. Además se comparó con el efecto del PZQ sin tratar.

RESULTADOS

Diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad, potencial zeta y conductividad

Los resultados se muestran en la tabla 1. En todos los casos los valores de tamaño promedio obtenido fueron cercanos a los esperados (50 nm). Para todas las muestras los valores de índice de polidispersidad fueron inferiores a 0,08 nm, podemos decir que las partículas formuladas tienen un tamaño homogéneo. El valor de conductividad para todas las suspensiones ensayadas fue cercano a 0,6 mS/cm.

Tabla 1 Diametro hidrodinámico, IP, PZ y conductividad de las NCL.

	Blanco			PZQ		
	DH (nm)	56,3	56,7	61,4	53,4	58,7
IP (nm)	0,06	0,04	0,03	0,05	0,06	0,06
PZ (mV)	-7,55	-3,96	-4,8	-12,3	-5,43	-5,41
COND (mS/cm)	0,65	0,58	0,57	0,59	0,92	0,69

Activación del complemento

En los casos en los que se emplearon NCL conteniendo PZQ se observa que la activación del sistema del complemento es similar a lo que ocurre con las LNC vacías. Esto podría que el PZQ en estos casos ensayados estaría encapsulado dentro de las LNC.

Cultivo celular

Tanto en las NCL blanco como las NCL conteniendo PZQ la proporción de células supervivientes fue similar entre sí y a las NCL vacías, tanto a las 24 como a las 48 horas.

Ensayos *in-vitro* sobre gusanos *S. mansoni*

Los resultados obtenidos indicaron que la capacidad de inmovilizar e influenciar la disminución de tamaño de los gusanos fue similar para las NCL de PZQ respecto al PZQ sin tratar, mientras que al trabajar con NCL blanco no se observaron efectos significativos sobre los gusanos. En este sentido podemos afirmar que las NCL de PZQ son activas frente a *S. mansoni*.

CONCLUSIONES

Los resultados muestran que las NCL blancos y NCL de PZQ exhiben un tamaño similar y cercano a 50 nm. El IP en todos los casos fue menor o igual a 0,08, lo que indica una distribución de tamaño homogénea. Se observa una activación del sistema del complemento para las NCL de PZQ similar a la de las NCL blancos, lo que podría indicar la presencia del fármaco en el interior de las cápsulas.

Las NCL blancos y NCL de PZQ presentan resultados similares respecto la supervivencia celular tanto a las 24 como a las 48 horas.

Se demostró actividad contra gusanos *S. mansoni* para las NCL de PZQ mediante ensayos *in vitro*. Las NCL cargadas con PZQ representan una importante alternativa para una distribución eficiente de dicho agente antiparasitario.

13 – SISTEMAS TRANSDÉRMICOS DE LIBERACIÓN ELECTROMODULADA EN BASE A FILMS FINOS DE NANOTUBOS DE CARBONO

Schwengber^{a,b}, H. J. Prado^{a,b,c}, P. R. Bonelli^{a,b}, A. L. Cukierman^{a,b,c,*}

^a Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Industrias-PINMATE, Ciudad Universitaria, C1428EGA Buenos Aires, Argentina ^b Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Av. Rivadavia 1917, C1033AAJ Buenos Aires, Argentina ^c Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Tecnología Farmacéutica, Cátedra de Tecnología Farmacéutica II, Junín 956, C1113AAD Buenos Aires, Argentina. *correo electrónico: analea@di.fcen.uba.ar; anacuki@ffyb.uba.ar

Introducción

La aplicación de nanotubos de carbono (NTCs) para el desarrollo de sistemas transdérmicos de liberación controlada constituye una alternativa promisoría para la administración de ingredientes farmacéuticos activos, que prácticamente no ha sido investigada. Los NTCs presentan características distintivas que los hacen muy adecuados con este fin: permiten una alta carga de droga, actúan como favorecedores de la penetración, su actividad antimicrobiana intrínseca colabora en el mantenimiento de la estabilidad microbiológica de los films permitiendo un uso prolongado, y también se ha demostrado la bioadhesividad de los NTCs ^{1,2}. Las propiedades conductoras de la electricidad de redes de NTCs favorecen también su potencial empleo en sistemas transdérmicos modulados aplicando voltajes eléctricos. En el presente trabajo, se prepararon y caracterizaron films finos de NTCs (buckypapers) cargados con drogas modelo, y se estudió comparativamente su desempeño, *in vitro*, como potenciales sistemas transdérmicos en forma pasiva y electromodulada. Como drogas modelo se emplearon clonidina, de naturaleza básica y flurbiprofeno, de naturaleza ácida.

Materiales y métodos

Los buckypapers se prepararon empleando NTCs comerciales de pared simple, funcionalizados con grupos carboxilo. Los NTCs se dispersaron en soluciones etanólicas de las drogas mediante un procesador ultrasónico. Las dispersiones obtenidas se secaron en estufa para favorecer la deposición de las drogas sobre los NTCs. Luego, los NTCs cargados se redispersaron en hexano en un baño ultrasónico y se filtraron sobre membranas de nylon (tamaño de poro de 0,22 μm). Los buckypapers con y sin carga de drogas se caracterizaron mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), espectroscopía Raman, difracción de rayos X (XRD), calorimetría diferencial de barrido / termogravimetría (DSC-TG) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Además, se estudiaron las propiedades eléctricas de los buckypapers, mediante el método de las cuatro puntas y se determinó la eficiencia de carga de las drogas. Se evaluó la cinética de liberación de las drogas modelo empleando celdas de difusión de Franz adaptadas para la realización de ensayos pasivos y electromodulados.

Resultados

Los resultados de FT-IR, XRD y DSC-TG de los NTCs cargados con las drogas, indicaron que éstas se encontraban depositadas en estado amorfo. Además las mediciones de DSC-TG mostraron un efecto estabilizador de las drogas por parte de los NTCs. En los espectros Raman, las variaciones en las relaciones de intensidad entre la banda-D (modos inducidos por desorden) y la banda-G (modos de tipo grafitico) de los NTCs cargados con respecto a los NTCs puros, resultó característica de la funcionalización no covalente de los mismos. Las imágenes SEM (Figs. 1a y 1b) evidenciaron que las drogas estaban finamente depositadas sobre los NTCs. La conductividad eléctrica de los films fue de $220 \pm 7,9 \text{ S m}^{-1}$, para los buckypapers cargados con clorhidrato de clonidina y de $308 \pm 9,3 \text{ S m}^{-1}$, para los cargados con flurbiprofeno. La eficiencia de carga resultó de 95 % (clorhidrato de clonidina) y de 91 % (flurbiprofeno).

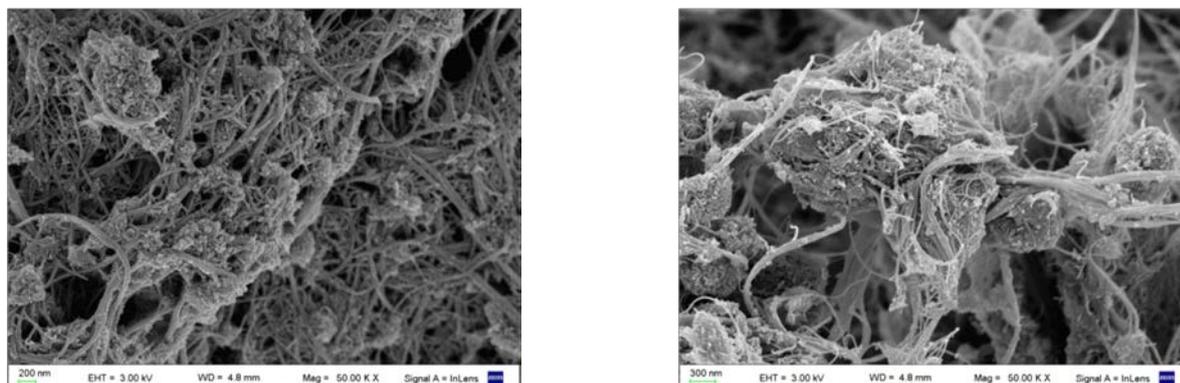


Fig. 1. Imágenes SEM de films cargados con clorhidrato de clonidina (a) y flurbiprofeno (b)

En las Figs. 2a y 2b se presentan los perfiles de liberación para los films cargados con ambas drogas modelo. De la comparación de estas figuras, pueden observarse diferencias entre los perfiles pasivos de las dos drogas, presentando el flurbiprofeno valores más bajos de liberación, respecto a la clonidina, a las 8 horas de ensayo. Estas diferencias pueden atribuirse a las interacciones NTCs-droga, tales como las de apilamiento π - π , dependientes de la estructura de cada droga. La aplicación de potenciales eléctricos permitió modular la liberación en el sentido deseado, acelerándola o desacelerándola. Los perfiles de liberación se representaron en forma satisfactoria e inédita mediante un modelo de pseudo segundo orden bicompartimentado. La bondad del ajuste puede apreciarse en las Figs. 2a y 2b

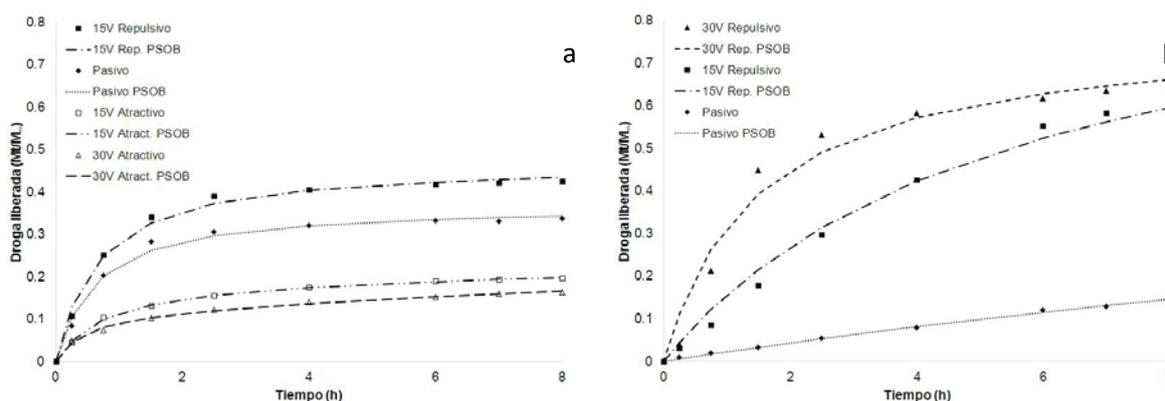


Fig. 2. Perfiles de liberación pasiva y electromodulada de clorhidrato de clonidina (a) y flurbiprofeno (b). Comparación entre los datos experimentales y las predicciones del modelo de pseudo segundo orden bicompartimentado (PSOB).

Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que los buckypapers basados en NTCs podrían emplearse como plataformas novedosas, para la administración de moléculas terapéuticas por vía transdérmica. La electromodulación posibilitaría el desarrollo de sistemas transdérmicos electrónicos integrados que liberen el principio activo en función de las necesidades terapéuticas del paciente.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo económico de UBA, CONICET y ANPCyT-FONCyT.

Referencias bibliográficas

- ¹ Degim, I.T., Burgess, D.J., Papadimitrakopoulos, F. (2010). *J. Microencapsul.* 27, 669–681.
- ² Ilbasmis Tamer, S., Degim, I.T. (2012). *Expert Opin. Drug Deliv.* 9, 991–999.

14 - EFECTO ANTITUMORAL DE NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIAPATITA EN CÉLULAS DE GLIOMA**R.M. Gorojod^{1*}, A. Alaimo¹, S. Porte Alcon¹, M.L. Dittler², C.L. Facal¹, M.C. Gonzalez², M.L. Kotler¹**

¹ Universidad de Buenos Aires. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Instituto de Química Biológica, Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química Biológica, Laboratorio de Disfunción Celular en Enfermedades Neurodegenerativas y Nanomedicina. Intendente Guiraldes 2160, Pabellón II, 4to piso, Ciudad Universitaria, CABA, Argentina ² Universidad Nacional de La Plata. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA). Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química, Laboratorio de Química y Fotoquímica de Nanobiomateriales. Diagonal 113 y 64, La Plata, Buenos Aires, Argentina.*correo electrónico: rgorojod@qb.fcen.uba.ar

La hidroxiapatita (HAp) $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ es un componente fundamental de la matriz ósea inorgánica y ha sido ampliamente empleada para reconstrucción ósea. Las nanopartículas de HAp (NHAp) presentan propiedades emergentes interesantes, y entre sus diversas ventajas, se ha propuesto que poseen un efecto antitumoral. En el presente trabajo evaluamos la citotoxicidad de las NHAp tanto en células normales como tumorales. Las células fueron expuestas a distintas concentraciones de nanopartículas (50-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 24-72h y se evaluó la viabilidad por el ensayo de MTT. Si bien la exposición a la NHAp generó baja o nula toxicidad en la mayor parte de los tipos celulares estudiados, en las células de C6 de glioma se observó un efecto citotóxico luego de 72hs de exposición (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$: $21 \pm 2\%$; 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$: $31 \pm 1\%$; 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$: $28 \pm 2\%$; 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$: $29 \pm 1\%$; $p < 0.001$). Este hallazgo resultó relevante sobre todo teniendo en cuenta las dificultades que presenta el tratamiento de tumores en el cerebro. Por este motivo, profundizamos en los mecanismos que subyacen al posible efecto antitumoral de la NHAp. La exposición a las nanopartículas indujo generación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Por tinción con LysoTracker Red DND-99, hallamos un incremento en el número y tamaño de los lisosomas.

A nivel nuclear, detectamos un aumento en la fosforilación de la histona 2AX (γ -H2AX), lo que indica la ocurrencia de daño al ADN. Por otra parte, no encontramos cambios en la morfología nuclear por marcación con el colorante fluorescente Hoechst 33258 ni en los niveles proteicos de PARP ni p53. La exposición a la NHAp disminuyó la capacidad proliferativa (ensayo clonogénico) y de migración celular (ensayo de la herida), ambos procesos relevantes para la progresión tumoral. La evidencia obtenida apoya la existencia de un efecto antitumoral de la NHAp en células de glioma. Estos datos, en conjunto con ensayos *in vivo*, permitirán determinar la factibilidad de emplear estas nanopartículas con fines terapéuticos.

15 - NANO-SUSPENSIONES DE ALBENDAZOL PARA EL TRATAMIENTO DE HELMINTIASIS

J. Priotti, D. Leonardi, M. C. Lamas

Instituto de Química Rosario (IQUIR-CONICET), Suipacha 570, Rosario, Argentina *correo electrónico: priotti@iquir-conicet.gov.ar

Palabras claves: Albendazol, nano-suspensiones, solubilidad, disolución.

Introducción

El albendazol (ABZ) es un fármaco empleado en el tratamiento de helmintiasis en animales y humanos. A pesar de su efectividad y amplio espectro, su absorción en el tracto gastrointestinal es limitada debido a su baja solubilidad y velocidad de disolución. Las nano-suspensiones se han convertido en una estrategia útil para mejorar la biodisponibilidad de fármacos poco solubles. Consisten en partículas de fármaco submicrométricas estabilizadas en un medio, generalmente acuoso. Presentan ventajas tales como facilidad de manufactura y escalado, reproducibilidad entre lotes y versatilidad. El producto final puede estar como suspensión o en forma sólida. Pueden ser producidas por técnicas de precipitación anti-solvente (*bottom-up*) o por reducción del tamaño de partícula (*top-down*). En las primeras, una solución del fármaco en solvente orgánico soluble en agua se agrega sobre una solución acuosa conteniendo estabilizantes (polímeros y/o surfactantes). Luego del paso de precipitación se suele recurrir al secado por aspersion o liofilización y al empleo de agentes redispersantes para prevenir la aglomeración de las partículas durante el proceso. El objetivo de este trabajo fue obtener y caracterizar una nanosuspensión de ABZ para el tratamiento de las helmintiasis.

Materiales y Métodos

El ABZ se solubilizó en ácido acético glacial y se añadió sobre soluciones acuosas con estabilizantes. Las nano-formulaciones se prepararon variando las siguientes condiciones de trabajo: tipo y concentración de estabilizante, concentración de ABZ, velocidad de agitación, proporción solvente/anti-solvente, tipo de inyección (rápida/por goteo), descartando aquellas en donde se obtenían nano-suspensiones inestables. Una vez encontradas las condiciones óptimas, se procedió al secado de las nano-suspensiones por dos métodos, liofilización o secado por aspersion, se compararon los productos resultantes en base al aspecto del sólido obtenido, el título y la solubilidad aparente. Se hicieron ensayos de velocidad de disolución en HCl 0,1 N, se determinó el tamaño y el potencial zeta de la nano-suspensión obtenida y se obtuvieron imágenes en microscopio electrónico de barrido de las partículas secadas por aspersion.

Resultados

Los factores determinantes para la obtención de nano-suspensiones estables fueron la concentración de ABZ y el tipo y concentración de estabilizante. El polisorbato 80 estabilizó las nano-suspensiones entre 0,5-1,5% v/v, cuando la concentración de ABZ fue de 40-100 mg/mL y la proporción de solución de ABZ/solución de estabilizante 1/5-1/20. La inyección continua de solución de ABZ sobre la solución de estabilizante permitió la obtención de nano-suspensiones de menor tamaño que las obtenidas mediante goteo. La velocidad de agitación no influyó en el producto. Se seleccionó entonces aquella nano-suspensión estabilizada con la menor concentración de polisorbato, la mayor concentración de ABZ, el menor volumen de solución de estabilizante y secada por aspersion, dado que la solubilidad fue mayor en las muestras secadas por aspersion que en las muestras liofilizadas. El rendimiento fue de 71,4%, la solubilidad aparente en HCl 0,1 N fue 76 veces mayor que el ABZ puro y la disolución del ABZ en las nanopartículas fue completa e inmediata. El tamaño obtenido de la nano-suspensión fue de 321 nm. El potencial zeta de la nano-suspensión fue de 15,63 mV y luego del secado de -23,6 mV. En las imágenes de microscopía electrónica de barrido se observó morfología irregular de las partículas con tendencia esférica.

Conclusión

La nano-suspensión de ABZ obtenida a partir de la estabilización con polisorbato 80, presentó propiedades farmacéuticas prometedoras para ser destinada al tratamiento de las helmintiasis.

16 - LA ERITROPOYETINA MODULA LA RESPUESTA CARDIOVASCULAR ANTE UN ESTADO HIPOVOLÉMICO AGUDO SEGÚN AVANZA LA EDAD

Pérez Niveyro J¹, Marasco F¹, Silva J, Ogonowski N¹, Donato M², Zotta E³, Fellet A¹, Arreche N¹, Puchulu MB¹, Balaszczuk AM¹

1Catedra de Fisiología, IQUIMEFA, 2Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, 3Instituto de Fisiología y Biofísica, IFIBIO, Universidad de Buenos Aires-CONICET Junín 956, 7º piso, CABA *correo electrónico: bernarditapuchulu@conicet.gov.ar

Introducción: Los adultos mayores constituyen una población de alto riesgo cardiovascular por pérdidas sanguíneas derivadas de una cirugía mayor. Se ha demostrado los efectos protectores en diferentes tejidos de la eritropoyetina (EPO) a través de su unión con el receptor EPOR, presente en el miocardio. Sin embargo, es controversial el efecto cardioprotector de la EPO en la regulación de la hemodinamia cardiovascular ante una hemorragia aguda durante el avance de la edad.

Objetivo: estudiar el efecto del tratamiento con EPO sobre la función cardiovascular y el daño oxidativo luego de una hemorragia aguda durante el avance de la edad. Se utilizaron ratas machos de 2 (joven: J) y 12 (adulto: A) meses de edad y se dividieron en: S: sham-tratamiento PBS (1ml/kg); EPO: sham-EPO (1000 UI/kg) i.p (3 días consecutivos); H: hemorragia (20% volemia)-tratamiento PBS; EPO+H: hemorragia-tratamiento EPO. Se evaluaron: Presión Arterial Media (PAM, mmHg), Frecuencia Cardiaca (FC, lpm) durante 120 min, hematocrito, EPO sérica, parámetros ecocardiográficos, inmunohistoquímica del receptor de EPO (EPOR) y TBARS en ventrículo izquierdo (VI).

Resultados: EPO sérica (mIU/ml) fue mayor en los tratados con EPO que PBS (J: 224±8,1*; A: 228±9,3* vs J y A: <1±0,1, *P<0.01, P=ns J vs A). Los animales de los diferentes grupos experimentales presentaron similares condiciones hemodinámicas antes de inducir el estado hipovolémico agudo dado que no se observaron diferencias en los valores basales del hematocrito, PAM y FC. El tratamiento con EPO logró estabilizar la PAM (J: 77±3*; A: 86±3*, *P<0.001 vs grupo H, P=ns vs valores basales), disminuyendo el cronotropismo en J y A a los 120 min del periodo experimental. Luego de realizado el sangrado, el tiempo de la recuperación de la FC fue menor en ratas A que J. Los animales A tratados con EPO mostraron una mayor fracción de acortamiento (FA) de A: (EPO+H: 48±2*; H: 40±1, *P<0.01). La tinción inmunohistoquímica de EPOR fue más intensa en cardiomiocitos y endotelio de A tratados con EPO. En ambos grupos etarios, los niveles de TBARS fueron menores en EPO+H que grupo H (J: 1,7±2*; 2,1±1; A: 1,9±2*; 2,7±1; nmol/mg, *P<0.01, respectivamente). **Conclusión:** la terapia con EPO compensaría las alteraciones hemodinámicas y el daño de la función cardiaca asociadas al avance de la edad acompañándose de la presencia funcional del EPOR en el miocardio ante la pérdida aguda de sangre.

17 –DESARROLLO DE PELETS DE PECTINA/GELATINA PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE VIOLACEÍNA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE COLON

Ignacio Rivero Berti^{1*}, Boris Rodenak-Kladniew², Lucie Marquet^{1,3}, Nelson Duran⁴ Guillermo R. Castro¹

¹ Laboratorio de Nanobiomateriales, CINDEFI (CONICET, CCT La Plata), Depto. De Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 50 # 227, La Plata 1900, Argentina. ² INIBIOLP, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 60 y 120 s/n La Plata 1900, Argentina. ³ *Universite d'Angers*, 40 rue de Rennes, BP 75352, 49035 Angers cedex 01, Francia. ⁴ Instituto de Química, Universidad de Campinas, Campinas, Brasil. *Expositor: Lic. Ignacio Rivero Berti. *correo electrónico: iriveroberti@gmail.com

La violaceína (Viol) es un pigmento indocarbazólico producido por bacterias (*i.e. Chromobacterium violaceum*). Esta familia de pigmentos ha demostrado un extenso abanico de actividades biológicas, a saber; antimicrobiano contra bacterias Gram- positivas y en menor medida contra Gram-negativas, antimicobacteriano, tripanosida, antiulcerosa y antidiarreica, analgésica, inmunomoduladora y antipirética, y antiviral. No obstante, son sus propiedades tumoricida, citotóxica, inductora de la apoptosis y antioxidante, las que hacen de este pigmento prometedor en el área de terapia oncológica. Así, las propiedades citotóxicas de Viol se han estudiado en un panel de líneas celulares; al menos tres de ellas de carcinoma colorrectal (CCR) y más importante, *in vivo*, en ratones, confirmando estas propiedades. Sin embargo, uno de los mayores problemas que presenta la Viol para su administración es su baja solubilidad en medios acuosos, lo que además limita su biodisponibilidad y redundando probablemente en procesos de toxicidad celular y tisular debido a fenómenos de agregación molecular.

La pectina, un biopolímero vegetal derivado del ácido galacturónico, por su lado ha sido investigada como un posible vehículo para administración de fármacos específica de colon en varias oportunidades. El razonamiento detrás de esta posible aplicación es respaldada en parte por varias de las propiedades del polímero, como su biocompatibilidad, biodegradabilidad y capacidad de formar geles. Pero, por otro lado, la pectina es insoluble en medios ácidos como los del estómago y duodeno y no es degradada por las enzimas allí presentes (protegiendo el fármaco encapsulado en ella); mientras que el pH levemente básico y las enzimas pectinolíticas de los microorganismos de la biota promueven la liberación del fármaco en el medio colónico.

A causa de la baja solubilidad de la Viol en medios acuosos, esta fue primero emulsionada en una solución al 1% (m/V) de Tween20. Para esto una cantidad pesada de Viol fue mezclada con la solución de Tween y sonicada con un sonicador de punta durante 10 min en baño de hielo (60% de potencia).

La emulsión (ViolTW) fue caracterizada espectrofotométricamente por su absorbancia al visible y sus propiedades fluorescentes. Observándose espectros similares a los obtenidos en solventes hidrófobos. ViolTW se dejó reposar 24hs, 48hs y 72hs de manera de evaluar su estabilidad. ViolTW fue observada al microscopio electrónico de transmisión observando estructuras regulares de menos de 100 nm.

ViolTW fue mezclada con pectina y gelatina de manera de producir coacervados conteniendo 4,0% (m/V) de pectina y 1,0% o 2,0% de gelatina (P4G1 y P4G2 respectivamente). El gel formado por esta mezcla fue luego goteado en una solución de 500 mM CaCl₂ y 1,0 % (V/V) glutaraldehído, con el objeto de lograr una gelificación ionotrópica. Los microesferoides resultantes se secaron a 50°C por 24h.

La eficiencia de encapsulación (EE%) de las matrices fue evaluada según la ecuación siguiente:

$$EE\% = \frac{m_{viol} - [Viol] \times V}{m_{viol}} \times 100\%$$

Donde m_{viol} inicial de violaceína en la matriz $[Viol]$ es la concentración de violaceína en la solución de gelificación y V el volumen de la misma solución. Las EE% fue del 96,1% para P4G2 y del 95.9% para P4G1. El tamaño de los microesferoides fue determinado con asistencia del software ImageJ, el cual permitió establecer un diámetro promedio de $0.80 \pm 0.15 \mu\text{m}$ y sin diferencias significativas entre las formulaciones. La porosidad de la superficie de los esferoides fue evaluada a partir de microfotografías obtenidas con un microscopio electrónico de barrido y la asistencia del software ImageJ.

La liberación de Viol fue ensayada en un disolutor de paletas. La liberación se realizó por triplicado en un medio Clark & Lubs (KCl/HCl, pH 1.2) con el objetivo de simular el paso por el medio gástrico, luego de dos horas los esferoides fueron lavados y llevado a medio intestinal simulado sin pancreatina según esta detallado en la Farmacopea Nacional Argentina, adicionado con 1,0% (m/V) Tween 20, el pH inicial en este medio fue ajustado a 6.8 y a las dos horas (cuatro horas desde el inicio del ensayo) fue aumentado a pH 7.4 mediante el agregado de NaOH. Se extrajo un mililitro de muestra a cada hora desde el inicio del ensayo y la concentración de Viol fue determinada mediante absorbancia a 580 nm. Las curvas de liberación fueron significativamente diferentes, P4G1 liberó el 77,7% de su carga a las 10h mientras que P4G2 liberó solo el 56,3% al mismo tiempo. La masa de Viol liberada durante las primeras dos horas a pH ácido (pH 1,2) fue en ambos casos menor al 3,0%.

Diferentes concentraciones de Viol, ViolTW y la emulsión con el agregado de pectina-gelatina (P4G) fueron evaluados por su citotoxicidad *in vitro* frente a células HCT-116 (línea celular de cáncer colorrectal humano) a 24h y 48h mediante MMT. ViolTW mostró ser más citotóxica a menores concentraciones (menores a $1,0 \mu\text{M}$) y menos citotóxicas a mayores concentraciones (mayores a $3,0 \mu\text{M}$) que las mismas concentraciones de Viol dispersada con DMSO.

En resumen, se logró obtener una formulación capaz de vehiculizar la droga altamente hidrófoba, violaceína, en entorno acuoso. Esta formulación probó ser más eficiente en bajas concentraciones frente a cultivos celulares de cáncer colorrectal. La formulación fue exitosamente asociada a una matriz para la liberación colónica por vía oral.

18 - DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN, CINÉTICA DE LIBERACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD IN VIVO DE NANOPARTÍCULAS SÓLIDAS LIPÍDICAS CONTENIENDO CARBAMAZEPINA COMO POSIBLES NANOSISTEMAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA EPILEPSIA REFRACTARIA

Sebastián Scioli Montoto^{1,3}, German A. Islan², María E. Ruiz^{1,3}, Mauricio Di Ianni³, Manuel Couyoupetrou⁴,
María L. Sbaraglini³, Guido O. Pesce⁴, Alan Talevi³, Luis Bruno-Blanch³, Guillermo R. Castro²

¹ Control de Calidad de Medicamentos, 47 y 115, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina ² Laboratorio de Nanobiomateriales, CINDEFI, 47 y 115, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP-CONICET, La Plata, Buenos Aires, Argentina ³ Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Bioactivos, 47 y 115, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina ⁴ Instituto Nacional de Medicamentos, Caseros 2161, CABA, Buenos Aires, Argentina * Expositor: Farm. Sebastián Scioli Montoto. *correo electrónico: sebascioli@gmail.com

La epilepsia es el trastorno neurológico crónico grave más común, el cual afecta a más de 50 millones de personas en todo el mundo. Se caracteriza por convulsiones recurrentes tanto focales como generalizadas, y aunque se han desarrollado más de diez nuevos fármacos antiepilépticos (FAEs) en los últimos años, alrededor de un tercio de los pacientes sigue siendo resistente a la terapia con FAEs. Adicionalmente, debido a las restricciones que encuentran estos fármacos para el ingreso al sistema nervioso central (SNC) impuestas por la barrera hematoencefálica (BHE), se requieren elevadas dosis de FAEs para lograr niveles efectivos en el SNC, lo que aumenta el riesgo de sufrir severos efectos adversos.

Si bien se trata de un problema multifactorial, una de las hipótesis que se ha planteado para explicar la resistencia a los tratamientos tradicionales establece que se trataría de un problema farmacocinético, donde la sobreexpresión de transportadores de eflujo (tales como Pgp) a nivel de la BHE y el foco epileptogénico, atentaría contra la biodisponibilidad de los FAEs.

Una de las posibles estrategias para enfrentar este problema consiste en “ocultar” al fármaco de los mecanismos de aclaramiento, permitiendo una mayor llegada del mismo al blanco molecular. En este sentido, las nanopartículas sólidas lipídicas (NSL), resultan especialmente prometedoras ya que poseen una gran capacidad de permeación a través de la BHE, pero asociadas a una menor toxicidad intrínseca que su contraparte polimérica.

El objetivo de este trabajo fue encapsular el FAE Carbamazepina (CBZ) en nanopartículas lipídicas (NSL y transportadores lipídicos nanoestructurados, TLN), biodegradables y no tóxicas, para obtener sistemas de liberación controlada, capaces de mejorar la distribución y aumentar la exposición cerebral del fármaco.

Se diseñaron y sintetizaron cuatro formulaciones diferentes conteniendo CBZ (incorporada en estado sólido o previamente disuelta en DMSO). La síntesis de las mismas se realizó mediante la técnica de emulsificación por ultrasonificación. Brevemente, el lípido se coloca en un baño de agua calentado a una temperatura 10°C por encima de su punto de fusión, y una vez fundido se incorpora la droga. A continuación, dicha fase lipídica se mezcla con una solución acuosa y termostatazada de un tensioactivo (3% de Kolliphor® P188) e inmediatamente se aplica ultrasonido mediante un sonicador de punta. Finalizado el procedimiento, se enfría la nanoemulsión resultante a temperatura ambiente para obtener una suspensión de nanopartículas lipídicas.

Cada una de las formulaciones fue caracterizada en cuanto a su eficiencia de encapsulación (%EE) a través de un método por HPLC previamente validado; tamaño de partícula (TP), índice de polidispersión (PI), potencial Z (ζ) por espectroscopía de correlación de fotones (PCS), microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía de transmisión electrónica (TEM); las propiedades térmicas a través de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y termogravimetría (TG); y análisis estructural por difracción de rayos X (XRD). La estabilidad de las cuatro formulaciones, en términos de su %EE, TP, PI y ζ , se determinó durante 2 meses a una temperatura entre 2-8°C.

Se evaluó la cinética de liberación *in vitro* de CBZ en buffer fosfato a pH 6.8, durante 24 hs. A continuación, y con el fin de evaluar la capacidad de permeación de las partículas a través de una monocapa de células, se realizó un ensayo sobre células transfectadas MDCK MDR-1, las cuales sobre-expresan Pgp. Por último, se realizaron ensayos farmacológicos *in vivo* en ratones utilizando un modelo agudo de epilepsia (ensayo MES, *maximal electroshock seizure*) para evaluar la actividad anticonvulsivante de la CBZ incorporada en las nanopartículas lipídicas.

Todas las formulaciones mostraron elevadas %EE (89 – 96%) y forma esférica, con un tamaño de partícula medio de 163 nm y una baja polidispersión. Los perfiles de liberación *in vitro* mostraron una liberación sostenida durante 24 hs. Los ensayos por DSC, TG y XRD evidenciaron que la CBZ se encontraba incorporada en estado amorfo o molecularmente dispersa dentro de la matriz lipídica. Los ensayos de permeabilidad en células mostraron diferencias significativas favorables en algunas formulaciones respecto a la droga libre. Finalmente, se obtuvieron resultados muy promisorios en ensayos *in vivo*, donde se observó una evidente protección frente a las convulsiones por hasta 4 hs post-dosis para el sistema de nanopartículas.

En conclusión, se desarrollaron nanopartículas lipídicas conteniendo CBZ con características óptimas de tamaño, forma y permeabilidad, capaces de liberar la droga de manera sostenida, y con actividad antiepiléptica más prolongada respecto a una solución de la droga libre. Dicho desarrollo abre las puertas a nuevas alternativas para afrontar las limitaciones actuales de los FAEs en el tratamiento de la epilepsia refractaria.

19 - DESARROLLO DE UN AGENTE DE TRANSFECCIÓN BASADO EN DMRIE

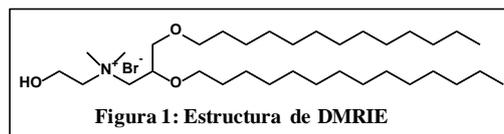
E. Elhalem¹, J. Morrone², S. Reidel³, M. Ciarlantini¹, R. P. Gauna², V. Zannoni², L. Gandolfi Donadio¹, L. Pozo⁴, V. Cesa⁵, L. Matos³, M. Blasco³, M.V. Defain Tesoriero², M.J. Comin¹

Programa de Fortalecimiento de la Cadena de Valor de la Industria Farmacéutica y Farmoquímica

(1) Laboratorio de Síntesis Orgánica-INTI Química, (2) Laboratorio de Sistemas de Liberación Controlada-INTI Química, (3) INTI-Biotecnología, (4) INTI-Gerencia de Desarrollo, (5) INTI-Economía Industrial *correo electrónico: eelhalem@inti.gov.ar

Introducción

DMRIE (bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio), es un lípido catiónico utilizado en formulaciones liposomales para la transfección de ácidos nucleicos (ADN, ARN) en células eucariotas. Es comercializado por un único proveedor para aplicaciones de I+D como agente



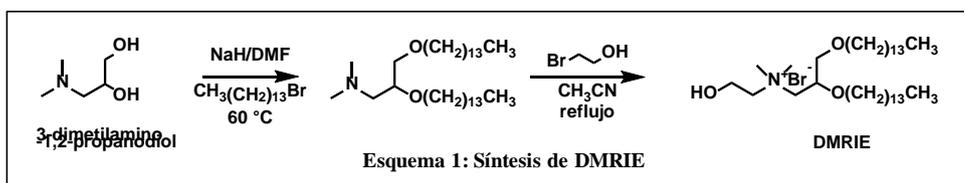
de transfección en células animales, como una suspensión acuosa de concentración no informada de una mezcla de DMRIE con colesterol bajo el nombre comercial DMRIE-C. Sirve tanto para aplicaciones *in vitro* como para terapia génica. Con el advenimiento de nuevas tecnologías de edición génica, se posiciona como un reactivo de alto potencial comercial, por lo que resulta de gran interés su desarrollo.

Objetivo: Desarrollar un reactivo de transfección basado en DMRIE como producto comercial para la sustitución de importaciones.

Descripción

Síntesis de DMRIE

Se preparó DMRIE en dos pasos de reacción empleando materiales de partida y reactivos comercialmente asequibles (Kasireddy *et al*, 2004; Arpicco *et al*, 2004). Ambos pasos fueron optimizados variando la temperatura, el tiempo, el solvente, los equivalentes de cada reactivo y el orden de agregado. Se llevó a cabo la síntesis en escala multigramo (potencialmente escalable) con un rendimiento global del 30%. El producto se caracterizó por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masa.



Preparación de liposomas catiónicos. Caracterización fisicoquímica y morfológica

Los liposomas fueron preparados de acuerdo al método de hidratación de la película delgada empleando una mezcla de DMRIE y colesterol en un rango de concentración de 5-40 mM. El diámetro medio de partícula (Z-Ave) e índice de polidispersidad (Pdl) de las suspensiones se determinaron por dispersión dinámica de luz, mientras que el potencial zeta (Pot Z) se determinó por análisis en fase de *scattering* de luz, utilizando un Zetasizer Nano ZS (Malvern®, Reino Unido) a 25°C en agua deionizada. El Z-Ave, fue menor a 150 nm, y el Pdl resultó menor a 0,1. El Pot Z fue mayor a +30 mV, valor que se correlaciona con la estabilidad física en fase acuosa (Figura 2A). La morfología y homogeneidad de los liposomas catiónicos se estudió por microscopía de doble haz FIB/SEM (Figura 2B).

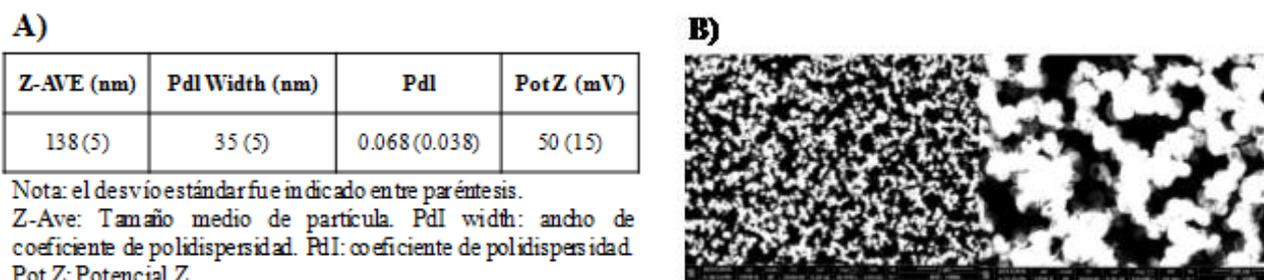


Figura 2: A) Caracterización fisicoquímica de liposomas catiónicos B) Imagen de microscopía de doble haz FIB/SEM de liposomas catiónicos con una magnificación de 37.000 (Izq.) y 150.000 (Der.).

Preparación y evaluación *in vitro* de Lipoplexes (complejos liposomas-ADN)

La preparación de lipoplexes se llevó a cabo utilizando combinaciones de liposoma:ADN correspondientes a un experimento factorial completo cuyos factores fueron volumen de liposomas (6 o 12 μ L), masa de ADN (0,4 o 0,6 μ g) y tamaño de liposomas (100 o 400 nm). La citotoxicidad se evaluó de manera cualitativa utilizando una tabla propuesta por la norma ISO 10993-5:2009 que relaciona características citopáticas y citotóxicas observadas al microscopio óptico con grados de reactividad. La evaluación del efecto citopático indicó que el factor “tamaño de liposomas” fue el que presentó el mayor efecto (90%). Por otro lado, la transfección de las células CHO fue realizada con el plásmido pEGFP C1 (Clontech) y analizada mediante microscopía de fluorescencia luego de 24 hs. de cultivo (Bing HU *et al*, 2012). Si bien la transfección resultó positiva para GFP en todas las condiciones evaluadas, la eficiencia de transfección aparente fue baja (Figura 3).

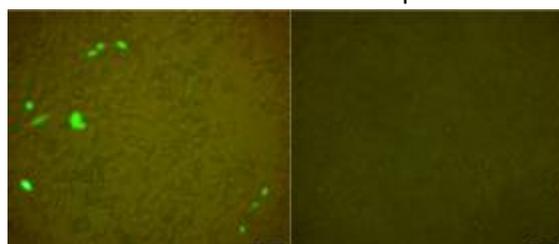


Figura 3: Izquierda. Campo claro + fluorescencia de DA-0,6-12-100. Derecha. Campo claro + fluorescencia del control negativo (ADN (-) Liposoma 0,168 mM (+))

Conclusiones

El desarrollo de un método de síntesis eficiente y robusto nos permitió obtener DMRIE con buenos rendimientos. A partir de mezclas DMRIE:colesterol se prepararon liposomas catiónicos que se caracterizaron fisicoquímica y morfológicamente. Estos liposomas se emplearon para preparar lipoplexes y se realizó su evaluación mediante ensayos de citotoxicidad y eficiencia de transfección. Los lipoplexes resultaron efectivos en la transfección de células CHO mediante un protocolo canónico de transfección.

La proyección de este desarrollo es aplicar un diseño experimental para optimizar la combinación de características físicas y condiciones de transfección para maximizar la eficiencia de transfección. Se propone evaluar las variables críticas del proceso de síntesis de DMRIE y preparación de liposomas catiónicos para poder realizar el cambio de escala

Teniendo en cuenta la capacidad demostrada de este reactivo tanto para la transfección de células en suspensión *in vitro* como para terapia génica, se estima que su disponibilidad y producción local podrán resultar de utilidad para impulsar el desarrollo de metodologías innovadoras orientadas a terapia génica libre de agentes con potencial infeccioso (Branski *et al*, 2010).

Bibliografía

- Arpicco S. *et al*. (2004). Synthesis, characterization and transfection activity of new saturated and unsaturated cationic lipids. *IL FARMACO*,59, 869-878.
- Bing HU *et al*. (2012).The improvement of liposome-mediated transfection of pEGFP DNA into human prostate cancer cells by combining low-frequency and low-energy ultrasound with microbubbles. *Oncology Reports*, 27, 475-480.
- Branski LK *et al*. (2010). Pre-clinical evaluation of liposomal gene transfer to improve dermal and epidermal regeneration. *Gene Therapy*, 17, 770–778.
- Kasireddy K. *et al*. (2004). Synthesis of novel cationic cardiolipin analogues for the optimal delivery of therapeutic agents. *Tetrahedron Letters*, 45, 2743-2746.

20 - MICELAS POLIMÉRICAS CARGADAS CON VERDE DE INDOCIANINA COMO POTENCIALES AGENTES TERAGNÓSTICOS

N. Lecot^a, M. Fernández Lomonaco^a, P. Cabral^a y R.J. Glisoni^{b*}

^aLaboratorio Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay. ^bInstituto NANOBIOTEC UBA-CONICET, Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Junín 956, CABA, Buenos Aires, Argentina. *correo electrónico: romy.glisoni@gmail.com

La combinación de agentes terapéuticos y diagnósticos en un solo sistema da origen a un concepto emergente llamado *teragnosis* [1,2]. Un sistema teragnóstico dirigible supondría un gran avance en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades como el cáncer y sería capaz de tratar la enfermedad al mismo tiempo que podría utilizarse como agente de diagnóstico de la misma [1,2]. La principal característica que deben cumplir estos novedosos sistemas teragnósticos es su capacidad de dirigirse y acumularse preferentemente en la diana que se espera realicen su función y así, evitar un diagnóstico errado, como daños a tejidos sanos por un tratamiento poco específico [1,2].

Las micelas poliméricas (PMs) a base de poli(óxido de etileno)-*b*-poli(óxido de propileno) (PEO-PPO) ofrecen varias ventajas debido a sus propiedades únicas, incluyendo: (i) una buena estabilidad en agua por encima de su concentración micelar crítica (CMC), (ii) cargas elevadas de moléculas activas en el núcleo, (iii) la capacidad de modificar su superficie con una importante diversidad de ligandos y, (iv) tamaños nanométricos (15-50 nm) que son adecuados para aprovechar el efecto de permeabilidad y retención mejorada (EPR) para el diagnóstico y tratamiento del cáncer [3,4]. EPR es el único fenómeno que capitaliza las características propias de los tumores sólidos, a destacar: una extensa angiogénesis, generación de fenestraciones de 300-400 nm de diámetro debido a defectos en la arquitectura vascular del tumor, escaso aclaramiento linfático y lento retorno venoso, entre otras [5]. Además del efecto EPR y el direccionamiento pasivo, el núcleo/corona de PEO-PPO PMs proporcionaría una semivida más larga en circulación [5]. Las PMs, podrían sumar la capacidad de realizar direccionamiento o *targeting* activo con especificidad hacia células cancerosas mediante la incorporación de moléculas guía. Un gran número de células tumorales sobreexpresan receptores de moléculas específicas [6,7]. Es así que, los ligandos del tipo azúcar (manosa, galactosa, glucosa y otros) tienen la capacidad de ser direccionados selectivamente a receptores del tipo lectinas (LLRs), que son sobreexpresados en macrófagos, células dendríticas, hepatocitos, endotelio linfático, entre otros tipos celulares [6,7]. Las razones por las que se ha utilizado glucosa (-Glu) como molécula ligando en este estudio, ha sido la relativa facilidad con la que se ha podido conjugar a copolímeros sintéticos preformados, y por otro lado, porque la glucosilación no sólo estabilizaría el sistema coloidal debido a formación de múltiples enlaces de hidrógeno en la corona micelar, sino que también favorecería la internalización mediada por receptor a la célula diana y la potencial acumulación en el tumor debido a una mayor captación celular a expensas del aumento exacerbado del metabolismo de dicho azúcar en las células tumorales [6,7].

En este contexto, es que resultó de nuestro interés explorar el diseño y desarrollo de una nueva nanoformulación micelar que incorpore eficientemente, en esta primera etapa de estudio, un agente de contraste con propiedades fisicoquímicas mejoradas tales como: (i) una fluorescencia óptima, (ii) una mejor estabilidad en medio acuoso y (iii) una semivida más larga en circulación, utilizando PMs a base de PEO-PPO (F127, $M_w \sim 12.6$ KDa y T1307 $M_w \sim 18$ KDa) y sus novedosos derivados glucosilados con potencial para realizar direccionamiento activo (F127-Glu, $M_w \sim 13$ KDa y T1307-Glu, $M_w \sim 19$ KDa). Verde de Indocianina (ICG) es un colorante infrarrojo cercano (NIR), aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EEUU (FDA), que se utiliza como agente de contraste para el diagnóstico médico [8]. Sin embargo, sufre de algunas desventajas que limitan su uso en aplicaciones clínicas, a mencionar: autoagregación en medio acuoso con la consiguiente pérdida de la fluorescencia, orientación pobre y una vida media corta *in vivo* debido a la rápida absorción en el hígado [8]. Para superar dichos obstáculos, hemos utilizado en este trabajo, los copolímeros de bloques anfifílicos a base de poli(óxido de etileno)-*b*-poli(óxido de propileno) (PEO-PPO) para cargar ICG.

Si bien, esta estrategia se ha investigado con propósitos de estudiar la capacidad de direccionamiento pasivo y activo en una primera instancia, similares enfoques podrían ser explorados para la administración de diversas moléculas antitumorales en el futuro.

Las PMs a base de poloxaminas T1307 y T1307-Glu (10% p/v) proporcionaron una eficiencia de encapsulación completa (EE = 100%) de ICG en solución acuosa (375µg/mL) mientras que ésta se redujo a un 10 y un 55% para F127 y F127-Glu, respectivamente. Las PMs cargadas con ICG fueron caracterizadas completamente por dispersión dinámica de la luz (DLS) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). Se observaron tamaños de partícula con dos poblaciones marcadas entre 24-27 nm y 6-7 nm, para F127 y F127-Glu, mientras que se observó una única población de 16-21 nm para T1307 y T1307-Glu (PDI < 0,5), con potenciales Zeta (pot-Z) promedio de -6 ± 1 mV, a 37°C. Asimismo, las PMs cargadas con ICG, congeladas/liofilizadas y resuspendidas en agua ultrapura, resultaron estables en cuanto a su tamaño de partícula y pot-Z estudiados. Por último, los estudios *in vivo* utilizando un equipo FX-MX-Pro camera (Bruker), revelaron un tiempo de circulación mejorado y un buen rendimiento de los novedosos agentes de imágenes en ratones BALB/c portadores de tumores de mama inducidos con células 4T1 (modelo de tumor de mama murino similar estadio IV humano), más específicamente para los derivados de poloxamina glucosilados. Los resultados preliminares indican que PMs a base de PEO-PPO y cargadas con ICG podrían servir como potenciales candidatos de contraste no invasivo (NIR) para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ryu JH, et al. Tumor-targeting multifunctional nanoparticles for theragnosis: New paradigm for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012; 64, 1447-1458.
- [2] Fan Z, et al. Theranostic nanomedicine for cancer detection and treatment. *Journal of Food and Drug Analysis* 2014; 22, 3-17.
- [3] Glisoni RJ, et al. Encapsulation of the antimicrobial and immunomodulator agent nitazoxanide within polymeric micelles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2014; 14, 4670-4682.
- [4] Sosnik A, et al. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007; 66, 303-317.
- [5] Torchilin V, et al. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2011; 63,131-135.
- [6] Glisoni RJ, et al. Novel Poly(Ethylene Oxide)-*b*-Poly(Propylene Oxide) Copolymer-Glucose Conjugate by the Microwave-Assisted Ring Opening of a Sugar Lactone. *Macromolecular Bioscience* 2014; 14, 1639-1651.
- [7] Carvalho KC, et al. GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. *Clinics* 2011; 66, 965-972.
- [8] Schaafsma BE, et al. The Clinical Use of Indocyanine Green as a Near-Infrared Fluorescent Contrast Agent for Image-Guided Oncologic Surgery. *Journal of Surgical Oncology* 2011; 104, 323-332.

21–AUMENTO DE LA ESTABILIDAD DE EMULSIONES ACEITE EN AGUA POR INCORPORACIÓN DE NANOCRISTALES DE CELULOSA

L. Di Giorgio; P. R. Salgado; A. N. Mauri

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA, CONICET-CIC-UNLP). Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina. *correo electrónico: anmauri@quimica.unlp.edu.ar

En los últimos años, ha crecido el interés en la obtención de nanopartículas a partir de polisacáridos tales como celulosa, almidón y quitosano, teniendo en cuenta que son compuestos biodegradables, de fácil obtención, bajo costo y no tóxicos. Estas nanopartículas se han utilizado principalmente como refuerzos de películas y recubrimientos poliméricos, logrando mejor sus propiedades mecánicas y/o barrera. Pero recientemente se ha comenzado a estudiar su incorporación en emulsiones ya que su posible actividad surfactante podría mejorar la estabilidad de estos sistemas por efecto *Pickering*.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del agregado de nanocrisales de celulosa (NCC) sobre la capacidad de las proteínas de soja de formar y estabilizar emulsiones aceite en agua (O/W). Los NCC se obtuvieron por hidrólisis ácida de celulosa microcristalina durante 120 minutos a 45°C. La suspensión resultante se lavó hasta neutralidad con sucesivas centrifugaciones, se dializó en agua, se sonicó y se almacenó hasta su utilización. Se obtuvieron nanocrisales de 0,5-3 nm de diámetro y 250-550 nm de largo (según su análisis por dispersión de luz dinámica y microscopía de fuerza atómica); y con un índice de cristalinidad de 96% (determinado por DRX). Estas nanopartículas se incorporaron en distintas proporciones (de 0 hasta 10%p/p) a dispersiones acuosas de aislado proteico de soja al 5%p/v, que fueron empleadas para formar emulsiones O/W empleando aceite de pescado como fase oleosa manteniendo una relación proteína:aceite 4:1 (p:p). Se realizó una pre-emulsión con Ultraturrax y luego se emulsificó por ultrasonido (350W por 5 min).

Las emulsiones O/W sin el agregado de nanopartículas presentaron distribución bimodal de tamaño de gotas, siendo la población de menor tamaño (10-100 nm) la más predominante. Al aumentar la concentración de nanopartículas, se observaron distribuciones multimodales con gotas de mayor tamaño. Al analizar el comportamiento reológico de las distintas formulaciones, se encontró que la emulsión preparada solo con proteínas presentó un comportamiento de flujo newtoniano, al igual que las que contenían bajas concentraciones de NCC, pero aquellas con contenidos de nanopartículas superiores al 6%, presentaron un comportamiento pseudoplástico, reflejado en la disminución del índice de flujo y el aumento del índice de consistencia. La estabilidad de las emulsiones, determinada por análisis de luz dispersa, aumentó significativamente con el agregado de NCC. Mientras que las emulsiones estabilizadas solo con proteínas comenzaron a desestabilizarse a partir de las 48 h, las que contenían bajas concentraciones de NCC (hasta 4%) recién mostraron signos de cremado al séptimo día, y las que contenían concentraciones de NCC superiores a ese valor se mantuvieron estables por más de 25 días.

Los sistemas emulsionados estudiados resultan promisorios para *carriers* componentes activos con características lipofílicas. En particular, las emulsiones O/W desarrolladas permitirían vehiculizar aceite de pescado en distintos alimentos, cuyo consumo es recomendado por la Organización Mundial de la Salud, y enmascarar sus características organolépticas.

Palabras clave: nanocrisales de celulosa, proteínas de soja, emulsiones O/W, aceite de pescado.

22 -DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y SU UTILIZACIÓN EN LA FORMACIÓN DE MATERIALES ANTIMICROBIANOS

Y. S. Musso; P. R. Salgado; A. N. Mauri

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, CONICET-CIC-UNLP), Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina. *correo electrónico: anmauri@quimica.unlp.edu.ar

Los envases con propiedades antimicrobianas pueden desempeñar un papel crucial en la mejora de la calidad de los alimentos, prolongando su vida útil y previniendo o retrasando su deterioro. La acción antimicrobiana en los envases puede alcanzarse con el agregado de aditivos activos de origen orgánico, como ácidos, enzimas, péptidos y polímeros, o inorgánicos como es el caso de las nanopartículas metálicas u óxidos metálicos. Las nanopartículas de plata (NPAg) han atraído mucha atención por su actividad contra una amplia gama de microorganismos patógenos, incluyendo bacterias, levaduras, hongos y virus, y por su estabilidad térmica.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar películas de gelatina con propiedades antimicrobianas debido a la incorporación de nanopartículas de plata sintetizadas *in situ* en la dispersión filmogénica o previamente usando citrato de sodio como agente reductor/estabilizante

Tanto el citrato como la gelatina lograron reducir los iones plata (AgNO_3) y formar nanopartículas de plata esféricas, con distintas distribuciones de tamaño y con una importante actividad antimicrobiana evaluada frente a *E. coli*. Estas nanopartículas, al estar presentes en la formulación de películas de gelatina, las activó con importantes propiedades antimicrobianas y lograron ejercer un efecto refuerzo sobre las propiedades mecánicas de los materiales resultantes.

Los nanocompuestos preparados agregando nanopartículas previamente formadas usando citrato de sodio como agente reductor/estabilizante fueron los que mostraron las mejores propiedades. El tamaño de las nanopartículas de plata pareciera ser más determinante en la actividad antimicrobiana que la concentración.

La gran actividad antimicrobiana observada en los materiales, nos induce a buscar la cantidad mínima de nanopartículas a incorporar, y confirmar esta actividad en sistemas alimenticios reales.

Palabras clave: gelatina, películas biodegradables, nanopartículas de plata, antimicrobianos, envases activos.

23 -LAS NANOFIBRAS DE CELULOSA MEJORAN LA LIBERACIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS DEL ACEITE ESENCIAL DE CLAVO INCORPORADO EN PELÍCULAS PROTEICAS DE SOJA

C.M. Ortiz ¹, P. R. Salgado ¹, A. Dufresne ², A. N. Mauri ^{1*}

¹: Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA, CONICET-CIC-UNLP), Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina. ²: Laboratoire de Génie des Procédés Papetiers (LGP2), UMR CNRS 5518, Grenoble INP-Pagora, Francia*correo electrónico:anmauri@quimica.unlp.edu.ar

Actualmente, una de las alternativas más efectivas para mejorar las propiedades mecánicas y barrera de los materiales en base a biopolímeros, así como también para los sintéticos, es el agregado de micro o nanorefuerzos a la formulación. Estos refuerzos también pueden afectar la liberación de los compuestos activos incorporados en los materiales. Entre los nanorefuerzos disponibles, existe un especial interés en aquellos de naturaleza biodegradable derivados de polisacáridos, como son las nanofibras de celulosa.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del agregado de nanofibras de celulosa sobre las propiedades fisicoquímicas, antioxidantes y antimicrobianas de películas proteicas de soja activadas con aceite esencial de clavo de olor (CEO).

Las películas se formaron por *casting* a partir de dispersiones acuosas conteniendo 5%p/v de aislado proteico de soja (SPI), 1,25%p/v de glicerol, cantidades variables de celulosa microfibrilada (0, 4, 8 y 12 g MFC/100 g SPI; obtenida por tratamiento mecánico a partir de fibras de formio (con $d \approx 50-60\text{nm}$, $L \approx 485\mu\text{m}$ y cristalinidad=34,5%), con o sin el agregado de 0,5 mL de CEO/100 mL.

Todas las dispersiones filmogénicas presentaron comportamiento de flujo pseudoplástico -que se acentuó con el agregado de MFC y CEO- y formaron películas homogéneas. El agregado de MFC provocó un fuerte efecto refuerzo en las películas, mejorando las propiedades mecánicas y de barrera pero sin modificar su apariencia, contenido de agua y Tg. El agregado de CEO a las películas proteicas y nanocompuestas les confirió importantes propiedades antioxidantes y antimicrobianas, plastificando las matrices proteicas y modificando de manera diferencial las propiedades barrera, dado que aumentó la permeabilidad al oxígeno y disminuyó la permeabilidad al vapor de agua. La presencia de nanofibras en la matriz proteica modificó la liberación de los compuestos activos del CEO. Al aumentar la concentración de nanofibras se incrementaron las propiedades antioxidantes y la actividad antimicrobiana de las películas frente a distintas cepas bacterianas de importancia en enfermedades transmitidas por alimentos. Estos resultados podrían atribuirse a una mejor distribución del aceite en las películas, a través de un mayor número de gotas de menor tamaño (observado por SEM), lo que podría deberse a un interesante efecto emulsificante de las nanofibras (recientemente descrito).

Estos resultados propician la utilización de estos materiales activos y nanocompuestos en la preservación de alimentos, lo que será evaluado en futuros estudios.

Palabras clave: proteína de soja, nanofibras de celulosa, películas antioxidantes y antimicrobianas, envases activos.

24 - DESARROLLO DE SISTEMAS NANOMÉTRICOS PARA LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA UTILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA PERIODONTITIS

A. Carpentieri¹, S. M. Martínez², D. A. Allemandi² y D. A. Quinteros^{*2}

1-Cátedra de Química Biológica. Facultad de Odontología Universidad Nacional de Córdoba. INICSA-CONICET/UNC. Córdoba-Argentina. 2-Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas Universidad Nacional de Córdoba. UNITEFA. Córdoba-Argentina. *correo electrónico: *danielaaq@fcq.unc.edu.ar

INTRODUCCIÓN:

La periodontitis es una enfermedad causada por bacterias de la placa dental. Se caracteriza principalmente por la destrucción del periodonto de inserción, el cual incluye cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar¹. En Latinoamérica, la mayoría de la población sufre de enfermedad periodontal en distintos grados de severidad². Una vez dañado, el periodonto tiene escasa capacidad para la regeneración³. Los procedimientos más comunes para lograr regeneración periodontal incluyen acondicionamiento radicular, injertos óseos, regeneración tisular guiada y la aplicación de factores de crecimiento⁴. Sin embargo, estos procedimientos son poco predecibles y están asociados con una alta tasa de variabilidad⁵. La melatonina (MEL, N-acetil-5-metoxitriptamina), es una hormona sintetizada y secretada principalmente por la glándula pineal. La MEL también se produce en varios órganos, y las enzimas formadoras de MEL son encontradas en un gran número de tejidos, incluyendo la retina, ovarios, tracto gastrointestinal y células del sistema inmune⁶. MEL es liberada a la sangre y luego difunde pasivamente a la cavidad oral vía la saliva y a la mucosa oral. La MEL en saliva se encuentra en concentraciones de hasta un 70% menos que en sangre⁷. Dentro de las variadas funciones de la MEL está reconocida su acción estimuladora de la formación ósea, ya que estimula la proliferación y la síntesis de fibras de colágeno tipo I en osteoblastos (OB) humanos in vitro⁸. Dentro del metabolismo óseo, otra importante acción biológica directa de la MEL se centra en el osteoclasto (OC), célula multinucleada encargada de la reabsorción de matriz extracelular mediante diversos mecanismos, dentro de los cuales se encuentra la producción de radicales libres. La MEL, a través de su acción antioxidante y depuradora de radicales libres, podría interferir en esta función del osteoclasto e inhibir de esta forma la resorción ósea. En los últimos años la **nanodontología** ha aportado nuevas tecnologías en el desarrollo de materiales innovadores con partículas en rangos nanométricos, y su aplicación clínica cotidiana como nanopartículas, nanotubos y nanorobots, que han mejorado incluso los procedimientos tradicionales, revolucionando terapias y los procedimientos odontológicos clásicos. En este contexto, los sistemas nanoparticulados han mostrado ser sumamente auspiciosos como sistemas farmacéuticos de uso odontológico para dar respuesta a todos estos requerimientos de formulación. No obstante, estos sistemas no han sido exhaustivamente explorados para administrar fármacos por esta vía, comparativamente con otras vías de administración (ej. parenteral). Con este nuevo sistema se busca insertar directamente Melatonina utilizando como sistema portador diferentes sistemas nanométricos dispersos o no, en polímeros bioadhesivos en la bolsa periodontal, liberando el fármaco de forma sostenida

MATERIALES Y MÉTODOS:

Materiales:

Nanocápsulas de etilcelulosa – Melatonina (MEL): Etilcelulosa (Colorcon[®]), Melatonina (Drogueria Saporiti S.A.C.I.F.I.A), Span 60 (Resikem S.A), Miglyol 812 (Cremer Oleo), Etanol 95% calidad p.a (Porta[®]), Tween 80 (Todo Droga), Agua Purificada.

Métodos:

Elaboración de sistemas nanoparticulados de etilcelulosa cargados con Melatonina.

Las nanocápsulas serán preparadas por deposición interfacial del polímero preformado. Es una técnica sencilla fácilmente escalable a nivel industrial. Consiste en obtener una solución en acetona de

polímero (Etilcelulosa), fármaco, surfactante lipófilo (Span 60) y aceite (triglicéridos de cadena media) que se añadirá a una dispersión acuosa de Tween 80 (agente tensioactivo hidrófilo), bajo agitación magnética a 40°C. El etanol se separará y la fase acuosa se concentrará por evaporación bajo presión reducida. El volumen final se ajustará a la concentración deseada. Se desarrollaron nanopartículas de etilcelulosa (NCEC-B) y conteniendo MEL (NCEC-ME, dosis de 1,2 mg/ml).

Caracterización físico-química: se realizaron estudios tales como medición de pH, Potencial Z tamaño de partículas y eficiencia de encapsulación de Melatonina.

Estudios in vitro: se realizaron perfiles de liberación en Fluido simulado de Saliva y su respectiva cinética de liberación.

RESULTADOS :

Caracterización física – química de NCEC-ME.

pH: Las formulaciones de NCEC-ME, mostraron valores de pH ligeramente ácidos. Evidenciando una disminución a medida que aumenta la concentración de Melatonina.

Tamaño de partícula, polidispersidad (Pdl) y Potencial Z: se observó un rango tamaño de partícula (determinado por el diámetro hidrodinámico, d_H) para NCEC-ME, entre 10 nm y 155 nm, aunque se observó un ligero aumento del tamaño de partícula con el descenso de la concentración del fármaco. Los valores de Pdl obtenidos son menores a 0.160, éste resultado hace presumir la obtención de un tamaño de partícula relativamente homogéneo. Los valores de Potencial Z muestran valores negativos, aproximadamente -22 mV.

Capacidad de carga: La capacidad de carga de las NCEC-ME fue de aproximadamente 64 % para NCECME (1mg/ml) y de 69% para NCECME (2mg/ml).

Estudios in vitro de liberación de Melatonina desde NCEC-ME: se observó una liberación prolongada en el tiempo del sistema nanoparticulado, en comparación con una solución de MEL en una concentración de 1mg/ml reflejan. Además, a medida que aumenta la concentración de MEL en las NCEC-ME, la velocidad de liberación tiende a disminuir.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN:

Las Nanocápsulas de Etilcelulosa cargadas con Melatonina tienen un tamaño de partícula aproximado de 150 nm, con baja polidispersidad y con carga superficial es negativa. Esta dispersión ligeramente ácida ha mostrado tener una adecuada eficiencia de encapsulación de MEL, con capacidad de liberar el fármaco de manera prolongada en el tiempo y dependiente de la concentración. Estas características permiten inferir que serían sistemas con potenciales ventajas para su utilización como sistemas nanométricos para vehicular Melatonina para el tratamiento de diferentes patologías periodontales, principalmente periodontitis.

1 Baelum V. et al. Periodontology 2000, 2013; 62:37-58.

2 Oppermann R et al. Periodontology 2000, 2015; 67: 13–33.

3 Feng R. Advances in wound care 2013; 2:296- 305.

4 Sander L et al. J. Clin Periodontology 1995; 22:332-337.

5 Needleman IG. Cochrane Database Syst Rev. 2006 Apr 19;(2):CD001724 (Abstract)

6 Carpentieri A et al. Mol Cell Biochem 2014; 387:197–205.

7 Nakade O et al. J Pineal Res. 1999; 27:106-10

8 CARDINALI DP ET AL. J PINEAL RES. 2003; 34:81-87.

162° JORNADA CIENTÍFICA
ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
 FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
 UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
 Sala de conferencias: “Pbro. Antonio Sáenz”

**“SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO.
 PASADO, PRESENTE Y FUTURO”**

Coordinadores
 Acad. Silvia Gold – Acad. Francisco Stefano
 Buenos Aires – Argentina
 14 de Septiembre de 2017

	PROGRAMA
14:30 – 14:35 hs	Introducción
14:35 – 15:05 hs	“Escherichiacoli productor de toxina Shiga: avances de un abordaje transdisciplinario” Académico Gerardo Leotta <i>Académico de Número en representación de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria</i>
15:15 – 15:45 hs	“SUH, su impacto en la población pediátrica Argentina” Dra. Andrea Exeni <i>Jefe de Sección Nefrología y Diálisis Peritoneal Crónica Infantil Hospital Universitario Austral</i>
15:55 – 16:25 hs	“Nuevo paradigma diagnóstico del Síndrome Urémico Hemolítico típico” Dra. Marta Rivas <i>Jefe Servicio Fisiopatogenia INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”</i>
16:35 – 16:50 hs	Café
16:50 – 17:20 hs	“Prevención del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH)” Dra. María Gracia Caletti <i>Consultora (h) H. Garrahan</i>
17:30 – 18:00 hs	“Ingeniería de proteínas para el abordaje terapéutico del Síndrome Urémico Hemolítico” Dr. Fernando Goldbaum <i>Investigador Superior CONICET, Director del Centro de Rediseño e Ingeniería de Proteínas (CRIP-UNSAM)</i>

“*Escherichiacoli* productor de toxina Shiga: avances de un abordaje transdisciplinario”

Académico Gerardo Leotta

Académico de Número en representación de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria

Muchas gracias por la invitación.

Espero que esta sea la antesala de una relación interesante entre ambas academias: Farmacia y Bioquímica y de Agronomía y Veterinaria. Aprovecho mientras la presentación se va cargando. En noviembre va a haber una jornada interacademias, ambas academias van a estar participando junto con Medicina y Veterinaria de Uruguay, acá en Buenos Aires.

Lo que tengo para comentarles es que si bien vengo en representación de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria mi lugar de trabajo es el CONICET y lo que les voy a comentar es algunos avances respecto de un abordaje transdisciplinario con *Escherichia coli* productor de toxina Shiga, no con la enfermedad en si misma sino con el agente etiológico.

Yo soy responsable de la línea de investigación en el Instituto de Genética Veterinaria, una unidad ejecutora del CONICET, y la UNLP es de doble dependencia. La línea se llama Seguridad alimentaria y está dirigida particularmente hacia inocuidad. Y entre lo que es inocuidad particularmente al peligro biológico: bacterias patógenas transmitidas por alimentos.

La línea fue creada en el año 2009 y estas son un poco las metas que tenemos la línea y el Instituto: que lo hacemos en investigación pueda aplicarse en docencia de hecho estamos en una universidad pública y en extensión. Y cuando digo extensión me refiero desde el punto de vista genuino, de devolver a la comunidad lo que la comunidad hace por el sector de ciencia y técnica y por Universidad pública. Y en este marco les voy a contar algunas de las experiencias que tuvimos. El objetivo de esta línea de investigación fue el desarrollo de técnicas moleculares para la detección de bacterias patógenas transmitidas por lo alimentos. Tratamos de abarcar distintos alimentos: acá pueden ver algunas: *Salmonella* spp; marcada en rojo la que nos convoca el día de hoy *Escherichia coli* STEC O157:H7 y STEC no-O157 productos de toxina Shiga; *Campylobacter jejuni* y *C. coli*; *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*; *Staphylococcus aureus*; *Cronobacter sakazakii*, entre otras.

El tema es que teníamos estas técnicas, las teníamos desarrolladas y las teníamos validadas, publicábamos trabajos de investigación, pero la idea fue qué hacemos con esto desde el laboratorio cómo podemos aplicar, cómo podemos devolver a la comunidad algo de lo que estamos haciendo. Para qué sirve lo que estamos haciendo.

Al estar en la Facultad de Veterinaria trabajamos con varias matrices, pero convocó fuertemente la cadena de la carne bovina y una de las enfermedades que tenía vínculo con la cadena de producción de la carne es el SUH, como dijo el Dr. Stefano, una enfermedad endémica en la Argentina en donde hay 300 y 500 nuevos casos por año. Si lo comparamos con el resto del mundo y el total de habitantes es 1.1 casos cada 100000 habitantes. No hay mucha diferencia con otros países sin embargo el rango etario más sensible menores de 5 años esta cifra aumenta a 8.4 cada 100000 niños menores de 5 años.

Pero también debemos reconocer que si bien lo rumiantes en general, el ganado vacuno en particular es el principal reservorio, se descubrió en otras especies animales: ahí tenemos distintos rumiantes hasta silvestres, conejos, perros, gatos, roedores, cerdos, palomas, moluscos bivalvos, y más. Y el hombre que tiene que ver con la transmisión persona a persona, Hay varias formaciones relacionadas con esta transmisión persona a persona, y uno de los grandes brotes fue en el año 2011, en Alemania, se considera que la bacteria que lo causo podría ser de origen humano y como alimento relacionado vegetales. Esto es mucho más complejo que vincularlo al ganado bovino y a la carne. Por eso nosotros tratamos de hacer un abordaje integral basándonos en la cadena agroalimentaria y bajo el concepto de una sola salud: la salud humana, la salud animal, y la salud ambiental.

Desde nuestra línea de trabajo, tratamos de abordar todos los eslabones, particularmente de carne bovina. Trabajamos en producción primaria con la industria alimentaria: les voy a dar algunos ejemplos:

Puntos de comercialización y venta. y acá me voy a detener. El primer ejemplo que les voy a dar. Empezamos al revés en la cadena por el punto de venta minorista. En el año 2010 diseñamos este programa “Carnicerías saludables” con la idea de mejorar la calidad de la carne bovina destinada al consumo minorista. Esto devino en que nos encontramos con una realidad quizás diferente a las que nos imaginábamos y terminamos contribuyendo con las autoridades sanitarias y bromatológicas para fortalecerlas, para generar un vínculo entre la autoridad sanitaria y la boca de expendio minorista. Al menos las pruebas piloto que hicimos en la ciudad de Berisso (BA)

El programa consistió en 3 etapas:

La primera etapa es descriptiva, explicamos desvíos. En esta etapa lo hicimos fue describir, analizar y proponer acciones de mejora. Esto no lo podíamos hacer sino de la mano de la autoridad sanitaria. Pero la propuesta, las opciones de mejoras se hicieron en conjunto con los carniceros. Ellos mismos al contarle cual era el peligro iban buscando en conjunto soluciones. Si ellos no estaban convencidos de aplicar estas mejoras era difícil que tengan éxito.

En la segunda etapa se implementaron las acciones de mejora y en la tercera etapa se verificaron.

Y esto que parece tan sencillo, tan obvio, no siempre es así porque muchas veces hay planes de estas características que quedan en una capacitación; capacitación que quedó ahí. Lo interesante de estos, el desafío, fue ver si realmente las acciones de mejoras se implementaron y si realmente fueron efectivas.

En la etapa 1 lo que hicimos fue aplicar una planilla de cuantificación de riesgo dividiendo la carnicería en 5 grandes bloques donde la cuantificación de riesgo estaba basada en inocuidad no en aquello que los inspectores tienen mayor avidez en ver que son las condiciones edilicias sino en el manejo de la carne. Tomamos muestra de carne picada en góndola y después la situación general que se daba en la carnicería. Un análisis microbiológico negativo a la carne molida en determinado momento es circunstancial si el ambiente está contaminado. Es por ello que tomamos muestras de ambiente: picadoras y las desarmábamos, tomamos muestras de las manos de carniceros, tablas, los cuchillos y chairas. Demás está decir que no hacíamos únicamente *Escherichia coli*, también buscábamos *salmonela*, *listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.

En la segunda etapa lo que se hizo fue aplicar acciones de mejoras y los usamos como lema fue “Capacitación sin sanción”. La idea de esto era si hay una sanción. Si hay sanción se cobra una multa. Se cierra la carnicería. Se vuelve a abrir y no tiene ningún tipo de mejora. Se vuelve a abrir en las mismas condiciones. Entonces la idea es explicarle al carnicero que fue lo que ocurrió y cómo mejorarlo.

Estos son los resultados de la prueba piloto en la ciudad de Berisso. Lo podemos clasificar en tres estratos: riesgo alto, moderado y bajo y podemos comparar la primera etapa con la tercera

La primera etapa fue en 2011, la segunda etapa en el año 2012 y en el año 2013 la tercera. De riesgo alto tuvimos en el año 2011 el 50% o sea que la mitad de las carnicerías eran de riesgo alto. En el 2013 bajamos al 22%. De riesgo moderado de 34% pasamos a 42%. Asumimos ahí que las que eran de riesgo alto pasaron a moderado. Y de riesgo bajo pasamos de 10 a 30%. Entonces podemos asumir que tuvimos un 55.8 % de mejora con un saldo positivo ya que 48 de 86 tuvimos buenos resultados

Con esto también, lo intentamos hacer es comunicar a la sociedad que era lo que estaba pasando y trabajar con los chicos de edad en riesgo. Para esto lo hicimos con todos los jardines de infantes tanto públicos como privados. Eran 26 jardines de infantes y utilizamos como herramienta didáctica la caja didáctica de USO la ONG de lucha contra el SUH. Y 4500 chicos llevaron información a sus casas de cómo prevenir las enfermedades producidas por los alimentos, no únicamente el SUH sino todas las enfermedades producidas por los alimentos

El programa carnicerías saludables fue transferido a partir del año 2013 en conjunto con el Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina a 15 jurisdicciones y más de 150 municipios. Actualmente seguimos con la etapa de transferencia. Por suerte este es un programa voluntario. Nadie obliga a nada. El

que lo quiere hacer es porque quiere generar un vínculo entre las bocas de expendio y la autoridad sanitaria. También sirvió como disparador no solo para trabajar con carnicería sino también con panadería, rotiserías. Fue una experiencia interesante.

Los resultados de este trabajo están publicados, disponibles en la red. Al que le interesa lo puede consultar o me lo puede pedir.

Y ahora cambio el ángulo de la información respecto de la cadena de producción de la carne. En el año 2011 se produjo un brote de SUH en Alemania causado por *E. coli* productor de toxina Shiga O104:H4 que produjo 54 muertes, 855 casos de SUH y 2987 afectados. La primera causa de origen del brote fueron pepinos de origen español y generó un costo enorme para la cadena frutihortícola que costo más de 200 millones de euros. Los pepinos no tenían la bacteria. Los problemas de comunicación de riesgo no terminaron con los pepinos, sino que se identificaron a brotes de soja de origen alemán. Y después se demostró que habían sido unas semillas de mostaza; las semillas de mostaza tampoco habían sido y terminaron con semillas germinadas de fenogreco.

Esto significó también un cambio en la legislación europea que fija los criterios microbiológicos para los alimentos. El reglamento fue modificado y se estableció un criterio claro para la tolerancia 0 a 6 serogrupos de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga.

Sin embargo, en los años 2013 y 2014 se identificó a la carne bovina, sin tener asociación con este brote, como alimento de mucho riesgo. Y hubo, podemos ver en este resumen, como producto cárnico y con motivo del test tolerancia 0, primero se empezó a considerar los genes STEC y poner en aislamiento a todos los STEC, mas 1152 serotipos. Hubo 28 alertas, entre los cuales tenemos estados miembros de la UE, Nueva Zelanda, Brasil y Argentina. Información para seguimiento hubo 3 informes relacionados con Alemania, información para tensión 20 estados de la UE, 5 de Argentina, 2 de Uruguay, Brasil, Nueva Zelanda EE UU y Sudáfrica. Hubo 84 contenedores rechazados de los cuales eran 27 de Argentina, 26 de Brasil, 23 de Nueva Zelanda, 5 de Uruguay y 3 de Namibia. Carne de origen bovino de Argentina, Brasil y Uruguay. El resto era carne de cordero o carne de ciervos.

En este marco se generó un grupo, por solicitud del Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina, donde se convocó a 3 unidades ejecutoras del CONICET, SENASA, INTA y la Agencia Gubernamental de control de CABA para tratar de buscar una solución a esta problemática en la cadena de producción de la carne bovina con destino a la UE. Por supuesto que este trabajo tenía consecuencia para el consumo interno

Los ejes estratégicos para este grupo fueron 2: capacitación e investigación y desarrollo. Para esto, terminó firmándose un convenio entre CONICET y el IPCVA.

En capacitación participamos del 8vo. workshop de laboratorios de referencia de la UE. También participamos de un interlaboratorio, el primer interlaboratorio organizado por la UE en el cual participaba Argentina. Esto fue en 2013 y en 2014 colaboramos e instamos para que participe SENASA. No tiene sentido que participe un laboratorio de ciencia y técnica cuando tiene que estar la autoridad sanitaria participando para dar garantías al exterior. Y también participamos en un workshop que se realizó en Bruselas donde se dio a conocer parte de los resultados que veníamos haciendo hasta entonces y esto se hizo en conjunto con cancillería, el SENASA y IPCVA para mostrar los resultados que había y en esta reunión fue muy interesante porque había autoridades sanitarias de la UE y de la Comisión Europea además de varios países. Toda esta información sirvió para consolidar un curso Centro de Estudios para la capacitación de veterinarios que se hizo en el año 2014 y después se reeditó en los años 2015, 2016 y 2017. Este año ya con la experiencia adquirida el curso fue solicitado por Paraguay y lo dictamos hace un mes.

En investigación y desarrollo lo que hicimos o logramos hasta el momento fue caracterizar el riesgo y mitigación del impacto STEC en la cadena cárnica bovina e implementación de mejoras en plantas frigoríficas. Lo que hicimos fue un estudio de características similares al de carnicerías saludables y un frigorífico exportador. Donde bajamos todos, el mismo tipo de diseño trabajando con producto terminado y como alimento de mayor riesgo en un frigorífico de estas características que son los recortes además de hacer todas las muestras ambientales donde pudimos ver dónde es que estaba presente la bacteria. Por

supuesto que el objetivo de esto era tolerancia 0 a STEC. El objetivo que perseguíamos fue la tolerancia 0 a *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en este tipo de establecimiento.

Demostramos con este primer componente que es prácticamente imposible tener un producto como la carne fresca, cruda, libre de *Escherichia coli*, de hecho, en ninguna reglamentación lo tienen así y entre estas *Escherichia coli* tenemos *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Lo que encontramos no son los serotipos que tienen implicancia en salud pública. Sin embargo, si estaban siendo una barrera para el comercio de la carne. Y en ese momento lo que se propuso fue evaluar distintas intervenciones no solamente aplicando la práctica de mejoras, veíamos que no funcionaban que no eran suficientes para este criterio de tolerancia 0, sino de probar distintos agentes sanitizantes alternativos como ozono en cámara, agua ozonizada, agua electroactivada, agua caliente y ácidos orgánicos para el lavado de las reses al final de la línea de faena.

En un tercer componente lo que hicimos fue una evaluación de riesgo de STEC por consumo de piezas cárnicas intactas. Esto fue también algo que se discutió mucho en la UE porque lo que compra a Argentina son cortes enteros y cortes de primera calidad que no van a estar destinados a carne molida y habría que hacer una asociación entre el riesgo que había entre el producto y el consumidor y la manipulación que va a tener ese producto.

El cuarto componente fue la implementación de un monitorio de STEC en plantas frigoríficas exportadoras. Se hizo un trabajo con 8 frigoríficos. Y se analizaron en un periodo de 8 meses unas 16000 muestras donde encontramos que en el 6.8% de las muestras analizadas pudimos aislar STEC y de lo que aislamos, de las 200 cepas que aislamos, solamente 1 estaba relacionada o podía llegar a tener impacto con la salud pública.

El quinto fue un proyecto de validación de estrategias de intervención para el lavado de medias reses. Esto se hizo como consecuencia de una resolución de presidencia de SENASA del año 2014 donde se abrió el juego para implementación de intervenciones al final de la línea de faena: Ácidos orgánicos, agua caliente y vapor. Lo que nosotros probamos en esta instancia fueron distintos ácidos orgánicos, agua caliente y agua electroactivada.

Como conclusión esto se hizo a campo, fueron 9 intervenciones que se probaron y lo que vemos es que los frigoríficos son todos distintos, no son iguales, cada universo tiene su realidad y tuvimos como una de las grandes conclusiones que la aplicación manual de estas intervenciones no se puede considerar, debe ser descartada. Lo que si vimos que con arco con cámaras comerciales ya sea ácidos orgánicos o agua caliente son efectivas. Y por supuesto que el ácido orgánico tiene mucha mejor performance cuando la media res está bien escurrida. Si hacemos un lavado de la media res e inmediatamente se aplica el ácido orgánico queda diluido y el efecto no es el mismo.

El sexto componente es evaluación y estandarización de estrategias de intervención para reducir la presencia de STEC en corte de carne bovina previo al envasado y en recortes de carne bovina. Este es un proyecto que estamos haciendo en este grupo y en conjunto con INTA donde estamos probando ácidos orgánicos, agua electroactivada y combinaciones con irradiación que fue recientemente aprobada por la CONADE.

Están son algunas de fotos que representan estos trabajos. Lo que ven arriba es como disminuyo en cama con la aplicación de ozono ambiental, disminuyo la carga en superficie como en medio ambiente como el aire. Cuando la cámara comenzó a ser abierta, cuando se empezó a usar la cámara se dispararon los recuentos. Una de las conclusiones que les puedo dar respecto de ozono es que si no hay un buen manejo de la cámara mejor no aplicarlo.

Un boletín que colaboramos con SENASA para armar uno de los trabajos que publicamos también sobre los resultados del monitoreo con los 8 frigoríficos.

Arriba un arco artesanal que fue el que mejor funciono. Es para el rociado de medias reses después de la faena y después de un oreo continuo de 30 minutos, la media res llegaba seca. Además, en este frigorífico se aplicaban 2 litros y medio de ácido láctico por cada media res. O sea, un volumen muy alto ácido además de aplicarlo en una media res seca.

Y acá viene la pregunta. Estamos logrando una cantidad interesante de la carne que va a exportación. Por supuesto que no se la vende, esos frigoríficos no se la venden solo a UE sino que también la consumimos nosotros Y la pregunta es Cuántos estándares creen que existen en la Argentina? ¿Alguien se atreve a decir dos, tres?

Veamos.

Frigoríficos exportadores, máximo estándar sanitario. Estos frigoríficos están controlados por la autoridad sanitaria que es SENASA y reciben auditorías externas. Pero también tenemos frigoríficos de tránsito federal que si bien están controlados por SENASA no tiene el mismo estándar sanitario porque no reciben presiones comerciales externas.

Después tenemos los frigoríficos de tránsito provincial. Son frigoríficos que venden únicamente, y tiene autorización para vender en las provincias. Quien rige no es SENASA sino la autoridad de competencia provincial. Si vamos a la provincia de Bs. As. el Ministerio de Agroindustria de la provincia. Si bien existe una ley federal de carnes, el estándar sanitario no es el mismo.

Después tenemos mataderos municipales. El producto que se faena ahí se comercializa en teoría, y se consume en el municipio. No puede salir a un municipio vecino.

Después tenemos la faena artesanal que, aunque parezca mentira, abunda en la Argentina. En el interior hay mucha faena artesanal. Se faena en el campo y es para consumo propio. Ahora que problema cuando el consumo propio se comercializa porque pasa a ser faena clandestina. Y ni hablar de los problemas de abigeato.

No es tan sencillo el abordaje y no son solamente 2 estándares o tres. Es bastante más complejo.

En este contexto nosotros redoblamos la apuesta y pasamos de aquellos frigoríficos exportadores y con la experiencia que habíamos ganado en frigoríficos y en carnicería a un proyecto con frigoríficos de tránsito provincial con el mismo esquema de trabajo: 3 etapas y en este caso lo hicimos en conjunto, a través de un convenio con el Ministerio de Agroindustria de la Pcia. de Bs. As. y el Laboratorio Stambouljan. Es imposible hacerlo si no está involucrada la autoridad sanitaria. Esta prueba piloto se está haciendo con 3 frigoríficos de las Pcia. de Bs.As. y con 3 frigoríficos de la Pcia. de Tucumán. No tengo resultados finales, pero si puedo mostrar algunas fotos.

En estos frigoríficos lo que incluimos fue el análisis del agua que se utiliza de los pozos y del agua que se utiliza para el lavado de las reses y dentro del frigorífico que no siempre se refleja el análisis anual o cada 6 meses.

Muestra de medias reses maduradas y recién faenadas, muestra de cuchillo, cámaras frías y baños. Con esto queremos demostrar científicamente algo tan obvio como la utilización de un filtro sanitario.

A este proyecto le incorporamos subproductos que se comercializan y terminan en la carnicería. Entonces estamos tomando muestras de agua de lavado y enfriado de hígado, corazón, chinchulines, mollejas y riñón además de un subproducto que nadie ve, nadie considera, que es la carne chica de cabeza, que es la carne que sale del pelado de la cabeza, no se desaprovecha nada y eso termina siendo en ocasiones carne picada que se vende en las carnicerías. Los resultados de este trabajo van a ser muy importantes para dar información de como trabajar con este tipo de establecimientos con la idea de predecir para prevenir. Y esta frase que copie y uso siempre es del Instituto Nacional de Epidemiología “si las personas están al borde de un precipicio es más humanitario instalar un cerco de contención en lugar de instalar un hospital en el fondo”. Esto se logra en forma transdisciplinaria poniendo sobre la mesa los problemas y buscando soluciones, pero hay que ponerlos primero sobre la mesa.

Y con esto termino como decía predecir para prevenir, este trabajo contribuyó para la creación de la Red de Seguridad Alimentaria de CONICET. Este es nuestro objetivo, poner el sector de ciencia y técnica a disposición de los gestores para que puedan tomar decisiones con base en ciencia.

“Nuevo paradigma diagnóstico del Síndrome Urémico Hemolítico típico”

Dra. Marta Rivas

Jefe Servicio Fisiopatogenia INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"

En primer lugar haré una breve reseña de la historia natural de la enfermedad y de su agente etiológico, *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC). La primera descripción del SUH fue realizada por el grupo del Dr. Gasser y colaboradores, en Suiza en el año 1955, aunque hay registros de la década del 20, que correspondían a niños que presentaban una sintomatología similar a la que ahora conocemos como SUH.

Previamente se mencionaron los aportes del Dr. Gianantonio y su grupo como lo más relevante de Argentina. Fue el Dr. Gianantonio quien a partir del año 1962 realizó una recopilación descriptiva de numerosos casos, y fundamentalmente instauró el tratamiento de diálisis en niños con SUH, bajando drásticamente la letalidad. En 1977, Konowalchuk y col. en Canadá, informaron que ciertas cepas de *E. coli* aisladas de casos de diarrea producían una toxina con actividad citotóxica sobre las células Vero de riñón del mono Verde Africano, de ahí el nombre de verotoxina. Pocos años después, O'Brien et al. (1982) demostraron que una toxina producida por algunas cepas de *E. coli*, con efecto citotóxico sobre las células HeLa, podía neutralizarse con un antisuero anti-Stx de *Shigella dysenteriae* tipo 1 y la llamaron “toxina similar a Shiga” (del inglés, *Shiga-like toxin*, SLT). La emergencia de *E. coli* O157 como patógeno humano se produjo en el año 1982 cuando ocurrieron 2 brotes de colitis hemorrágica en Michigan y Oregon, EE.UU., asociados al consumo de hamburguesas en locales de una cadena de comidas rápidas. El serotipo O157:H7 de *E. coli*, identificado como el agente causal, fue reconocido por primera vez asociado a enfermedad humana. Al año siguiente, Karmali y col. en Canadá reportaron que la toxina producida por ciertas cepas de *E. coli* estaba vinculada epidemiológicamente al desarrollo de SUH. A finales del año 1992 y principios del 1993 ocurrió un brote multiestado, en 5 Estados de la costa oeste de los EE.UU., asociado al consumo de hamburguesas en locales de una cadena de comidas rápidas, que fue emblemático porque dejó muchísimas enseñanzas. Entre ella, se pudo establecer la dosis infectiva de *E. coli* O157, se modificaron las temperaturas de cocción de las hamburguesas, y los consumidores tomaron conocimiento sobre los riesgos de esta bacteria para la salud humana. Algo importante fue que los primeros casos de colitis hemorrágica fueron identificados en un Estado donde la notificación de las infecciones por O157 era obligatoria, mientras que en los otros Estados, donde la notificación no lo era, la identificación fue más lenta. Por ello, a partir del año 1995 se estableció la notificación obligatoria de O157 en todos los Estados de EE.UU., y en el año 2000 de las infecciones por no-O157. Como resultado de este brote, en 1994, USDA/FSIS [United States Department of Agriculture (USDA)/Food Safety and Inspection Service (FSIS)], estableció una reglamentación por la cual se consideraba a O157 como adulterante en carne molida y derivados, con tolerancia 0. El año 2000 fue muy importante para Argentina porque se estableció la notificación obligatoria, inmediata e individualizada (Resolución N° 346/00) de los casos de SUH al Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud. En el año 2001 se produjeron casos asociados al consumo de hamburguesas en locales de una cadena de comidas rápidas de la Ciudad de Buenos Aires. A partir de ese momento se comenzó a trabajar en el Comité de Criterios Microbiológicos de la Comisión Nacional de Alimentos, y finalmente en el año 2004 se incorporaron Criterios Microbiológicos en el Código Alimentarios Argentino, con tolerancia 0 para O157 en carne picada y derivados. Otro hito importante en Argentina fue el inicio de las actividades de las Unidades Centinela para SUH (UCSUH) en 2005, para realizar la vigilancia intensificada de la enfermedad, distinta de la vigilancia universal. En este momento hay 25 UCSUH en todo el país.

En el año 2011 se produjo un brote de colitis hemorrágica y SUH en Alemania, y, se identificó como agente causal a un patógeno hasta ese momento desconocido, el cual era un híbrido resultante de la asociación de dos categorías o patotipos de *E. coli* diarreigénico. La cepa asociada al brote era una *E. coli* enteroagregativa (EAEC), con todos sus factores de virulencia, que había adquirido por transferencia horizontal el fago que codifica para la toxina Shiga. De esta manera se reconoció a este híbrido como EAEC/STEC del serotipo O104:H4, del cual hasta ese momento había muy pocos casos de SUH descriptos en el mundo. Este brote fue emblemático por el número de afectados, y a partir de allí se produjo una modificación de las reglamentaciones internacionales respecto a la calidad de los productos alimenticios, fundamentalmente los productos cárnicos, pero también frutas y vegetales. Finalmente en el año 2012 USDA/FSIS estableció en los EE.UU. una reglamentación de tolerancia 0 para 6 serogrupos no-O157, prevalentes en enfermedad humana, a los que llamó "Big Six", en productos de carne no intacta, mientras que en Europa se estableció tolerancia 0 para los serogrupos no-O157 llamados "Five Top". Como consecuencia de estas reglamentaciones internacionales, a principios del año 2017, el Código Alimentario Argentino incorporó otros serogrupos no-O157, prevalentes en enfermedad humana en el país, con tolerancia 0 en determinados alimentos.

En Argentina, STEC es el agente etiológico de la forma infecciosa del SUH que hoy se conoce como SUH típico (SUHt), y que representa el 95% de los casos notificados. Hay otras formas de SUH que se conocen como SUH atípico (SUHa), que tienen distintos orígenes, representando aproximadamente el 5% del total de casos del país, con una elevada mortalidad.

En Argentina, la vigilancia del SUH se realiza utilizando distintas estrategias. Primero está la notificación de los casos clínicos al Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud, a través del módulo SNVS-C2. Después la Vigilancia Centinela a través del módulo UCSUH. Funcionan 25 UCSUH en 16 jurisdicciones. Finalmente la Vigilancia Basada en Laboratorio a través del módulo SNVS-SIVILA. Además, el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) realiza la vigilancia molecular de los clones STEC circulantes a través de la Red PULSENET de América Latina y el Caribe.

Es importante recordar que existe la Ley 15465 desde la década del 60, cuyo Art. 4º establece que médicos, médicos veterinarios y laboratoristas, entre otros, están obligados a notificar aquellos eventos que la autoridad sanitaria establece como de notificación obligatoria.

Cuál es la importancia del SUH típico en Argentina? En el país se producen entre 300 y 400 casos nuevos por año, presenta la incidencia más alta a nivel mundial, con aproximadamente 10 casos por cada 100.000 niños menores de 5 años. La tasa poblacional se mantiene por debajo de 1 caso cada 100.000 habitantes. Hay evidencias de infección por STEC en un 70% de los casos. Se presentan los datos consolidados en el Ministerio de Salud Argentina del período 2010-2016 (Boletín Integrado de Vigilancia N_ 344–SE 3–Enero de 2017. Disponible en: <http://www.msal.gob.ar/images/stories/boletines/Boletin-Integrado-De-Vigilancia-N344-SE3.pdf>).

En cuanto a distribución etaria, el grupo con mayor el número de casos corresponde a los niños de 2 a 4 años, pero la tasa más elevada corresponde al grupo de 1 año, con 14 casos por cada 100.000 niños. No hay grandes diferencias en la distribución por sexo, pero siempre hay un ligero predominio del sexo femenino.

Si bien ya se dijo anteriormente, quiero destacar la importancia del diagnóstico temprano de la enfermedad. En la secuencia temporal de la enfermedad, el tiempo 0 corresponde al inicio de la diarrea, pero hay un periodo de incubación, que en promedio es de 3 días, pero puede durar hasta una semana o más. Al inicio, la diarrea es acuosa-mucosa, en 2 a 3 días pasa a diarrea sanguinolenta, y al cabo de una semana puede evolucionar a SUH. Se debe enfatizarla importancia del diagnóstico temprano de la infección por STEC con aislamiento de la bacteria y también la caracterización genética de la toxina Shiga producida. Lo que se sabe actualmente es que hay un

grupo de variantes de la toxina Shiga, Stx2a, Stx2c y Stx2d activable, que son más citotóxicas y por lo tanto su detección requiere un seguimiento más estricto del paciente, con hospitalización, monitoreo de su evolución y una terapia expansiva temprana. Mientras que hay otras toxinas Stx que tienen menor efecto citotóxico y no hace falta en principio una internación, sino un seguimiento ambulatorio.

En cuanto al diagnóstico de STEC hay distintos ensayos. Hay inmunoensayos que utilizan tests inmucromatográficos:

1. Singlepath *E. coli* O157(Merck)
2. Immunocard STAT! *E. coli* O157 Plus (Meridian)
3. **Duopath Verotoxins (Merck), diferencia Stx₁/Stx₂**
4. **Immunocard STAT! EHEC (Meridian), diferencia Stx₁/Stx₂**
5. RIDAQUICK Verotoxin/O157 Combi (r-Biopharm), no diferencia Stx

En general, estos tests tienen buena sensibilidad y especificidad. Los que están resaltados en negrita son aquellos que están recomendados por el CDC (Centers for Disease Control and Prevention) de EE.UU. Estos tests inmucromatográficos pueden detectar la toxina Shiga, a veces diferenciar Stx1 y Stx2, y también a O157.

Hay otros inmunoensayos que requieren mayor tiempo de realización, pero tienen buena sensibilidad y especificidad. Se hacen a partir de materia fecal del paciente o directamente del aislamiento. Hay un inmunoensayo, llamado Shiga Toxin Quik Chek®, que es un enzimoimmunoensayo en casete, rápido, sensible y específico. El LNR está verificando su desempeño, con buenos resultados para detectar tempranamente la infección por Stx1 y Stx2.

1. **Premier EHEC (Meridian), no diferencia Stx**
2. **ProSpecT Shiga Toxin (Remel), no diferencia Stx**
3. RIDASCREEN Verotoxin (r-Biopharm), diferencia Stx₁/Stx₂
4. Shiga Toxin Quik Chek (TechLab), diferencia Stx₁/Stx₂

También está la aglutinación reversa pasiva (VTEC Screen/RPLA (Denka Seiken), diferencia Stx₁/Stx₂) recomendada por el CDC. Finalmente, están todos los ensayos basados en ADN, fundamentalmente PCR múltiples de punto final, PCR convencionales, o PCR en tiempo real, con sistemas abiertos por paneles o sistemas cerrados, automatizados, que son muy buenos porque uno tiene muestra – resultado en forma muy rápida.

A nivel mundial hay una tendencia a que los Laboratorios de Referencia realicen la secuenciación del genoma completo (SGC) aplicada a la vigilancia de casos esporádicos y brotes. En este sentido, el LNR de Argentina está participando de un Bioproyecto (Bioproject *E. coli* Argentina PRJNA282762 Proyecto Piloto Genome TRAKR) dirigido por la FDA (Food and Drug Administration), para realizar la vigilancia de patógenos de transmisión alimentaria.

Además, el LNR ha incorporado la evaluación de la respuesta inmune a lipopolisacáridos utilizando glicoproteínas recombinantes serogrupo-específicas como antígeno de captura, en un ELISA indirecto. Este desarrollo es parte de un Proyecto FONARSEC, que se está ejecutando entre el Instituto de Biotecnología de UNSAM, INMUNOVA y ANLIS-Malbrán, en el cual ya se han desarrollado y están en uso las glicoproteínas recombinantes para O157, O145 y O121 (serogrupos que representan más del 90% de las infecciones de Argentina), y ya están desarrolladas y en proceso de validación para otras glicoproteínas recombinantes de serogrupos que son importantes en Argentina (O26, O103 y O111). Para estas glicoproteínas se han realizado pruebas de concepto y desempeño. Son muy buenas, porque no tienen reactividad cruzada, y permiten evaluar una respuesta inmune temprana a IgM/IgG, con buena sensibilidad y especificidad.

En el LNR se utilizan 3 criterios diagnósticos para establecer la infección por STEC: (i) detección de toxina Shiga libre en materia fecal; (ii) detección, aislamiento y caracterización de la bacteria, utilizando una PCR múltiple como técnica de tamizaje, que permite tener un resultado muy rápido el cual se informa al médico al día siguiente, y que permite saber si ese niño está infectado con una bacteria portadora de Stx1 y/o Stx2 y además si es O157 o no-O157. Se realiza el aislamiento, tipificación, y además la subtipificación por electroforesis de campo pulsado (PFGE) para vigilar los clones que están circulando en Argentina; y (iii) la detección de anticuerpos anti-LPS serogrupos-específico.

Respecto a los serogrupos STEC prevalentes en Argentina, en el período 2011-2015, y el año 2016, hubo 3 serogrupos (O157, O145 y O121) importantes, y que representan el 90% de las infecciones que se registran en nuestro país, por ello se hace la evaluación de la respuesta inmune a estos serogrupos en una primera etapa. Este perfil se repite en el 2017 con un ligero aumento de los casos asociados a O145.

Desde finales del 2014, la incorporación de la evaluación de la respuesta inmune con detección de anticuerpos anti-LPS, ha permitido aumentar la positividad de los casos que llegan al LNR a casi el 70%. Además, en la actualidad hay una mayor demanda de la realización de este ensayo porque permite diferenciar el SUHt del SUHa. No sé si ustedes saben, pero los casos de SUH atípico tienen un tratamiento distinto, y en estos momentos se está utilizando el Eculizumab®, anticuerpo monoclonal humanizado que inhibe la activación del C5, el cual es muy costoso. Por lo tanto, hay una necesidad de contar con un muy buen diagnóstico diferencial entre SUHt y SUHa.

En la evaluación de la respuesta inmune, la frecuencia de serogrupos que se observa en los anticuerpos anti-LPS es similar a la de las cepas STEC, O157 sigue siendo el más importante. Seguido por O145 y en menor frecuencia O121. El LNR está realizando con algunos hospitales un seguimiento para ver cómo es la evolución de la respuesta inmune. Hasta el presente se observa que la respuesta inmune a IgM/IgG es muy temprana, y esta respuesta continúa por casi un año.

Otro hecho importante en Argentina es el perfil genético que tienen las cepas STEC circulantes. Entre las cepas O157 asociadas a SUH, en el período 2011-2015, el 88% de las mismas tenían el genotipo *stx_{2a}/stx_{2c}*, el genotipo tóxico más potente que se conoce. Es decir las cepas que circulan en Argentina producen las toxinas con mayor actividad citotóxica. En el año 2016 se produjo una ligera disminución de este perfil porque apareció un nuevo clon, sobre todo en las provincias del sur de Argentina, que son solamente productoras de toxina Stx2a. Este nuevo clon sigue circulando en Argentina en 2017. Respecto a las cepas no-O157, también portan el genotipo *stx_{2a}* que es el más potente, y fundamentalmente asociado a casos de SUH y enfermedad severa en todo el mundo. Estas cepas prevalentes también portan el factor de adherencia intestinal (intimina) y la enterohemolisina (EHEC-Hly).

En el año 2016, el LNR recibió muestras de 283 de los 369 casos de SUH notificados en el país, y se pudo confirmar la asociación con la infección por STEC en casi el 70% de los mismos, lo que es muy interesante ya que anteriormente la asociación a la infección por STEC estaba en el orden del 35%.

Otro tema que es muy importante en Argentina es el de los brotes, ya que no se registran grandes brotes, como ocurre en otras partes del mundo, pero si se producen brotes que llamamos “brotes difusos o “brotes familiares”. Tal como dijo la Dra. Exeni, en una familia se infectan varios, pero se enferma el que puede enfermarse, y hace SUH el que puede hacer SUH. En el LNR mediante la vigilancia molecular por electroforesis de campo pulsado (PFGE), vigilamos todas las bacterias que circulan en Argentina. Hay una Base de Datos Nacional (BDN) desde 1988, hay en realidad una BDN

que corresponde a STEC O157 y otras bases que corresponden a serogrupos no-O157, como parte de la Red PulseNet Internacional.

Esta vigilancia es muy importante porque permite ir monitoreando que patrones nuevos están emergiendo en Argentina. Es una vigilancia en tiempo real de los patrones, tanto en enfermedad humana como también en animales y en alimentos para ver si aparecen cepas nuevas. Mediante esta vigilancia se han podido identificar brotes asociados a STEC. En el periodo 2011-2016 se produjeron 57 brotes, 36 asociados a O157 y 21 a no-O157. Hubo 40 casos de SUH, con dos casos fallecidos, 25 casos de diarrea sanguinolenta, 14 casos de diarrea acuosa no complicada y 62 portadores asintomáticos. Ante un caso de SUH la recomendación es que se estudie todo el grupo familiar. Si el niño concurre a un jardín maternal, a un jardín de infantes o a una escuela se estudian los contactos institucionales, y es así como hemos podido detectar brotes que epidemiológicamente no eran evidentes para el sistema de vigilancia.

Lo que tenemos que tener en cuenta es la importancia que tiene hacer esta vigilancia y el seguimiento de excreción de los niños infectados. Es que la bacteria se sigue excretando una vez que la persona se ha recuperado. Hubo niños en los cuales hemos hecho el seguimiento y hemos detectado la bacteria por períodos tan largos como un mes, 40 días o más. En el adulto, la portación es un poco más corta, alrededor de una semana. Pero es muy importante tomar la precaución de que un niño en el cual se detecta STEC no reingrese a un jardín maternal o jardín de infantes hasta no tener 2 coprocultivos negativos en un periodo de 48-72 horas. Este grupo bacteriano tiene una dosis infectiva muy baja: menos de 100 bacterias producen la enfermedad. Entonces se imaginan que un niño que sigue excretando STEC y que vuelve a una institución de cuidado diario, donde las condiciones higiénicas pueden no cumplirse estrictamente, es algo de riesgo. A partir de lo que pasó en Alemania en 2011 con la emergencia del híbrido EAEC/STEC han surgido otros híbridos, otras asociaciones, otros patotipos que también adquieren la toxina Shiga, por lo tanto no está limitado solamente al *E. coli* enteroagregativo. En el brote de Alemania se registraron 881 casos de SUH en un periodo de un mes. Alemania tiene en promedio 35 casos de SUH al año. Imagínense en un mes más de 800 casos. Eclosionó todo el sistema de salud. Eran fundamentalmente adultos, más del 88% personas mayores de 20 años, la mayoría de sexo femenino, con alta mortalidad. Fundamentalmente, los afectados se morían por las complicaciones neurológicas. Hubo complicaciones neurológicas severas en el 50% de los casos. El probable vehículo fueron semillas germinadas de FENOGRECO. En otra oportunidad con más tiempo les contaré como se hizo la investigación epidemiológica que llevó a implicar a las semillas de Fenogreco como agente causal de la infección. Fue muy interesante como se llegó a esa conclusión.

Pero qué es esta bacteria? Esta bacteria nueva es un *E. coli* enteroagregativo, otro patotipo de *E. coli* diarraigénico que generalmente produce diarreas persistentes. En Argentina, tenemos muchos casos de diarrea por EAEC. Este EAEC con todos los factores de virulencia adquirió por transferencia horizontal el fago que codifica para la toxina Shiga que se insertó en el cromosoma de la bacteria. Además, adquirió un plásmido de resistencia a las betalactamasas de espectro extendido cosa inusual en las STEC. Los STEC son muy sensibles a todos los antibióticos. Y qué importancia tiene para nosotros? En Argentina, en enero de 2015 se atendió a un niño de 7 años, 8 meses en Puerto Madryn que concurrió a una consulta médica. El médico que lo atendió consideró que no tenía diarrea porque presentaba deposiciones blandas pero firmes con sangre alrededor de la materia fecal. Tenía fiebre, vómitos, cefalea intensa, irritabilidad. Le dieron ibuprofeno y lo

mandaron a la casa. El niño volvió al día siguiente a la consulta, con ictericia, oliguria. Estuvo internado 11 días, de los cuales 7 días estuvo en la UTI y se diagnosticó como un SUH atípico porque el pediatra consideró que no había tenido diarrea. Mandaron muestras de materia fecal al LNR. La primera muestra correspondió al día de la internación. Se aisló una bacteria STEC, que producía Stx2a y no tenía el factor de adherencia intestinal *eae* que tienen las STEC O157, pero que en ese momento no se pudo determinar el serogrupo. Es decir, era un STEC no-O157. Además, se detectó Stx2 libre en la materia fecal (Stx2MF). Se toma una segunda muestra a los 61 días y, el cultivo era puro de esa bacteria. También tenía Stx2MF. Durante el seguimiento, a los 115 días, el niño ya recuperado, seguía excretando la bacteria. Nosotros, en el laboratorio nos sorprendimos, porque teníamos niños con excreciones prolongadas de 30, 40 días, pero nunca de más de 100 días. Y nos preguntamos ¿no será una agregativa? Se hizo la PCR correspondiente y se detectó el gen *aggR*, que regula todos los factores de virulencia en las cepas EAEC. Por lo tanto era un *E. coli* enteroagregativo que producía toxina Shiga 2 y pensamos: ¿no tendremos otras cepas en Argentina y nunca lo supimos? Entonces lo que se hizo fue un estudio retrospectivo de nuestra colección de cepas que producían Stx2a, pero no tenían el factor *eae*. Y estudiamos 34 cepas del periodo 99-2007 y 300 del periodo 2008-2015. Y encontramos 19 cepas desde el año 2005. Todas eran EAEC/STEC O59:NM que tenían el flagelo *fliCH19*.

Fue muy interesante porque si ustedes observan en la diapositiva son niños, de todas las edades, pero hay niños y adolescentes muy grandes, de 13, 15, 18 años. Es decir, fuera de lo que vemos habitualmente. Uno de los casos correspondió a una niña de 92 meses atendida en Entre Ríos que se recuperó. Cuando se hizo la investigación epidemiológica, en el interrogatorio surge que la familia había asistido a un asado y otra hermanita también había tenido SUH en la misma fecha y falleció en 24 horas.

Esta emergencia crea otra problemática para Argentina, no solo tenemos que tamizar para la toxina Shiga, sino hay que tamizar para todos los factores de virulencia para detectar estos nuevos patotipos. Nosotros en nuestro algoritmo diagnóstico hemos incluido además del tamizaje de Stx la de factores de virulencia de los distintos patotipos de *E. coli* para encontrar estas nuevas cepas híbridas.

Hemos incorporado y estamos haciendo la secuenciación de genoma completo. Hay toda una tendencia a nivel mundial de incorporar esta metodología en los laboratorios de referencia para tener un diagnóstico completo, rápido, de la cepa involucrada, fundamentalmente en brotes.

Se presenta una comparación del tiempo necesario para la identificación completa con las pruebas convencionales y la SGC. Si bien la secuenciación es una técnica fácil y rápida, lo más complicado es el análisis con herramientas de bioinformática.

En el LNR estamos participando del BioProyect dirigido por la FDA para monitorear las cepas de *Salmonella*, *Listeria* y STEC, que están asociadas a las enfermedades transmitidas por alimentos. Nuestra primera experiencia fue con 16 cepas de *E. coli* O157 de las cuales teníamos la información de las características por los ensayos tradicionales.

Se muestran ejemplos, tenemos una cepa STEC O157 aislada de un caso de SUH, y se la compara con la cepa aislada del alimento implicado. Otro caso de SUH muy interesante, es la comparación entre la cepa humana y las aisladas de las hamburguesas implicadas. El Dr. Eszptejn del laboratorio de alimentos del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires aisló y envió al LNR varias cepas de *E. coli* O157. En la vigilancia molecular por PFGE, una de esas cepas estaba relacionada genéticamente a la cepa humana, pero en la hamburguesa había otras cepas de O157, también productoras de toxina Shiga, pero que no eran idénticas a la que se había encontrado en el paciente.

Infectados en forma sintomática o asintomática. Tenemos que tratar de minimizar todo lo que es la transmisión secundaria y la aparición de brotes.

El aumento de la positividad de los casos de SUH asociados a STEC del 35 al 69% incorporando la detección de anticuerpos a-LPS es muy importante, y además aporta al diagnóstico diferencial entre SUH típico y SUH atípico, porque el tratamiento es absolutamente distinto, muy costoso para el sistema de salud. Cuando las obras sociales no pueden hacerse cargo es el Estado el que asume esa responsabilidad, por lo tanto es esencial el diagnóstico diferencial.

Algo que es fundamental, a pesar de que se puede disponer de técnicas de tamizaje con buena sensibilidad, y especificidad, el aislamiento es el diagnóstico definitivo. Para saber qué cepas circulan en Argentina, es fundamental el aislamiento, y después de la emergencia de nuevos patotipos como el híbrido EAEC/STEC existe un nuevo desafío para todos los laboratorios, de salud pública, de sanidad animal, y de alimentos. Tenemos que saber cuál es el reservorio, cómo se transmiten estas nuevas cepas híbridas. La inclusión de la secuenciación de genoma completo incorpora una nueva herramienta en el diagnóstico, y esperamos que sea muy beneficiosa en un futuro cercano. Muchas gracias.

“Prevención del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH)”

Dra. María Gracia Caletti

Consultora (h) H. Garrahan

Voy a hablar de Prevención del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH)- Cuando uno habla de SUH no puede dejar de recordar al Dr. Gianantonio y a la Dra. Vitacco y su equipo. Lo que es importante son los aportes que ellos hicieron al conocimiento del SUH. Ellos en relación al SUH describieron la enfermedad en nuestro país por primera vez y a partir del año 62 hicieron las primeras publicaciones relacionadas a la misma en el Journal of Pediatric. En la atención de pacientes con este Síndrome, fueron los primeros que introdujeron la diálisis intermitente como tratamiento en la etapa aguda de la enfermedad produciendo una disminución importantísima de la mortalidad. Del 50% de mortalidad que tenía esta enfermedad en la etapa aguda lograron disminuirla al 10%. Describieron la histología de la enfermedad en la etapa aguda y en la etapa crónica junto con el Dr. Gallo que fue el patólogo del grupo. Describieron también las lesiones extrarenales del SUH. Es decir que incorporaron aspectos fundamentales al conocimiento de la enfermedad.

Cuál es la situación actual del SUH en nuestro país. Se sabe que es la primera causa de insuficiencia renal aguda en niños menores de 5 años y es la segunda causa de trasplante renal en edad pediátrica en nuestro país. Comparte con el Síndrome Nefrótico corticorresistente cuya histología es una Hialinosis Segmentaria y Focal, la segunda causa de trasplante renal en nuestro medio. La mortalidad varía, de acuerdo a la complejidad del paciente y la institución donde se interna, entre 2 y 4 %. La incidencia por año es de 300 a 400 casos por año.

Evolución y pronóstico. El 95% de los pacientes se recupera de la etapa aguda; 95-96% depende de los que mueren que dijimos que eran entre un 2 y 4%. Aquí la mortalidad en un grupo más acotado de chicos fue del 3%. Se recuperan totalmente el 62%. Quedan sin ningún signo de daño renal. Sin proteinuria ni hipertensión, que son los signos y síntomas más importantes de la evolución a la cronicidad. Llegan a la edad adulta con restitución completa de la función renal. El 18% de los pacientes, quedan en la edad adulta, con una función renal normal pero esta, se acompaña de distintos grados de proteinuria y/o hipertensión arterial. Otro 16% de los pacientes quedan con disminuciones variables de la función renal, necesitando tratamientos sustitutivos de la función renal como la hemodiálisis, y la diálisis peritoneal crónica ambulatoria (DPCA). Un 3% evolucionan en distintos períodos de tiempo a la insuficiencia renal crónica terminal debiendo ser transplantados.

Los trabajos que desarrollamos de la enfermedad, desde Salud Pública, estuvieron dirigidos fundamentalmente a su prevención. Estudiamos en el año 2002 – 2003 los **costos del tratamiento de la enfermedad en todas sus etapas evolutivas: aguda y crónica**. En el 2001, el Ministerio de Salud, a través del Programa Vigía, dio subsidios para becas sobre todo para estudios de costos de casos nuevos; de tuberculosis, de SIDA y ese año había incluido estudio de costos del SUH. En el marco de ese Programa, desarrollamos el trabajo de análisis de los costos del tratamiento del SUH. Al término de este, a los dos años estudiamos los costos de la prevención del SUH y por último en el 2007 hicimos un estudio de investigación - acción en terreno en el marco del Programa “Municipios saludables”.

El primer trabajo que se llamó: “Evaluación de costos directos e indirectos del tratamiento del Síndrome Urémico Hemolítico en sus distintas etapas evolutivas” lo constituimos: el Lic. Daniel Petetta, sociólogo del INDEC, Marisa Jaitt y Silvia Casaliba, dos médicas pediatras con Residencia completa y Jefatura de residentes en el Hospital Garrahan y el Contador Alberto Gimenez Director del Departamento de Costos del Hospital Garrahan.

Evidentemente, el Hospital Garrahan, es uno de los pocos hospitales del mundo en el que se podría haber hecho este trabajo. Primero porque la Argentina es la que tiene la mayor casuística de SUH del mundo; en nuestro país, más del 40% del ganado es portador sano de *E Coli* y además en el Hospital Garrahan, donde se hicieron los trabajos, los costos de los tratamientos están modulados y se conocen exactamente sus valores. Se conoce el costo de la hora médica, de los materiales y de todos los procedimientos y estudios que se llevan a cabo para el tratamiento de los pacientes agudos y crónicos que allí se atiende.

El objetivo del trabajo fue: estimar los costos de atención y prevención del SUH, a fin de contribuir al establecimiento de prioridades en la definición de políticas y asignación de recursos en salud. Y por otra parte, contar con información que permitiera hacer una estimación de costo-beneficio de la prevención. Se incluyeron para su análisis, 525 pacientes ingresados en la base de datos que teníamos en ese momento en el hospital. De esos 525 hubo que excluir 30 porque faltaban datos de la historia clínica. Se incluyeron, de acuerdo con el sociólogo, todos los pacientes cuyo N fuera bajo.

Entonces dentro del grupo quedaron 48 trasplantados, 15 con insuficiencia renal crónica, 59 provenientes del interior del país. De los 373 agudos que nos quedaron se hizo una aleatorización, de cada dos, elegíamos uno, quedando la muestra a evaluar compuesta por 213 pacientes.

Nosotros averiguamos los costos de acuerdo a lo que presentaban durante la internación. Analizamos toda la historia clínica. Esto se llama diagnóstico por proceso y entonces multiplicamos el número de veces que estos pacientes presentaban cada proceso y el costo de cada uno. Los costos directos son los costos de tratamiento, de las cosas que necesita el paciente, pero también investigamos los costos indirectos que son los costos lucro cesante, del viaje que hace la familia para traer un chico al hospital pos-trasplantado. Bueno todo eso tuvo en cuenta. Entonces los costos indirectos, nosotros hicimos reuniones periódicas del equipo de trabajo, decidimos hacer una encuesta telefónica, analizamos cada historia clínica, obtuvimos los lugares de procedencia, teléfono y dirección, y nos manejamos con los resultados de una encuesta telefónica cuyos resultados volcamos a una planilla electrónica. Aquí van a ver que están graficados el N de pacientes, número de casos, los costos. Cuando en el año 2016 hicimos el cálculo del costo era \$ 1.202.296 x paciente x año. Y el acumulado a fin de 2016 hubo 4482 pacientes significó una erogación para el estado \$ **1.792.656.217** cuando lo transformamos en valor dólar este costo significaba 82.068 dólares/paciente por año. El costo acumulado en dólares fue 102.437.498 desde el año 2004 que se empezaron a contar estos pacientes, cuando empezó el trabajo hasta el 2016. Sabiendo los costos del tratamiento lo que a uno le surge siguiendo el aforismo es que la prevención debe ser mucho más económica.

Entonces a los dos años nos presentamos nuevamente a un proyecto Vigía con el título “Evaluación de la eficacia, costos y desventajas de acciones preventivas del Síndrome Urémico Hemolítico”. Formaba parte yo que lo pensé y lo escribí, Javier Vera Ocampo, que un comunicador visual que es el hizo toda la parte gráfica, Marisa Jaitt, la misma pediatra que siguió con nosotros en el proyecto, Eduardo Acevedo, un economista que era hasta el año pasado el jefe del departamento de costo del Hospital de Pediatría Prof. DR. Juan P. Garrahan.

Entonces, nosotros para hacer este proyecto reunimos en el Hospital Garrahan en una jornada de trabajo a todos los profesionales dedicados a estudiar los niños con Síndrome Urémico Hemolítico y la enfermedad en sí. Durante la mañana, fueron las presentaciones de los distintos grupos de trabajo, y por la tarde, con la consigna “si Ud. fuera ministro de salud que implementaría para solucionar el tema de SUH” intercambiamos opiniones, proyectos e ideas para elaborar una propuesta concluyente y posible de implementar.

De este análisis surgió el diseño de la cadena epidemiológica de la enfermedad, que luego el comunicador visual, la ejecutó con el nombre de: Infografía “de la vaca a la boca”, que es la descripción de la epidemiología de la enfermedad. Ustedes ven que, sucintamente se los voy a mostrar, todo lo que está pintado de rosa está contaminado por el *coli*, lo que está pintado de turquesa está libre de *coli*. Y al final de la cadena está la boca del niño. Aquí están graficadas las formas de contagio y las vías, a través de la leche, a través del agua, a través de la carne, ya sea, del animal criado libremente en el campo, o formando parte de un feedlot. Y por último una nueva forma, que se ha descrito últimamente, porque ha habido casos de chicos que contrajeron la enfermedad en lo que se llaman aguas recreacionales (piletas de natación insuficientemente cloradas). En el diseño de la cadena sobresalen unos rombos negros, son los lugares en los que uno pudiendo intervenir, solucionaría el problema y transformando el alimento con alto poder infectivo en (hierva la leche, se lavan las manos, hierva el agua, se lava las manos después de ir al baño, tratar de que la comida no esté contaminada) un alimento limpio que llega la boca del niño.

De esta reunión y del análisis de la Infografía surgieron, como puntos clave los posibles puntos de intervención que fueron 4. **1° a nivel del ganado en pie** antes que llegue al frigorífico, que corresponde institucionalmente al SENASA, **2° del frigorífico a las carnicerías** que también corresponde al SENASA, **3° de**

las carnicerías al consumidor corresponde al Instituto Nacional de Alimentos (INAL), y por último **4° a nivel del consumidor** que desde se compra, se traslada, se consume el alimento) Entonces aquí escrito los puntos que se podían intervenir en la cadena epidemiológica. Para ello dijimos que las acciones necesarias para obtener un alimento sano debían constituir una **política de estado**. Una **política de estado** es aquellas en las que el Estado invierte: a nivel del ganado debe hacer una descripción y registro del ganado infectado, crear laboratorios equipados regionales, denunciar el caso en forma obligatoria, el SENASA debería aplicar la norma Haccp en forma obligatoria, porque en nuestro país para la faena y por lo tanto la comercialización y el consumo, existe todavía, lo que se llama “doble standard”: el Haccp que es una sigla que implica detección e intervención en los puntos críticos de control y las BPM “las buenas prácticas de manufacturas”, que son las tienen la mayoría frigoríficos, encargadas de hacer cumplir la normas de control e higiene de la carne. CAA (Código Alimentario Argentino). En el tercer punto de la cadena, a nivel de supermercados, el INAL (Instituto Nacional de Alimentos) es el responsable de hacer cumplir el Código Alimentario Argentino (CAA) en la preparación y venta de alimentos; depende del Ministerio de Salud. Por último la comunidad interviene en la compra, el transporte, el almacenamiento, la elaboración y el consumo de los alimentos y podría ser educada a través de “**campañas de prevención**”.

Entonces elegimos el grupo, y fundamentalmente orientado por el comunicador visual determinamos que la “población blanco” eran los niños de 0 a 5 años. Los “llamadores de campaña” son las imágenes y gráficas que se utilizan para la propaganda y la prevención. Determinamos que los **intermediarios** eran los padres y los **agentes** intervinientes, los pediatras, los enfermeros, los trabajadores sociales, los maestros y todo personal que tuviera en su actividad, cercanía con los niños. El material diseñado expresamente, consiste en: un zócalo, que consiste en una pieza con formato de libreta, de 10cm, que se despliega, y puede ser utilizada por el pediatra extendiéndola delante de la familia para explicar su contenido, en el diseño se ve y lee con detalle en que consiste la enfermedad, como se contagia y como se previene, con cada uno de los alimentos. Tomando como símbolo de la bacteria *coli* este círculo rojo rodeado de negro. Tambiéndiseñó otra pieza, que nosotros llamamos **afichetas** que tiene, siempre como símbolo, este círculo sobre la carne y se lee: “**si la carne esta rosada no se come**”. Acá explica en que consiste la enfermedad, como se contamina y como se previene. Dice “**bien cocido bien comido**” haciendo alusión a la necesidad de cocinar bien la carne a temperaturas mayores de 75°C. Otro afiche que usamos es “**mami las manos**” que muestra el símbolo de la bacteria. Si uno va al baño se tiene que lavar con agua y jabón. Y dice “**la salud de tu hijo está en tus manos lávalas con agua y jabón**”. Esta es una lámina que se diseñó para poner en los jardines de infantes, en los lugares donde habitualmente se reúnen los padres, o en la sala de espera de los consultorios médicos.

Nosotros averiguamos los costos de este material que habíamos fabricado y dónde lo podíamos utilizar. Entonces para ejecutar el programa vimos cuántos pediatras tenía la Sociedad Argentina de Pediatría, los centros pediátricos dependientes del Min. de Salud, cuántos comedores escolares había, cuántos jardines de educación inicial, maternales, estatales y privados, en dónde podíamos desarrollar estos programas.

Así llegamos al tema **de los costos**. El costo de tratamiento sabíamos que era de U\$A 82.000 x paciente x año y el costo de la prevención actualizado se calculó en U\$A 473.476 dólares para una población calculada de 1.400.000 niños. Quiere decir que con el costo de tratamiento de 5.7 pacientes por año se paga el programa de prevención para 1.400.000 niños.

Llegamos a la conclusión que el SUH es una enfermedad prevalente, prevenible cuya atención tanto en la fase aguda como crónica requiere tratamiento especializado de alta complejidad. Conocemos los costos de atención. Conocemos el agente etiológico y su epidemiología y dicho conocimiento nos habilita a la realización de dos programas, primero a nivel de Salud Pública, programas de prevención y a nivel clínico los posibles programas de tratamiento con los probióticos.

Nosotros nos presentamos, en el año 2007, a otro proyecto del programa Salud Investiga que se llamó Prevención del Síndrome Urémico Hemolítico en dos Municipios de la Provincia de Buenos Aires- **Programa de investigación – acción basado en Educación Comunitaria en terreno**”. En ese momento, el Min. De Salud tenía un programa que creo que todavía lo tiene llamado de “con municipios saludables”. Llamamos Municipios Saludables a aquellos que de alguna manera aceptan la normativa del ministerio y se encargan de que se cumpla. Entonces el mismo ministerio cuando nos aprobó este proyecto nos indicó dos municipios en los

cuales podíamos ejecutarlo: el Municipio de Alte. Brown, que en ese momento tenía 550.000 habitantes, el de Ituzaingó que tenía 160.000. El Dr. en Veterinaria, integrante del Programa, Marcelo Da Rocha, participo de la ejecución del mismo. Los integrantes del proyecto fuimos: María Gracia Caletti. Javier Vera Ocampo el comunicador – visual, la Lic. Clarisa, Jefa de Clínica del Servicio de alimentación del H. Garrahan, Marcelo Da Rocha, Dr. en veterinaria, actual presidente de LUSO, y dos trabajadores de los dos municipios; fueron, dos pediatras y dos trabajadores sociales. La Dra. Tapponier y la Lic. Nodar Maria Cecilia y la Dra. Martinez María Valeria y el Dr. Horacio Castellano, trabajador social de Ituzaingó.

El objetivo de este programa fue: **“implementar un programa de educación a la comunidad en prevención del SUH en dos municipios de diferente complejidad y elaborar lineamientos generales de implementación para poder replicarlos en otros programas y otras jurisdicciones”**.

Qué hicimos nosotros. Encuestas de hábitos alimentarios, talleres de capacitación, con el material gráfico que habíamos elaborado en el programa anterior, entonces nos dedicamos a hacer los **Talleres** con maestras y profesores de educación física, trabajadores sociales, manzaneras, pediatras, comadres, cocineros y madres. Se hicieron en total 27 talleres. Capacitamos 610 personas. Los contenidos, fueron los que seguimos haciendo ahora en los talleres del Hosp. Garrahan desde 2009, con la presentación de la enfermedad, los datos epidemiológicos y con las causas conocidas de trasmisión y la forma de prevención, les enseñamos la correcta manipulación de los alimentos en las cinco (5) etapas fundamentales para obtener la inocuidad de los mismos: la compra, el transporte, el almacenamiento, la preparación y la ingesta de un alimento saludable.

Cuáles fueron los resultados esperados y sus implicancias. Tuvimos una información valiosa sobre la forma de implementar la ejecución, un proyecto en terreno articulando los recursos locales. Una comunidad municipal con conocimiento como para prevenir el SUH. Un grupo de actores sociales capacitador, un equipo de conducción con experiencia en terreno, un documento con lineamiento para la replicación del proyecto porque estaba hecho el módulo en otros municipios de cualquier otro lugar y complejidad. Eso era con respecto a Salud Publica.

Lo que respecta al área clínica nosotros estamos desde entonces y actualmente con un estudio de prevención del SUH y otras complicaciones en la diarrea sanguinolenta. Para eso elaboramos un Proyecto que introduce los el uso de probióticos como tratamiento en pacientes con diarrea sanguinolenta (DS). El título es: **“Efecto del probiótico *Sacharomyces Boulardii* en la evolución de las diarreas sanguinolentas a gérmenes comunes en niños. Un estudio multicéntrico aleatorizados, doble ciego y controlado”**.

El *Sacharomyces Boulardii* actua por por competencia en la pared intestinal del ganado vacuno, con la *E Coli* entero hemorrágica. Impide la penetración de la toxina en la mucosa intestinal, reduce drásticamente el desarrollo de la cadena fisiopatogénica que desemboca en el SUH, ejerce una acción trófica y promueve la respuesta inmune. El objetivo del proyecto es determinar si el *Sacharomyces Boulardii* administrándolo tempranamente en niños menores de 5 años, puede modificar el número y la frecuencia de las deposiciones y las complicaciones en pacientes con diarreas sanguinolentas con y sin cultivos positivos para *E Coli* enterohemorrágica O157-H7 y no O157-H7, Shigella, Salmonella, Campylobacter, rotavirus y adenovirus. Nosotros planteamos, estimando el tamaño muestral, una primera etapa con 200 pacientes y una segunda etapa con 1150 pacientes. La primera etapa nos permitiría, con 200 pacientes, conocer la duración de la diarrea en días, el número de deposiciones por día, las complicaciones y el tipo de complicación, como acidosis, deshidratación, número de internaciones, etc. En una segunda etapa, en un Proyecto multicéntrico ampliado con 1150 pacientes, nos permitiría conocer además, los distintos comportamientos, según el germen causal.



ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Sala de conferencias: “Pbro. Antonio Sáenz”**

163° JORNADA CIENTÍFICA

“OBESIDAD, NUTRICIÓN Y SALUD”

Coordinadoras

**Acad. Dra. María Cristina Añón & Acad. Dra. María Luz Pita Martín de
Portela**

**Buenos Aires – Argentina
7 de Noviembre de 2017**

CONFERENCIAS

“OBESIDAD: CONTROVERSIAS Y DESAFÍOS”

Dra. Ana Cappelletti

Médica. Magister en efectividad clínica (UBA). Universidad Favaloro. E- mail: anacappelletti@yahoo.com.ar

La obesidad representa una epidemia global. Afecta a la mayoría de los países del mundo y, dentro de cada uno de ellos, aunque de modo diferente, a todos sus sectores sociales. Incluye a mujeres y hombres infanto-juveniles y adultos. Se trata de una enfermedad que ha sido ignorada por los gobiernos y los sistemas de salud durante décadas, y subestimada hasta la actualidad por la comunidad médica que en su mayoría continúa considerándola un mero desorden estético o de fuerza de voluntad controlable. Es así que las personas que padecen obesidad continúan aún siendo víctimas de ese maltrato. La estigmatización de la obesidad por la sociedad suma la propia culpabilidad de quienes la padecen. Eso los lleva a someterse a tratamientos mágicos inadecuados, la mayoría de los cuales carece de evidencia de eficacia en el largo plazo. Mientras muchas personas no asumen a la obesidad como una enfermedad; otras, sin embargo, se ven y se sienten obesas sin realmente serlo, en relación con la mirada social hacia las personas con sobrepeso o quienes simplemente no encajan en el modelo aceptado de delgadez.

La obesidad y sus comorbilidades son patologías de etiología compleja. A un nivel de análisis simple la obesidad está causada por un balance energético positivo: más ingreso que gasto calórico. Sin embargo, muchos otros factores determinan la pandemia.

El cambio en los patrones alimentarios y el sedentarismo no alcanzan para comprender el crecimiento alarmante de la obesidad en el mundo. Los esfuerzos por entender los determinantes de esta situación llevaron a la observación y el estudio de múltiples asociaciones. Si bien es clara la influencia del ambiente como facilitador de la expresión génica, aún no es posible establecer relaciones causales en el estricto marco de la evidencia científica. La epigenética comienza a arrojar luz sobre esta problemática a la vez que la complejiza. Una estrategia que impresiona de alto impacto sanitario es la intervención tendiente a proteger a las personas desde el vientre materno, lo que implica la promoción de controles de salud y de peso de las mujeres en edad fértil y de las embarazadas en particular.

El aumento explosivo de la pandemia de obesidad hasta ahora imparable, nos señala que hicimos las cosas mal.

Tratamos enfermedades prevenibles y para combatir las hasta caemos en la generación de trampas fisiopatológicas que nos llevan hasta a la iatrogenia (planes de corto plazo o dietas extremas)

El mayor desafío profesional común a todas las enfermedades es el correcto diagnóstico en busca del mejor tratamiento. En el caso de una patología crónica como la obesidad, la complejidad es mucho mayor, dado que aunque todas involucran un exceso de grasa corporal, deberíamos considerar el componente psicológico y afectivo de los pacientes obesos para proponer tratamientos más adecuados y obtener resultados optimizados.

Es tiempo de un compromiso particular para los agentes de salud, pero también resulta indispensable el compromiso de toda la sociedad, los gobiernos y la industria. La información es fundamental para la toma de decisiones. Los nuevos conocimientos solo cobran relevancia si inducen acciones para el beneficio de las personas. Lo inadmisibile es no actuar.

Sección I: Obesidad en niños y adolescentes– Moderador: Acad. Silvia Hajos

“Alteraciones cardiometabólicas tempranas en obesidad infantil”

Dra. Carmen Mazza

Médica pediatra. Ex Jefa del Servicio de Nutrición y Metabolismo, Hospital Garrahan. Investigadora principal del Consejo de Investigación en Salud y Directora de la Carrera de Especialista de Nutrición Pediátrica, sede Garrahan. Actualmente miembro del Comité coordinador del “Estudio Teens”, participante del “Proyecto Sweet” y consultora del Servicio de Nutrición y Diabetes del Hospital Garrahan. E-mail: carmazza@gmail.com

“ABORDAJE CLÍNICO DE LA OBESIDAD INFANTIL”

Dra. Marisa Laura Armeno

Médica Pediatra. Especialista en Nutrición infantil (UBA) Médica Planta permanente del Servicio Nutrición del Hospital Garrahan (CABA). Médica Consultora Nutrición Infantil. Servicio Pediatría, Hospital Alemán. E-mail: mlarmeno@gmail.com

La Obesidad Infantil tiene una prevalencia global 17% (12.7 millones). Como sabemos, el cuidado y manejo clínico de niños y adolescentes con obesidad es un reto. Las recomendaciones clínicas actuales han sido siempre enfocadas en guías de diagnóstico y estrategias de manejo terapéutico.

De todas formas, el examen físico de un niño o adolescente con obesidad puede proveer a los pediatras y clínicos información adicional muy valiosa para tomar decisiones de manejo clínico.

Durante esta sesión apuntaremos a focalizarnos en los hallazgos clínicos específicos de los niños y adolescentes con obesidad, estableciendo la prevalencia de los mismos en la edad pediátrica, discutiendo la importancia y la relevancia del hallazgo, describiendo la severidad de los mismos y la necesidad de evaluación adicional.

El objetivo principal será el de realzar la importancia de conducir un examen físico dirigido durante la consulta pediátrica en pacientes con sobrepeso y obesidad y dar pautas de manejo de las comorbilidades encontradas.

“MICROBIOTA Y OBESIDAD”

Dra. Carmen Toca

Médica. Especialista en Gastroenterología pediátrica, Hospital Nacional Alejandro Posadas. Directora de la carrera de Gastroenterología Infantil (UBA). Vocal Argentina de la Sociedad Latinoamericana de Gastroenterología Hepatología y Nutrición Pediátrica. E-mail: mtoca@intramed.net

La superficie intestinal y la luz de la cavidad gastrointestinal, en el hombre y los animales, está poblada por un complejo mixto de microorganismos no patógenos. Estos constituyen la microbiota intestinal (MI), compuesta por más de 1000 especies, con un genoma (microbioma) 100 veces mayor que el humano y con una función metabólica mayor que la del hígado. Estos microorganismos cumplen una función esencial para la salud del individuo, siendo relevantes para la función inmunológica, el metabolismo, la neurodesarrollo y la nutrición del huésped.

La microbiota se desarrolla durante los 2 primeros años de vida hasta hacerse estable y definitiva para el futuro adulto. Al nacer el neonato viene de un ambiente intrauterino casi libre de gérmenes. Si bien la colonización intestinal comienza en esta etapa prenatal, es escasa e insuficiente, con el nacimiento se comienza la conformación de la microbiota definitiva. La fuente original es derivada de la microbiota materna que llega al recién nacido en el parto vaginal y posteriormente con la leche materna. La dieta, estilo de vida, medio ambiente, tratamientos antibióticos y factores de estrés durante el embarazo y durante los dos primeros años de vida, influyen en la conformación de la MI. Su composición es un proceso dinámico y puede sufrir desequilibrios conocidos como disbiosis. Hay evidencias que el eje metabólico, hepato intestinal tiene una relación directa con la MI, y estos cambios pueden generar trastornos metabólicos.

Estudios en humanos han sugerido que la composición de la microbiota está alterada en la obesidad, aunque más investigaciones son necesarias para determinar la dirección y causalidad de esta relación.

En animales de experimentación se demostró que dietas ricas en grasas alteran la composición de la microbiota y muestran un aumento en sangre de LPS (endotoxemia) generando inflamación intestinal y respuesta inmune sistémica con inflamación de bajo grado, similar a la observada en la obesidad. Este mecanismo está asociado al aumento de la permeabilidad intestinal.

Preliminares estudios sugieren estrategias terapéuticas para la obesidad, modulando la MI, a través de dietas, pre y probióticos, y trasplantes microbiota fecal.

Conocer las interacciones de microbiota y eje cerebro – hígado – intestino y su relación con los trastornos metabólicos, nos permitirá descubrir el mejor camino para prevenir enfermedades y para manipular terapéuticamente la microbiota con el fin de garantizar la salud del huésped.

Sección II: Obesidad en adultos: aspectos bioquímicos y clínicos

—

MODERADOR: ACAD. MIRTHA BISCOGLIO

“¿QUÉ PASA CON LAS LIPOPROTEÍNAS EN LA OBESIDAD?”

Dra. Laura Schreier

Dra. en Bioquímica. Profesora Titular. Directora Dto. de Bioquímica Clínica. Jefe del Laboratorio Lípidos y Aterosclerosis. Hospital de Clínicas, INFIBIOC-Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA). Representante Argentina en la Red Iberoamericana de Hipercolesterolemia Familiar. E- mail:lschreier@ffyb.uba.ar

Las alteraciones en las lipoproteínas que ocurren en la obesidad de localización central se producen como consecuencia del estado de insulino-resistencia y el cuadro pro-inflamatorio concomitante. La hiperinsulinemia favorece la expansión en número y tamaño de los adipocitos, lo cual sustenta el estado de insulino-resistencia.

El comportamiento del tejido adiposo visceral, localizado en la zona abdominal es diferente al tejido adiposo del normopeso, de localización preferentemente periférica. Paradójicamente la adiposidad visceral mantiene una lipólisis exagerada e induce la proliferación de macrófagos y linfocitos, la producción de citoquinas como TNF α o interleuquina-6 y reducción de la adiponectina insulino-sensibilizante.

Los niveles elevados de ácidos grasos libres en circulación y la hiperinsulinemia son los dos factores más importantes promotores de la síntesis incrementada de apo B y de triglicéridos en el hígado, conduciendo a la sobreproducción de VLDL. Paralelamente, el exceso de TG se deposita en forma ectópica en el hígado, produciendo esteatosis hepática no-alcohólica, que ocurre alrededor del 70 % de los estados de insulino-resistencia con obesidad abdominal. En este contexto de sobreproducción de VLDL por un lado, e inducción del depósito de TG en los hepatocitos por otro, la VLDL resultante secretada presenta alteraciones en su composición y tamaño que incrementan su aterogenicidad. De hecho, estas partículas pueden penetrar al subendotelio y provocar disfunción endotelial de forma comparable a las LDL.

En el marco de un estado pro-inflamatorio inducido por la grasa intrahepática y visceral, la disminución de adiponectina estimula la formación de estas VLDL anómalas, precursoras de remanentes lipoproteicos con mayor potencialidad aterogénica. Asimismo, la reducción de adiponectina dificulta la degradación de los TG-VLDL por la lipoproteína-lipasa en circulación, favoreciendo su persistencia en diferentes estadios de degradación identificadas. Estas alteraciones, sumadas al predominio frecuente de LDL pequeñas y densas, forman parte de la denominada dislipemia aterogénica, característica de los pacientes con obesidad central. Las partículas grandes de VLDL pueden degradarse en la superficie de la pared arterial, disminuir su tamaño y atravesar al subendotelio. Asimismo promueven el proceso proinflamatorio y oxidativo en la íntima arterial, evidenciando su contribución al mecanismo aterogénico.

Es importante tener en cuenta que los parámetros clásicos que se miden en plasma en la práctica clínica, no revelan, en la mayoría de los casos, las alteraciones del metabolismo lipoproteico asociadas a los estados de insulino-resistencia. Los índices col-VLDL/TG y TG/HDL, el cálculo de Col-RLP y la medida de PCRhs constituyen indicadores accesibles y útiles para la evaluación de este cuadro.

OBESIDAD Y SÍNDROME METABÓLICO EN EL ADULTO”

Dr Julio Mollerach

Médico. Especialista en Clínica Médica y Nutrición (UBA). Servicio de Nutrición del Hospital Tornú. Servicio de lípidos del Instituto Cardiovascular de Buenos Aires (ICBA). Docente Nutrición de UBA y UCA. E- mail:juliomollerach@gmail.com

El término síndrome metabólico encierra varios factores de riesgo cardiovascular, cuyo desencadenante principal quizá, sea la resistencia a la insulina. La obesidad parece ser el principal desencadenante y la insulino resistencia, una respuesta fisiológica, a esa obesidad; entre las otras alteraciones que lo caracterizan, la intolerancia a la glucosa, la dislipemia e hipertensión; estos factores de riesgo en última instancia serían una comorbilidad de la obesidad y el riesgo global la sumatoria de los mismos.

Es tal la sociedad de estos factores de riesgo, con el llamado síndrome metabólico, que el descenso de peso puede reducir hasta un 70 por ciento la expresión clínica de este síndrome.

La obesidad a diferencia de otras enfermedades crónicas, es prevenible o puede revertirse sobre todo en sus fases iniciales, de ahí que la adherencia del paciente con el profesional es fundamental para detectar el riesgo, toma de conciencia y éxito final.

“OBESIDAD Y SU RELACIÓN CON METABOLISMO ÓSEO”

Dra Susana Zeni

Profesora de Bioquímica General y Bucal, Facultad de Odontología (UBA). Investigadora Principal del CONICET. Laboratorio de Osteopatías Metabólicas. INIGEM. Hospital de Clínicas. UBA - CONICET. Vicepresidente de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral. E- mail:snzeni@hotmail.com

La prevalencia de dos desórdenes crónicos como la osteoporosis y la obesidad se encuentra en aumento. La fisiopatología de ambas alteraciones metabólicas es multifactorial e incluye factores genéticos, factores ambientales y hormonales. Diversos estudios clínicos y experimentales demuestran la existencia de una interacción entre el tejido adiposo y el esqueleto, similar a la que ocurre entre las patologías mencionadas. Si bien se pensaba que la obesidad protegía al hueso, actualmente se postula que un exceso de tejido graso, fundamentalmente grasa abdominal, sería un factor de riesgo para el desarrollo de osteoporosis y fracturas por fragilidad. La relación inversa entre adipogénesis y osteoblastogénesis con la edad, determina cambios que conducen al aumento de grasa en la médula ósea a expensas de la osteoblastogénesis y la formación ósea.

Este hecho determina que la existencia de interacciones entre el tejido graso y el esquelético que constituyen un sistema homeostático de retroalimentación negativa en el cual tanto las adipocinas como las moléculas derivadas del hueso confluyen en un eje que relacionan a ambos tejidos. Se han propuesto varios mecanismos a través de los cuales la obesidad afecta la formación y resorción ósea como el aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias, inhibición en la sensibilidad a la insulina y desregulación del metabolismo de los lípidos y desarrollo de estrés oxidativo, disminución en la absorción de calcio asociada a una alta ingesta de grasa, excesiva producción de leptina. Aunque el mecanismo completo no ha sido aún dilucidado totalmente, los datos que emergen a diario claramente evidencian una correlación entre tejido esquelético y graso y una interrelación entre obesidad y el desarrollo de osteoporosis.

SECCIÓN III EL PACIENTE ADULTO OBESO Y SUS ALTERNATIVAS CLÍNICAS –

Moderador: Acad. Norma Sterin de Speziale

“INDICACIONES DE LA CIRUGÍA BARIÁTRICA EN OBESIDAD MÓRBIDA O CON SÍNDROME METABÓLICO”

Dr. Hugo Montemerlo

Especialista en Medicina Interna, Academia Nacional de Medicina. Unidad de Nutrición y Asistencia Nutricional del Sanatorio Mater Dei. Especialista en Nutrición (UCA). Experto en Soporte Nutricional. Miembro de la Subcomisión Científica de la Sociedad Argentina de Nutrición. Codirector del Instituto Argentino de Educación e Investigación en Nutrición (IADEIN). E-mail:hmontemerlo@yahoo.com.ar

La obesidad es una patología con frecuencia en ascenso, que en los casos severos tiene escasa respuesta al tratamiento clínico. Está asociada a factores que potencian el riesgo cardiovascular, en especial Hipertensión arterial (HTA) y Diabetes. La Cirugía Bariátrico-metabólica se presenta como una opción de tratamiento. Los riesgos de complicaciones agudas de la cirugía se han reducido, en especial con grupos multidisciplinarios con gran experiencia. Las complicaciones crónicas dependen en especial, del seguimiento con esos grupos por períodos muy prolongados.

“INDICADORES BIOQUÍMICOS DE ESTADO NUTRICIONAL PRE CIRUGÍA BARIÁTRICA”

Acad. María Luz Pita Martín de Portela

Profesora Titular Consulta de Nutrición, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA) E- mail: mportela@ffyb.uba.ar

La mayoría de los pacientes a ser sometidos a cirugía bariátrica (CB) presentan alguna deficiencia nutricional preexistente, debido a alimentación inadecuada, con baja densidad de macro y micronutrientes críticos. Esas deficiencias deben ser identificadas para realizar una suplementación adecuada que evite el deterioro del estado nutricional post cirugía, logre una evolución favorable y disminuya el riesgo de las complicaciones quirúrgicas.

La Sociedad Americana de Metabolismo y Cirugía Bariátrica (ASMBS, 2008) recomienda 3 tipos de pruebas de laboratorio: a) de rutina: glucosa en ayunas, perfil lipídico, función renal y hepático, análisis de orina, pruebas de coagulación, tipificación sanguínea, hemograma completo, estudio de prediabetes y función tiroidea; b) estado nutricional con relación a hierro, vitamina B₁₂, ácido fólico y vitamina D; c) determinaciones complementarias: folato intra-eritrocitario, homocisteína, ácido metilmalónico, vitaminas B₁, A, E, K y PTH.

El Documento de Consenso sobre Cirugía Bariátrica de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) y la Sociedad Española de Cirugía de la Obesidad (SECO) aconsejan como indicadores bioquímicos básicos, antes de la cirugía: hematómetría completa, estudio de coagulación, glucemia, perfil lipídico, ionograma, PC reactiva, función renal y hepática, serología de hepatitis B y C y hormonas: tiroideas.

La Actualización del Consenso Argentino de Nutrición en Cirugía Bariátrica (SAN; 2016) considera que las deficiencias más comunes en el paciente con obesidad mórbida se relacionan con los siguientes nutrientes: vitaminas B₁, B₁₂, A y D, ácido fólico, hierro, zinc, cobre y calcio. Para completar la evaluación preoperatoria, recomienda determinar la albúmina, de importancia en la cicatrización de las heridas. Otras determinaciones aconsejables están relacionadas con la evaluación en relación a vitaminas B₆, B₂, y otros microminerales.

La correcta identificación de las deficiencias debe tener en cuenta los puntos de corte de los indicadores bioquímicos, de acuerdo a la metodología utilizada y al proceso inflamatorio relacionado con la obesidad. Los avances del conocimiento y de nuevas metodologías permitirán contar en el futuro con indicadores de sensibilidad adecuada y con valores de referencia para establecer Recomendaciones nutricionales acerca de las dosis de nutrientes a suplementar antes de la cirugía.

“ALTERACIONES NUTRICIONALES Y DE LA MICROBIOTA POST CIRUGÍA BARIÁTRICA”

Dra. María del Pilar Quevedo

Médica (UBA). Especialista en Clínica Médica y en Nutrición (UBA). Médica de Planta del Servicio de Nutrición del Hospital de Clínicas “Jose de San Martín” (UBA). Coordinadora de la Unidad Bariátrica y Metabólica (CIEN- DIAGNOMED). Médica de Planta del Sanatorio Güemes. Integrante del Equipo Nutrición y Diabetes, Dr. H. Montemerlo. E- mail:maria.pquevedo@gmail.com

“GENÉTICA Y EPIGENÉTICA”

Dr. Gustavo Fretchel

Laboratorio de Diabetes y Metabolismo. INIGEM. (UBA/CONICET) Profesor Titular. Cátedra de Nutrición. Departamento de Medicina, Facultad de Medicina (UBA). Profesor Adjunto. Cátedra de Genética. FFYB (UBA). Jefe División Genética. Hospital de Clínicas (UBA) E-mail:gfrechtel@yahoo.com

La obesidad es una enfermedad compleja o multifactorial, cuyo desarrollo depende de una interacción entre factores genéticos de susceptibilidad y ambientales desencadenantes.

Está demostrada la herencia de la obesidad en cuanto a una multiplicidad de componentes fisiopatológicos y clínicos como la distribución de la grasa corporal, apetito, saciedad, gasto metabólico y endócrino-metabólicos en relación a las patologías para las cuales la obesidad se constituye en un factor de riesgo como la dislipemia, la hipertensión arterial, la diabetes tipo 2, cáncer, poliquistosis ovárica.

La genética de la obesidad está determinada por la influencia de múltiples polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) presentes en una importante variedad de genes, cuyos productos de expresión son moléculas proteicas que se constituyen en la base molecular de la obesidad y sus patologías asociadas. Por eso la obesidad es una enfermedad poligénica, cuya herencia es de características no mendelianas y con una baja penetrancia.

El conocimiento de la genética de la obesidad ha avanzado significativamente en los últimos años, en base a los estudios de escaneo amplio del genoma (GWAS), en los que se estudian cientos de miles de SNPs en decenas de miles de pacientes obesos comparados con controles. En base a estos estudios se han definido más de 100 SNPs asociados a obesidad.

Por otro lado, los factores ambientales influyen el desarrollo de obesidad a través de la epigenética, que es el puente molecular entre el ambiente y los genes. La epigenética influye la expresión de los genes. Los tres mecanismos epigenéticos son: 1) Metilación de islas cpg, 2) Acetilación/metilación de histonas y 3) Micro RNA.

La epigenética constituye un mecanismo plástico de adaptación al medio ambiente y por lo tanto modificable ante la variación de los factores ambientales. De ésta manera habrá modificaciones en la expresión de genes de acuerdo a si el individuo es sedentario o realiza actividad física, de acuerdo al tipo de alimentación, etc.

La obesidad tiene diferentes formas de expresión clínica o fenotipos, que están influenciados por la genética y por la epigenética. La determinación clínica de estos fenotipos tiene impacto en el tratamiento de la obesidad y sus complicaciones endocrino-metabólicas.

Uno de esos fenotipos es el de obesos metabólicamente sanos, cuya evolución clínica hacia complicaciones como la diabetes tipo 2 y la enfermedad cardiovascular es mucho menor comparado con obesos con alteraciones metabólicas.

La genética está empezando a recorrer este camino hacia una medicina de precisión, en la cual diagnósticos específicos permiten tratamientos personalizados.

“PREVENCIÓN DE OBESIDAD EN LA INFANCIA Y ADOLESCENCIA”

Dra. Irina Kovalskys

Médica (UBA). Especialidad en Pediatría, Nutrición infantil y Diabetes. Residencia en Nutrición Pediátrica. Scholarship en investigación en Obesidad Infantil, Universidad de Stanford. Profesora de Maestría Internacional en Nutrición Humana “Dr. Fernando Viteri”, Instituto de Investigaciones Pediátricas de la Plata; de la diplomatura en obesidad y diabetes de la Universidad Nacional de Tucumán, del Posgrado de Especialización en Nutrición materno infantil, de Universidad del Centro Educativo Latinoamericano de la Ciudad de Rosario (UCEL) y de la Universidad Favalaro. Secretaria electa del capítulo Latinoamericano de la ObesitySociety. Coordinadora científica del comité de Salud, Nutrición y Calidad de Vida, ILSI Argentina. E- mail: ikovalskys@gmail.com

La prevención de la obesidad requiere de acciones multisectoriales de gran escala que involucren al Estado, organizaciones no gubernamentales, sociedades científicas, universidades, industria alimentaria y sociedad civil (padres, docentes, etc.).

En octubre de 2014 los países de la Región de las Américas aprobaron un plan de acción para la prevención de la obesidad en la niñez y la adolescencia para el período 2014-2019 (OPS.OMS)

En este plan se proponen cinco líneas de acción estratégicas:

1. Atención primaria de la salud y promoción de la lactancia materna y la alimentación saludable.
2. Mejoramiento del entorno con respecto a la nutrición y la actividad física en los establecimientos escolares.
3. Políticas fiscales y reglamentación de la publicidad, promoción y etiquetado de alimentos.
4. Otras medidas multisectoriales.
5. Vigilancia, investigación y evaluación¹

En el caso de los niños, las intervenciones poblacionales más frecuentes se realizan en el ámbito Sus ventajas radican en llegar a todos los niños, influir sobre el entorno obesogénico, y ser más sostenibles en el tiempo. Desde el grupo de nutrición salud y calidad de vida de ILSI Argentina se diseñaron dos programas escolares consecutivos, basados en la escuela y que incluyeron robustas metodologías de evaluación que permitieron evidenciar la efectividad de las intervenciones

SALTEN (Sanos, Activos, Libres de Enfermedad crónica No Transmisible), ha sido un programa con base en las escuelas para promover hábitos de alimentación más saludables y un aumento de la actividad física. El programa consiste en una serie de acciones focalizadas en tres áreas: el niño (su conocimiento, actitudes y motivación), su apoyo social (familia, maestros) y su ambiente físico y organizacional (capaz de promover o dificultar estos comportamientos relacionados con la salud). La intervención está enmarcada en el modelo ANGELO (6), que enfatiza el rol del ambiente en la determinación del comportamiento y en el enfoque motivacional del cambio en el comportamiento (7). Intervención 2013 -2014

MINI SALTEN es un desprendimiento de SALTEN!, Se desarrolla en la escuela, en niños de primer grado, promoviendo alimentación saludable y acceso a actividad física desde temprana edad. Incorpora a los padres, reconociendo su rol crucial como modelos proveedores de alimentos y de oportunidades para ser activos y utiliza herramientas de tecnología para transmitir educación. Intervención 2015-2016

La importancia de la prevención en el ambiente escolar se centra en dos pilares: 1. La evidencia científica que sustenta los componentes del programa 2. Hacer mediciones de impacto bajo un modelo de evaluación científica ya que devuelve a la sociedad el valor del trabajo de prevención y su efectividad y permite generar ciencia que sea útil para la toma de decisiones en salud pública.

¹ OPS/OMS. Plan de acción para la prevención de la obesidad en la niñez y la adolescencia. Washington, D.C., USA, 2014.

PREMIOS

PREMIOS 2017

El 15 de noviembre de 2017 la Comisión de Premio entregó el documento emitido por el jurado integrado por la Acad. Virginia Martino, el Acad. Roberto Coco, el Acad. Mario los, el Acad. Francisco Stefano y el Acad. Osvaldo Cascone, Acad. Clyde Carducci y Acad. Silvia Hajos.

Por unanimidad dictamina:

Premio "María Amelia Enero", correspondiente al área Ciencias Farmacéuticas y Farmacológicas, al trabajo "Comparación de los efectos cardiovasculares del tratamiento crónico con β -bloqueantes o amlodipina en ratas espontáneamente hipertensas" de Julieta S. Del Mauro, Paula D. Prince, Martín Donato, Marcela A. Morettón, Germán E. González, Facundo M. Bertera, Andrea Carranza, Susana B. Gorzalczany, Diego A. Chiappetta, Celina Morales, Ricardo J. Gelpi, Carlos A. Taira, Christian Hocht.

Adjudicar el premio "Fernando Rusquellas", correspondiente al área Ciencias Biológicas, Bioquímicas, Biofísicas y Naturales al trabajo "Enterocina ap-cect7121: actividad bactericida, sinergia antimicrobiana y evidencias de prevención y efecto anti-biofilm sobre staphylococcus aureus multi-resistente" de Gastón Delpech, Mónica Cecí, Sabina Iñárrigue y Mónica D. Sparo.

Adjudicar el premio "Vicente Colobraró", correspondiente al área Ciencias Aplicadas a la Salud Humana, al trabajo "Premezclas comerciales libres de gluten y desarrollo de nuevas formulaciones. situación de escolares celíacos respecto al hierro y zinc" de Luis Dyner, Verónica Ferreyra, Ricardo Wright, Silvina Márquez, Carolina Cagnasso y Margarita Olivera Carrión.

PREMEZCLAS COMERCIALES LIBRES DE GLUTEN Y DESARROLLO DE NUEVAS FORMULACIONES. SITUACIÓN DE ESCOLARES CELÍACOS RESPECTO AL HIERRO Y ZINC

**Luis Dyner¹, Verónica Ferreyra², Ricardo Wright³, Silvina Marquez¹,
Carolina Cagnasso¹, Margarita Olivera Carrión^{1*}**

¹ Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedra de Bromatología; ² Centro de Cereales y Oleaginosas, Instituto Nacional de Tecnología Industrial; ³ Centro de Estudios en Nutrición y Desarrollo Infantil. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CEREN/CIC).

*Autor corresponsal: molivera@ffyb.uba.ar

RESUMEN	127
GLUTEN FREE COMMERCIAL PREMIXES AND DEVELOPMENT OF NEW FORMULATIONS. IRON AND ZINC STATUS OF CELIAC CHILDREN.	128
1. INTRODUCCIÓN	128
2. OBJETIVOS	131
3. MATERIALES y MÉTODOS	131
3.1 MATERIALES	131
Población Estudiada, Registro De Consumo Dietario Y Sueros De Niños Celíacos.	131
Premezclas Comerciales.	131
3.1 MÉTODOS	132
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	133
4.1 PREMEZCLAS COMERCIALES LIBRES DE GLUTEN	133
4.2 INGESTA DE MACRONUTRIENTES Y MICRONUTRIENTES DE NIÑOS CELÍACOS	136
4.3 HARINAS ALTERNATIVAS	138
4.4 DESARROLLO DE PREMEZCLAS LIBRES DE GLUTEN	141
4.5 CONCLUSIONES	144
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	146
AGRADECIMIENTOS.	148

RESUMEN

Las personas que deben consumir alimentos libres de gluten (celiaquía o intolerancia), presentan en general deficiencias nutricionales. Generalmente estos productos son formulados con ingredientes de pobre calidad nutricional, sin agregado obligatorio de Fe y vitaminas. El objetivo del trabajo fue estudiar premezclas comerciales libres de gluten, evaluación respecto al Fe y Zn de niños consumidores de las mismas, desarrollo de premezclas de mejor calidad nutricional. Se estudiaron: 1) las cuatro premezclas comerciales libres de gluten más utilizadas para elaboración hogareña de productos farináceos; 2) situación respecto al Fe y Zn de 40 niños escolares celíacos asistentes a hospital pediátrico público (La Plata), mediante ferritina y Zn séricos; 3) composición fisicoquímica y mineral de harinas alternativas con/sin extrusión; 4) desarrollo de 10 premezclas específicas utilizando ingredientes usuales, harinas de sorgo refinada y soja semidesgrasada ambas extrudidas, leche entera y huevo deshidratado. Las harinas y premezclas desarrolladas fueron procesadas en planta semi-industrial (INTI Cereales y Oleaginosas, Ciudad 9 de Julio). Se utilizó quimioluminiscencia para ferritina y métodos oficiales AOAC en el resto de los ensayos. Las premezclas comerciales presentaron pobre diversidad

de ingredientes (almidón de maíz, harina de arroz y féculas de mandioca/papa), bajos porcentajes de proteínas (4,9%), grasa (2,8%), fibra dietaria (3,4%) y alto en carbohidratos (77,5%). Fueron pobres en Fe (0,18 mg/100g) y Ca (83 mg/100g), mientras que el Zn (0,48 mg/100g), fue superior a la harina de trigo comercial. El 37,5% y 12,5% de los niños, presentó valores inferiores a las recomendaciones de ferritina y Zn séricos. Las formulaciones de las premezclas desarrolladas se seleccionaron por análisis sensorial de preferencia. Presentaron 11,9% proteínas, 8,9% grasa, 4,7% fibra, 2,3 mg/100g Fe, 1,1 mg/100g Zn y 111 mg/100g Ca, valores todos muy superiores a las premezclas comerciales. Fue posible la diversificación de ingredientes y mejorar las características nutricionales de premezclas libres de gluten.

Palabras **claves**: escolares, hierro, premezclas libres de gluten

GLUTEN FREE COMMERCIAL PREMIXES AND DEVELOPMENT OF NEW FORMULATIONS. IRON AND ZINC STATUS OF CELIAC CHILDREN.

People who must consume gluten-free foods (celiac disease or intolerance) generally have nutritional deficiencies. Generally these products are formulated with ingredients of poor nutritional quality, without mandatory addition of Fe and vitamins. The objectives of this work were: to study gluten-free commercial premixes, to evaluate Fe and Zn status of children consuming them and the development of premixes of better nutritional quality. The following were studied: 1) four gluten-free commercial premixes most used for home-made farinaceous products; 2) situation regarding Fe and Zn of 40 schoolchildren attending a public pediatric hospital (La Plata), using ferritin and serum Zn; 3) physicochemical and mineral composition of alternative flours with / without extrusion; 4) development of 10 specific premixes using standard ingredients, refined sorghum flour and semi-defatted soybeans, both extruded, whole milk and dehydrated egg. The flours and premixes developed were processed in a semi-industrial plant (INTI Cereales y Oleaginosas, 9 de Julio City). Chemiluminescence for ferritin and official AOAC methods were used in the rest of the studies. The commercial premixes presented poor diversity of ingredients (maize starch, rice flour and potato starch), low protein content (4.9%), fat (2.8%), dietary fiber (3.4%) and high in carbohydrates (77.5%). They were poor in Fe (0.18 mg%) and Ca (83 mg%), while Zn (0.48 mg%) content was higher than commercial wheat flour. Among the children studied, 37.5% and 12.5% presented values lower than the recommendations for serum ferritin and Zn. The formulations of the developed premixes were selected by sensory analysis of preference. They presented 11.9% protein, 8.9% fat, 4.7% fiber, 2.3 mg% Fe, 1.1 mg% Zn and 111 mg% Ca, all values were higher than the ones found in commercial premixes. It was possible to diversify ingredients and improve the nutritional characteristics of gluten-free premixes.

Key words: children, iron, gluten-free premixes

1. INTRODUCCIÓN

Las personas celíacas o con intolerancia al trigo, deben mantener una dieta libre de gluten durante toda la vida. Las proteínas que reciben el nombre genérico de gluten, están constituidas por las prolaminas presentes en el trigo, cebada, centeno, triticale y posiblemente avena. Otros cereales también contienen prolaminas: espelta, triticale (híbrido de trigo y centeno), kamut (híbridos del trigo). En función del cereal las prolaminas pueden clasificarse en: gliadinas (trigo), hordeínas (cebada), secalinas (centeno), aveninas (avena). Existen dudas en cuanto a la toxicidad de la avena, ya que este cereal tiene un contenido en prolaminas inferior y la presencia de gluten podría deberse a la contaminación en los cultivos y durante la cadena alimentaria (Niewinski, 2008).

La celiaquía es una enteropatía que se caracteriza por la inflamación crónica del intestino delgado con pérdida de microvellosidades, debido a la respuesta del sistema inmune de individuos genéticamente susceptibles. La prevalencia actual es del orden del 1% en algunas regiones geográficas, presentándose en la mayoría de los casos de forma asintomática. La confirmación del diagnóstico es solo mediante biopsia intestinal, y debido a su difícil implementación, se considera que se encuentra subdiagnosticada.

Actualmente nuevos estudios epidemiológicos y avances en los métodos de diagnóstico, sobre todo los test serológicos, han revelado que la celiaquía se encuentra entre las intolerancias alimentarias más frecuentes y comunes en muchos países en desarrollo (Catassi&Yachha, 2009).

La lesión intestinal se traduce en severos problemas de deficiencias nutricionales debido a la malabsorción intestinal o mala adherencia a la dieta sin gluten. Son varios los factores que influyen: localización y grado de daño en la mucosa intestinal, grado de malabsorción, tiempo de evolución previo al diagnóstico, etc. (Kirby&Danner, 2009)

De acuerdo a esto, si bien las personas celíacas pueden ingerir cantidades adecuadas de minerales, como Fe proveniente de productos cárnicos, o Ca de lácteos, es frecuente la deficiencia de minerales y enfermedades asociadas. El Fe, el Ca y el Zn, ácido fólico y la Vitamina B12, son los micronutrientes más estudiados, debido a que sus deficiencias impactan en la salud y en el desarrollo (García-Manzanares & col, 2011; Niewinski, 2008; Bengoa, 2007). Las carencias de estos minerales se asocian a un inferior crecimiento y desarrollo físico, motor y cognitivo.

El Fe es un mineral indispensable constituyente de la hemoglobina y forma parte de numerosas enzimas, así como del sistema inmune (Pita Martín de Portela, 2015, a). La anemia es frecuente en la forma clásica de la enfermedad celíaca, que cursa con diarreas crónicas, mala absorción de grasas y nutrientes. La anemia por déficit de Fe se ve agravada, dado que la absorción tiene lugar en el intestino proximal, siendo ésta una de la zonas más afectadas en la enfermedad (García-Manzanares & col, 2011; Niewinski, 2008).

La deficiencia de Zn puede afectar diversas funciones metabólicas, retraso en el crecimiento, en la fertilidad y el rendimiento intelectual entre otras. (Pita Martín de Portela, 2015, b)

El Ca tiene un rol fundamental a nivel estructural conformando la masa ósea y cuando el Ca dietario es pobre, se obtendrá a partir de la desmineralización (Pita Martín de Portela, 2015, c). Esto se traduce en la enfermedad celíaca en osteoporosis, favorecido también por la limitada absorción de la Vitamina D y algunos estudios reportan disminución de la densidad mineral hasta en un 70% (Guevara-Pacheco & col., 2014).

En los productos libres de gluten, los estudios se han direccionado fundamentalmente en dos aspectos, disponer de métodos analíticos que permitan la detección de gluten en los alimentos y obtener productos farináceos de similares características tecnológicas y organolépticas a los elaborados con harina de trigo.

El nivel máximo propuesto para considerar un alimento libre de gluten, es 20 ppm cuando el producto se elabora a partir de ingredientes que no contienen gluten (CODEX STAN, 118, 2008). En el año 2011 se definió en el Código Alimentario Argentino (CAA), *“alimento libre de gluten el que está preparado únicamente con ingredientes que por su origen natural y por la aplicación de buenas prácticas de elaboración —que impidan la contaminación cruzada— no contiene prolaminas procedentes del trigo, de todas las especies de Triticum, como la escañacomún (Triticum spelta L.), kamut (Triticum polonicum L.), de trigo duro, centeno, cebada, avena ni de sus variedades cruzadas. El contenido de gluten no podrá superar el máximo de 10mg/Kg”* (CAA, Art. 1383). Los productos ‘Libres de Gluten’ que se comercialicen en el país deben llevar, obligatoriamente impreso en sus envases de modo claramente visible, el símbolo de la espiga cruzada y la leyenda “Sin T.A.C.C.” en la barra.

Tradicionalmente el gluten en la harina de trigo, se define como el coloide viscoelástico resultante de la masa formada por harina y agua, luego de la eliminación de todas las sustancias solubles por lavados sucesivos. En el horneado, el gluten es el responsable de que los gases de la fermentación queden retenidos en el interior de la masa, haciendo que ésta aumente su volumen debido a las propiedades funcionales de extensibilidad y elasticidad. La eliminación del gluten en los productos, especialmente en las formulaciones de pan, origina una textura quebradiza que se desmenuza con facilidad, menor volumen, miga con poca humedad y poca aireación con productos de color pobre y otros defectos de calidad.

En las formulaciones y procesos de fabricación de productos farináceos libres de gluten, se ha tratado de conseguir características sensoriales similares a sus homólogos con gluten. Se han utilizado distintos tipos de harinas alternativas, almidones, proteínas, hidrocoloides. Son numerosos los trabajos de investigación para mejorar la estructura, la textura así como la aceptación y conservación de los productos. Para ello se utilizan como alternativas diferentes almidones, productos lácteos, gomas e hidrocoloides, diversas proteínas, prebióticos, enzimas, etc. (Perez& col, 2009; Rosell, 2009; Gujral& col, 2002).

Entre los ingredientes más utilizados, se encuentran la harina de arroz, junto al almidón de maíz y la fécula de mandioca, que actúan como aglutinantes y poseen fácil digestión (Gujral& Rosell 2004). La harina de arroz es un sustituto particularmente bueno de la harina de trigo que presenta bajo contenido en sodio, alta digestibilidad del almidón y gran aporte de vitaminas. Sin embargo, el bajo contenido en proteínas, junto a las características reológicas de las mismas, impide formar una red que contenga la aireación producida durante el proceso de horneado (Gujral& Rosell 2004). Las harinas de arroz y maíz, también se han utilizado con leguminosas como la soja, la cual realiza un gran aporte proteico, además de fibra dietaria muy valorada en la consistencia de algunas masas panificables (Ribotta& col, 2004).

Aunque su uso es menos frecuente, existen panes sin gluten elaborados a partir de harina de sorgo y de pseudocereales como quínoa, amaranto, trigo sarraceno, harina de algarrobo (Añon& col, 2009, Perez& col, 2009). El sorgo es un cereal de uso limitado en alimentación humana debido a la menor digestibilidad de las proteínas y del almidón, a pesar de lo cual su uso en panificación se ha incrementado en los últimos años (Dyner& col., 2017).

Con el objeto de promover la aireación de las masas se han incorporado ovoalbúmina y proteínas lácteas ya que poseen buena capacidad gelificante, alta retención de agua, y favorecen la esponjosidad y textura mejorando la aceptación sensorial (Gallagher & col, 2004).

Por otro lado, la aplicación del proceso de extrusión se ha limitado en general a productos de copetín, siendo una alternativa para aumentar la calidad nutricional de productos a base de cereales (Pérez-Navarrete & col, 2007; Anton& col, 2009). En la cocción por extrusión intervienen el calor, las fuerzas termomecánicas de corte y la presión generada en el proceso, todo lo cual produce una profunda homogeneización y mezclado de los distintos componentes, presentando ventajas operativas por tratarse de procesos continuos, eficientes, de fácil aplicación, bajo costo y sin producción de efluentes (Singh & col, 2007). La mayoría de los tratamientos son de alta temperatura y corto tiempo con disminución de la carga microbiana, buena conservación del valor nutritivo, inactivación de enzimas y factores antinutricionales. En la industria alimentaria se considera que el proceso de extrusión reúne propiedades que lo hacen particularmente interesante, ya que otorga al producto características organolépticas muy apreciadas por el consumidor (aspecto, textura). La estructura y suavidad-palatabilidad (mouthfeel) se ven afectadas con el aumento de la proporción de fibra, así los numerosos productos comerciales para consumo humano y animal actualmente disponibles, son ricos principalmente en almidón y/o proteínas vegetales (Anton& col, 2009).

Algunas de las alternativas para aumentar la calidad nutricional de harinas sin gluten, es el agregado de frutos secos (avellanas y almendras) y legumbres (Añon y col, 2009), pero la adición de las mismas en productos panificados afecta a las características y la calidad del producto final. Sin embargo, la incorporación de proteínas exógenas provocaría el debilitamiento de la red que conforma la masa.

El agregado de Fe y de ácido fólico es respaldado por organismos científicos, debido a lo cual las harinas de trigo son fortificadas con Fe y vitaminas del complejo B prácticamente en todos los países de Latinoamérica y Europa, así como en Argentina (Serdula& col, 2010; Ley 25.630, 2002). Sin embargo, harinas sin gluten como las de maíz y arroz, solo se encuentran enriquecidas en Fe en México y Venezuela (Kupper, 2005; Kapur& col, 2003). Actualmente en México la fortificación de las harinas nixtamalizadas es una práctica cotidiana gracias a un acuerdo entre el gobierno y la industria harinera. El impacto de la medida ha comenzado a expresarse en la reducción de deficiencias minerales en Zn y en la menor prevalencia de anemias (Sánchez & col, 2005). Los productos libres de gluten, fortificados o enriquecidos son poco frecuentes en el mercado, aunque el desarrollo de estos alimentos mejoraría la calidad de la dieta de esta población. Particularmente, en Argentina, no existe obligatoriedad de agregado de minerales y vitaminas en los ingredientes que se utilizan en reemplazo de la harina de trigo.

En definitiva, el reemplazo del gluten en los procesos tecnológicos es todavía un desafío, ya que además de las características sensoriales se suma que las dietas libres de gluten son pobres en lo que se refiere a proteínas, fibra dietaria, Fe, Ca, Zn y ácido fólico, comparadas con las dietas de la población en general. Debido a la prevalencia de la celiaquía y su paulatino aumento, es necesario desarrollar nuevos productos libres de gluten que puedan suplir estas carencias.

2. OBJETIVOS

- Relevar las premezclas comerciales libres de gluten, de mayor consumo por las familias de niños celíacos, para la elaboración a nivel hogareño de productos farináceos, y listar los ingredientes más utilizados en la formulación de las mismas.

- Determinar la composición centesimal y contenido de minerales de importancia nutricional: Fe, Zn y Ca en dichas premezclas. Comparar los resultados obtenidos con los informados por los fabricantes en las Tablas Nutricionales.

- Estimar la ingesta de macronutrientes en niños celíacos a través de registro dietario.

- Evaluar el estado bioquímico de los niños respecto al Fe y al Zn.

- Caracterizar nutricionalmente harinas obtenidas por extrusión de fuentes tradicionales (arroz, maíz) y alternativas (sorgo, soja semidesgrasada): composición centesimal y contenido de mineral: Fe, Zn, Ca, Mg, Na, K y Cu.

- Desarrollar premezclas, incorporando las harinas estudiadas, para elaborar productos libres de gluten de buenas características tecnológicas, nutricionales y organolépticas.

- Analizar el contenido de macronutrientes y de minerales de las premezclas desarrolladas.

- Comparar aportes de macro y micronutrientes con productos comerciales.

Los resultados podrían ser de utilidad a las autoridades sanitarias como antecedente para evaluar propuestas de fortificación y/o enriquecimiento de harinas o premezclas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

Población Estudiada, Registro De Consumo Dietario Y Sueros De Niños Celíacos.

La población estudiada estuvo formada por 40 niños que se dividieron en dos grupos: A: 22 niños de 6-8 años y B: 18 niños de 9-11 años. En cada grupo la proporción de niñas y niños fue aproximadamente 2:1. Los niños seleccionados se encontraron en tratamiento respetando la dieta libre de gluten al menos un año, cuya adherencia al tratamiento se controló con el anticuerpo anti-transglutaminasa tisular (anti-tTG).

Para efectuar el presente estudio, en todos los casos se solicitó un consentimiento informado a los padres y el asentimiento a los niños. El estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Revisión de Protocolos de Investigación (CIRPI) del Hospital General Pediátrico Sor María Ludovica de La Plata. Se realizó un registro del consumo de alimentos de 24 hs de dos días: un día de la semana y otro festivo o fin de semana. A partir de los datos de consumo registrados se calculó la ingesta de macronutrientes utilizando el software SARA basado en la Tablas de composición de alimentos nacionales (Argenfoods, 2017).

Los sueros se obtuvieron en ayunas de 12 hs.

Premezclas Comerciales.

A partir del registro de consumo de alimentos efectuado por los padres de niños celíacos que asisten un hospital pediátrico público de La Plata se identificaron las 4 premezclas más utilizadas por las familias. Para evaluar su composición, las mismas se adquirieron en negocios de productos dietéticos de la zona.

Harinas. Se estudiaron:

a) Harina de arroz crudo y extrudido (*Oryza sativa* L).

b) Harina de maíz integral (*Zea mays*L.)

d) Harina de sorgo integral y refinado (crudo y extrudido) (*Sorghum*spp.)

e) Harina de soja semidesgrasada extrudida (*Glycinemax*L.)

Todas las harinas fueron obtenidas en la planta semi-industrial del Centro de Cereales y Oleaginosas del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) de la Ciudad de 9 de Julio, Provincia de Buenos Aires. Las muestras estudiadas fueron todas provenientes de cosechas nacionales. Los granos fueron pre-acondicionados (proceso de descascarado en las muestras no integrales) y llevados a molienda en un molino tipo martillo (Retsch KG) con malla de 0,75 mm hasta que toda la muestra pasara por un tamiz de 420 μm .

Las harinas integrales se obtuvieron por molienda del grano luego del proceso de limpieza. En el proceso de refinación se aplicó un escarificado o pelado del grano, obteniéndose un porcentaje de extracción de la harina cercano al 90%. El proceso de extrusión se efectuó luego de la molienda. Para ello, se utilizó un extrusor de escala semi-industrial de simple tornillo donde se alcanzaron temperaturas de trabajo en el rango de 125-135°C (Frías & col, 2011). Las harinas de arroz se obtienen en general del grano partido, subproducto de proceso de limpieza y descascarado del arroz. Las harinas obtenidas a partir de sorgo fueron: integral extrudida, refinada cruda y refinada extrudida, donde cada una de ellas provino de distintas partidas. Las harinas de soja semidesgrasada se obtuvieron por molienda, extrusión y posterior prensado con eliminación parcial de la grasa.

Premezclas desarrolladas. Se desarrollaron 10 premezclas para uso general (panadería, pan de molde), farináceos dulces (galletitas dulces, bizcochuelo, budín, panqueques) y platos salados (pastas, ñoquis, pizza, rebozador).

De las harinas estudiadas, se utilizaron: arroz, maíz integral, sorgo blanco refinada y soja semidesgrasada, todas extrudidas. Además de almidón de maíz, también se utilizaron otros ingredientes: leche entera deshidratada, huevo u ovoalbúmina en polvo.

Evaluación sensorial. La aceptabilidad fue valorada a través del grado de aceptabilidad global y sensorial y su conveniencia de uso (Focus Group). Se conformaron grupos de debate con consumidores celíacos y familiares, con quienes se realizó una serie de reuniones en distintas ciudades (9 de Julio, La Plata, Mar del Plata, Córdoba, C.A.B.A). Las participantes recibieron muestras de las premezclas para elaborar el producto *in situ*, según las instrucciones, se realizó la cocción de los productos y se degustaron los alimentos obtenidos. Luego, con la guía de un moderador, se efectuó una encuesta para obtener información acerca de la funcionalidad de las premezclas y las características de sabor, color, textura, etc de los productos finales. En función de los resultados, se reformularon las premezclas para su optimización.

3.1 MÉTODOS

Análisis Químico. Se utilizó metodología AOAC 2000 según:

Humedad: Se determinó por método indirecto por desecación a presión reducida en estufa a 70°C hasta peso constante (AOAC 925.09).

Cenizas: se realizó mineralización por vía seca en mufla a 500-550°C hasta cenizas blancas de peso constante (AOAC 923.03).

Proteínas: Se utilizó el método de Kjeldahl (AOAC 984.13) y se aplicaron los factores de conversión nitrógeno/proteína de acuerdo a pautas internacionales (FAO, 2002): $f = 6,25$ (maíz), $f = 5,95$ (arroz), $f = 5,75$ (soja) y $f = 5,65$ (sorgo). Para las premezclas comerciales libres de gluten y para las premezclas desarrolladas se utilizó el factor general, $f = 6,25$.

Grasa: Se utilizó el método de Soxhlet para las harinas crudas (AOAC 985.15). Como solvente extracción se empleó éter de petróleo 35/60. Para las harinas extrudidas, premezclas comerciales y desarrolladas, se aplicó el método de hidrólisis ácida utilizando éter etílico y de petróleo 35/60 como solventes de extracción (AOAC 954.02).

Fibra dietaria total: Se estableció por duplicado empleando un método enzimático-gravimétrico (AOAC 985.29) adoptado por un kit comercial de Megazyme®.

Carbohidratos (CH): Se obtuvieron por cálculo según

$$\%CH = 100 - (\% \text{ Humedad} + \% \text{ Cenizas} + \% \text{ Proteínas} + \% \text{ Grasas} + \% \text{ Fibra dietaria total}).$$

Valor Energético (VE): se cálculo utilizando los factores de Atwater (FAO, 2002).

Minerales: Se cuantificaron Fe, Zn, Ca, Mg, Na, K y Cu.

Alícuotas de 1 g de muestra se trataron con 10 mL de una mezcla $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ (50:50) durante 4 h a 120°C (AOAC 971.20). Los mineralizados se llevaron a volumen de 25 mL con agua ultrapura. El contenido de Fe, Zn, Ca, Mg y Cu se estableció por espectrometría de absorción atómica – atomización en la llama

utilizando lámpara de cátodo hueco para cada mineral, en tanto que Na y K se cuantificaron mediante espectrometría de emisión por ionización en la llama. En todos los casos se utilizó un equipo Perkin Elmer® modelo AAnalyst 400°. Para cuantificar Ca y Mg, los mineralizados se trataron con una solución de cloruro de lantano 0,65% (p/v) para suprimir la interferencia causada por los fosfatos (AOAC, 2000; Perkin – Elmer, 1982).

Todo el material de vidrio utilizado fue previamente lavado con agua corriente y posteriormente se sumergió durante 24 h en una solución de HNO₃ al 20%. Finalmente se enjuagó 3 veces con agua destilada y 3 veces con agua desionizada. Se utilizó agua ultrapura en todas las experiencias.

Expresión de resultados: Todos los datos analíticos se expresaron por 100 g de muestra (base húmeda), en g la composición centesimal y en mg los minerales. Los resultados fueron expresados como la media ± desviación estándar (SD) de 3 determinaciones independientes.

Determinaciones bioquímicas.

Ferritina. Se determinó por quimioluminiscencia en suero con un equipo Access ImmunossaySystems (Beckman Coulter®). Se contempló la ausencia de estados inflamatorios o infecciosos a través de la determinación de leucocitos a efectos de descartar valores elevados de ferritina sérica asociados a los mismos. Este criterio fue el utilizado por la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud (ENNyS) del año 2005.

Zn sérico. Se determinó por espectrometría de absorción atómica – atomización en la llama utilizando lámpara de cátodo hueco con un equipo Perkin Elmer® modelo AAnalyst 200°.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PREMEZCLAS COMERCIALES LIBRES DE GLUTEN

La industria alimentaria ha desarrollado diversas premezclas libres de gluten destinadas a la elaboración de productos farináceos.

A través de la encuesta realizada a las familias de niños celíacos que asistieron a un hospital público pediátrico de La Plata, se identificaron las cuatro premezclas más ampliamente utilizadas para la elaboración de los distintos productos farináceos. A nivel hogareño, los más comúnmente elaborados fueron: pan, pastas, pizza, galletitas, tortas, budines, etc. De acuerdo a la información obligatoria en el envase, se listó la denominación de venta del producto y los ingredientes en orden decreciente de proporciones utilizados en la formulación

Tabla 1. Denominación de venta e ingredientes en orden decreciente de proporciones declarados en el envase de las premezclas comerciales libres de gluten.

Muestras	Denominación de venta	Ingredientes				
		1	2	3	4	Proporciones minoritarias
M1	Premezcla para panadería y repostería. Libre de gluten. Sin TACC.	Almidón de maíz	Harina de arroz	Fécula de papa	Leche entera en polvo	Espesante - Emulsionante
M2	Premezcla para hornear panes y pizzas. Libre de gluten. Sin TACC.	Almidón de maíz	Harina de arroz	Fécula de mandioca	Concentrado proteico	Espesante, sal, azúcar, materia grasa, albúmina de huevo
M3	Harina base para preparaciones dulces y saladas. Libre de gluten. Sin TACC.	Almidón de maíz	Harina de arroz	Fécula de papa	Goma xántica	Emulsionante
M4	Premezcla para panadería y repostería. Libre de gluten. 0% Ácidos grasos trans.	Harina de arroz	Fécula de mandioca	Almidón de maíz	Fécula de papa	azúcar, aceite vegetal, leche, huevo, sal

Se observó que los ingredientes más utilizados en todas las premezclas fueron cuatro y similares: almidón de maíz, harina de arroz, fécula de mandioca y fécula de papa. En orden decreciente de proporciones, el almidón de maíz es el primer ingrediente en tres de ellas, la harina de arroz es primer ingrediente en una y segundo en las otras tres. La fécula de mandioca es el 2º ingrediente en una premezcla y 3º en otra, mientras que la fécula de papa es el 3º en importancia.

En las muestras M2 y M4 se agregaron otros ingredientes que podrían aportar proteínas: concentrado proteico y albúmina de huevo (M2), leche y huevo (M4). Las grasas presentes serían aportadas por leche entera (M1), materia grasa cuyo origen no se especifica (M2) y aceite vegetal y huevo (M4). Como aspectos favorables, ninguna muestra declaró agregado de aceites vegetales parcialmente hidrogenados, y dos de las muestras no tienen agregado de sal (M1 y M3).

De acuerdo a tablas de composición de alimentos, tanto el almidón de maíz como las féculas, presentan similar composición: 83 % de carbohidratos, 0,6 % de proteínas, 0,1 % de grasa y ausencia de fibra dietaria (Souci& col, 1994). La harina de arroz contiene 73,4 % de carbohidratos, 7 % de proteínas, 2,2% de grasa y 2,9% de fibra dietaria (Souci& col, 1994).

De acuerdo a esto, las premezclas presentarían en principio, una composición con fuerte predominio de carbohidratos, baja proporción de proteínas, grasas y fibra dietaria.

Datos informados en Tablas Nutricionales. El tamaño de porción informado en las Tablas Nutricionales (TN) de cada premezcla, fue de 40 g en una muestra y 50 g en el resto. A efectos de comparar los datos se calcularon el VE y los nutrientes en 100 g .

Tabla 2. Datos declarados en la Tabla Nutricional por porción y cada 100 g en el envase de las premezclas comerciales.

Muestra	Porción	VE (kcal)		CH (g)		Proteína (g)		Grasa total (g)		Grasa saturada (g)		Grasa trans (g)		Fibra Dietaria (g)		Sodio (g)	
		porción	100g	porción	100g	porción	100g	porción	100g	porción	100g	porción	100g	porción	100g	porción	100g
M1	40 g	140	351	33	83	1,1	2,8	0,7	1,8	0,4	0,9	0	0	1,0	2,5	16	40
M2	50 g	192	384	36	72	3,0	6,0	4,0	8,0	1,0	2,0	0	0	0	0	506	1012
M3	50 g	170	340	41	82	1,5	3,0	0	0	0	0	0	0	0,2	0,5	1,1	2,3
M4	50 g	193	385	41	81	1,8	3,5	2,6	5,2	0,9	1,7	0	0	0,5	1,0	150	300
\bar{X}	-	-	365	-	80	-	3,8	-	3,8	-	1,2	-	0	-	1,0	-	339

Se observó uniformidad en el VE (340 - 385 kcal/100g) y en el contenido de carbohidratos (72 - 83 %). Todas las muestras presentaron bajo aporte proteico (2,8 - 6,0 %). El contenido de grasa total dispar (0 - 8,0 %), mientras que el valor de grasas saturadas fue bajo y en ningún caso se declaró grasas trans. El contenido de fibra dietaria también fue bajo (0 - 2,5 %). El Na fue muy bajo en las formulaciones sin agregado de sal (M1 y M3), mientras que en las otras dos, los valores fueron muy dispares: 300 mg% (M4) y 1012 mg% (M2).

Composición centesimal. Los resultados analíticos obtenidos de las 4 premezclas de humedad, cenizas, proteínas totales, grasa total, fibra dietaria, carbohidratos (por diferencia) y VE, se presentan en Tabla 3.

Tabla 3. Composición centesimal (g/100g) y Valor Energético (VE) (kcal/100g) de las premezclas comerciales libres de gluten.

Muestras	Humedad	Cenizas	Proteína	Grasa	FDT	CH*	VE
M1	11,1 ± 0,4	0,52 ± 0,01	4,1 ± 0,1	1,47 ± 0,01	2,1 ± 0,1	80,7	353
M2	9,0 ± 0,1	2,44 ± 0,19	8,5 ± 0,1	3,86 ± 0,10	4,1 ± 0,1	72,1	357
M3	10,8 ± 0,2	0,23 ± 0,01	3,1 ± 0,1	0,24 ± 0,01	2,3 ± 0,3	83,4	348
M4	10,4 ± 0,1	1,60 ± 0,02	4,0 ± 0,2	5,43 ± 0,10	5,0 ± 0,2	73,6	359
\bar{X}	-	-	4,9	2,8	3,4	77,5	355

*** Carbohidratos por diferencia**

El contenido proteico fue muy bajo en tres de las muestras (3,1-4,1 %), lo cual indica que ninguno de los ingredientes realizaría un aporte considerable de proteínas. Solo la muestra M2 presentó un contenido mayor (8,5 g %), lo cual se debería al agregado de concentrado proteico. Los resultados hallados fueron mayores a los informados en las TN, excepto para M3.

La grasa fue muy baja en las muestras M3 y M1 (0,2% y 1,5% respectivamente), mientras que fue mayor en las restantes (3,9 - 5,4%). La muestra M3 no contuvo en su formulación ningún ingrediente que aportara lípidos, mientras que en M1, la grasa provendría de la leche entera. En el resto de las muestras el contenido provino de la materia grasa (M2) y aceite vegetal (M4) utilizados.

Estos resultados se encontraron dentro del margen de tolerancia permitido para los datos informados en la TN ($\pm 20\%$) (CAA, Capítulo V, RGMC 46/3 Item 3.5.1), excepto en M2 donde se superó dicha tolerancia (8,0 % declarado vs 3,9 % hallado).

El contenido de fibra dietaria fue muy bajo en todos los casos (2,1 - 5,0 g %), lo cual es consistente con el bajo contenido de fibra de los ingredientes utilizados (féculas y harina de arroz). Excepto en M1, los resultados superaron el margen de tolerancia de $\pm 20\%$, ya que los valores hallados fueron superiores a los informados (M2: 4,1 % vs 0%; M3: 2,3 % vs 0,5%; M4: 5,0 % vs 1,0 %). Estas diferencias se deberían a que generalmente los datos declarados en las TN, se obtienen a partir de tablas de composición de alimentos no actualizadas, donde los datos de fibra fueron obtenidos por el método de fibra cruda. En el presente trabajo se utilizó el método enzimático gravimétrico, actualmente recomendado por AOAC.

El porcentaje de carbohidratos fue elevado (72,1- 83,4 g%) y similar a los declarados en las TN. Asimismo, el VE (348 - 359 kcal%) se encontró en los niveles informados en la TN.

Conclusión parcial. De acuerdo a los resultados analíticos, las premezclas comerciales libres de gluten, presentan muy bajo porcentaje de proteínas, grasa y fibra dietaria, con elevado contenido de carbohidratos y donde el VE es provisto principalmente por estos.

Contenido Mineral. La anemia ferropénica es una problemática bien conocida en nuestro país. Como una estrategia para reducir la deficiencia de Fe de la población, desde el año 2003 se agrega obligatoriamente 3 mg de Fe cada 100g a las harinas comerciales de trigo en la República Argentina (Ley 25630, 2003). Sin embargo, las premezclas libres de gluten no son adicionadas con Fe y, consecuentemente, la población celiaca queda sin este potencial resguardo.

El contenido de Fe, Zn y Ca hallado en las premezclas comerciales, se presentan en Tabla 4.

Tabla 4. Contenido de Fe, Zn y Ca (mg/100g) de las premezclas comerciales libres de gluten.

Muestras	Hierro	Zinc	Calcio
M1	ND*	0,50 ± 0,01	59 ± 1
M2	ND*	0,30 ± 0,01	50 ± 1
M3	0,10 ± 0,06	0,40 ± 0,01	39 ± 1
M4	0,60 ± 0,04	0,70 ± 0,01	185 ± 4
\bar{X}	0,18	0,48	83

*ND: no detectable

La concentración de Fe hallada fue muy baja: no detectable en dos muestras y baja en las restantes (0.10 - 0.60 mg/100g). Estos valores resultaron muy inferiores a la harina de trigo enriquecida (3 mg/100g)

Respecto al Zn, el rango hallado (0.30 - 0.70 mg/100g), superó los resultados propios encontrados en harinas de trigo comerciales (no detectable - 0.36 mg/100g).

En relación al Ca, dos muestras presentaron valores bajos (39 mg/100g y 50 mg/100g en M3 y M2 respectivamente), lo cual es consistente con la lista de ingredientes declarados. En las dos muestras que declararon el agregado de leche entera, los resultados fueron muy dispares: 60 mg/100g (M1) y 185 mg/100g (M4).

Conclusión parcial. Las muestras presentaron muy bajo contenido de Fe, mientras que el Zn se encontró en los niveles de las harinas de trigo. Respecto al Ca, el valor fue bajo en una de las muestras que declaró agregado de leche entera en polvo.

4.2 INGESTA DE MACRONUTRIENTES Y MICRONUTRIENTES DE NIÑOS CELIACOS

Trabajos internacionales indican que la dieta libre de gluten se caracteriza por su bajo aporte de fibra y carbohidratos y exceso de proteínas y grasas (Pelegri Calvo, 2011; Midge & col, 2009; Marugan De Miguelsanz & col, 2001). Sin embargo, en Argentina no existen investigaciones en el tema que indiquen cuál es el estado de la situación de niños a nivel local. Por ello, se consideró de interés relevar la ingesta de macronutrientes en niños en edad escolar con celiaquía.

Como se dijo anteriormente, se registró el consumo de alimentos durante dos días y se calculó la ingesta de macronutrientes utilizando tablas nacionales de composición de alimentos. Los 40 niños evaluados se encontraron en un rango etareo de 8.8 ± 2.0 años, y estuvo constituido por 67.5% de mujeres y 32.5% de varones, para respetar la relación de la celiaquía por sexo 2:1, con prevalencia de mujeres. Estudios anteriores en adultos confirmaron esta proporción entre sexos en adultos en la región (Gómez & col, 2001).

Los niños se dividieron en dos grupos de acuerdo a las recomendaciones por edad del Institute of Medicine, National Academies of Sciences (2005). Los grupos estuvieron conformados en A (22 niños de 6-8 años) y B (18 niños de 9-11 años). Los resultados de la ingesta media y las recomendaciones se presentan en Tabla 5.

Tabla 5. Ingesta de macronutrientes de niños celíacos asistentes a un Hospital Pediátrico público de La Plata

	Grupo A		Grupo B	
	Resultados	Referencia*	Resultados	Referencia*
Energía (Kcal)	1609,0 ± 560,0	-	2340,4 ± 604,6	-
Carbohidratos (g)	226,5 ± 87,3	130	304,6 ± 108,6	130
Proteína (g)	55,3 ± 22,4	19	89,9 ± 25,9	34
Grasa (g)	51,2 ± 21,1 28,6 %**	30% VCT***	76,8 ± 23,4 29,5%**	30% VCT***
Fibra dietaria (g)	8,7 ± 5,1	25	12,2 ± 6,7	31

Grupo A: 22 niños de 6-8 años; Grupo B: 18 niños de 9-11 años; *Recomendaciones de acuerdo a edad, Institute of Medicine, National Academies of Sciences, 2005; **Porcentaje energía; *Valor Calórico Total**

Al comparar los valores hallados con las recomendaciones, se evidenció elevado consumo de carbohidratos y proteínas, adecuada cantidad de grasas y baja ingesta de fibra dietaria.

Simultáneamente al registro dietario, se realizó una evaluación bioquímica del estado nutricional de los niños respecto a Fe y Zn, dado que diversos estudios han reportado deficiencias de estos minerales en personas celíacas, aún cuando estas pueden consumir carnes rojas.

Por sus requerimientos nutricionales, los niños en edad escolar constituyen una población particularmente vulnerable. Como indicador de reserva de Fe y Zn se determinaron ferritina y Zn séricos.

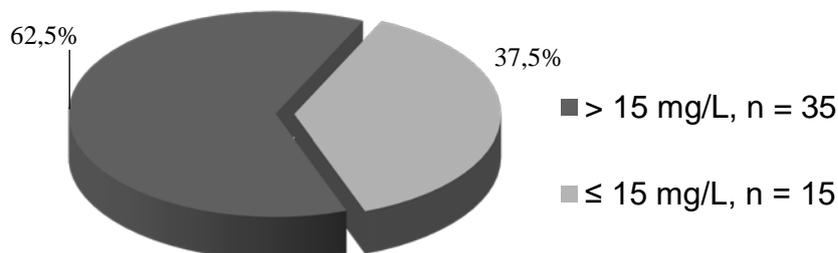
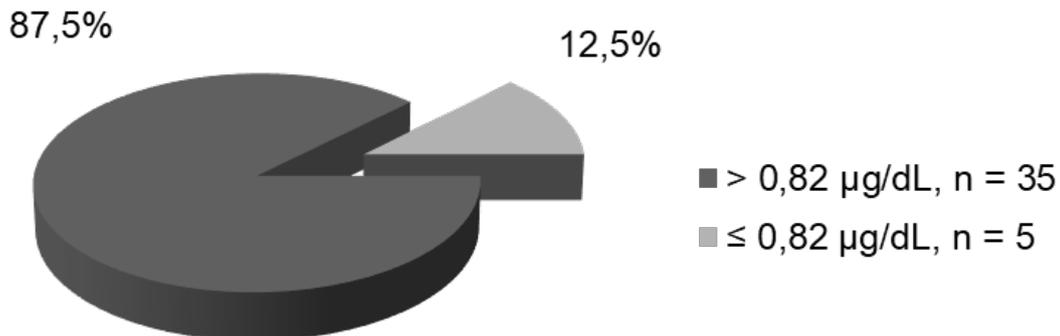


Figura 1: Ferritina sérica (µg/L) en escolares asistentes a un Hospital Pediátrico público de La Plata

La concentración media de ferritina en la población estudiada (Fig. 1), fue $23.0 \pm 15.0 \mu\text{g/L}$, donde el 37.5 % (n=15) presentó niveles por debajo del límite ($\leq 15 \mu\text{g/L}$), mientras que el 62.5 % (n=25) presentó depósitos normales de hierro ($> 15 \mu\text{g/L}$).

En la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud (ENNyS) del año 2005 (Kogan & col, 2008), la determinación de ferritina se realizó en niños 6 a 23 meses y en mujeres embarazadas de 10 a 49 años. La prevalencia de deficiencia de hierro (ferritina menor a $15 \mu\text{g/L}$) fue en niños del 35,3% y en mujeres de 18,7%.

Figura 2: Zinc sérico ($\mu\text{g/L}$) en escolares asistentes a un Hospital Pediátrico público de La Plata



Los niveles séricos medios de Zn, fueron $121.7 \pm 36.0 \mu\text{g/dL}$ (Fig. 2). El 12.5 % (n=5) presentó deficiencia ($< 0.82 \mu\text{g/dL}$) mientras que el 87.5% (n=35) presentó reservas adecuadas ($> 0.82 \mu\text{g/dL}$).

Conclusión parcial. Más de la tercera parte de la población infantil estudiada presentó deficiencia de Fe y dado que las premezclas resultaron muy pobres aportadoras respecto a las harinas comerciales de trigo, se destaca la importancia del agregado de Fe a las premezclas libres de gluten.

En cambio, respecto al Zn, las premezclas contienen mayor cantidad de Zn que las harinas de trigo, por lo cual no sería atribuible al contenido del mineral en la premezclas las deficiencias en la décima parte de la población.

4.3 HARINAS ALTERNATIVAS

A través de trabajos previos propios se disponía de antecedentes en harinas alternativas como arveja, lino, amaranto, trigo sarraceno, etc (Ferreyra & 2015; Giacomino & 2013; Dyner & 2011; Frías & col, 2011). Sin embargo, se seleccionaron harinas utilizadas ampliamente en la alimentación humana desde tiempos remotos como maíz y arroz, así como otras cuyo empleo para consumo humano ha aumentado en los últimos años como sorgo y soja. También se tuvo en cuenta disponibilidad y costo. Por otro lado, según bibliografía, la utilización de harinas de arroz, maíz y soja permite obtener buenas características tecnológicas y sensoriales (Ribotta & col., 2004; Schober & col., 2003).

Las muestras estudiadas fueron harinas de arroz cruda y extrudida, maíz integral extrudida, sorgo integral extrudida y refinada (cruda y extrudida), soja semidesgrasada extrudida. A efectos de su caracterización se determinó la composición en macronutrientes (Tabla 6). Todas las muestras provinieron de partidas utilizadas en la elaboración de productos de consumo masivo o libres de gluten, obtenidas como se dijo previamente en la planta procesadora del Centro de Cereales y Oleaginosas (INTI).

Tabla 6. Composición centesimal (g %) de las harinas estudiadas.

Harinas	Humedad	Cenizas	Proteínas	Grasa	FDT*	CH**
Arroz cruda	11,3 ± 0,3	0,39 ± 0,01	7,2 ± 0,1	0,7 ± 0,1	2,7 ± 0,2	77,8
Arroz extrudida	8,5 ± 0,2	0,42 ± 0,01	8,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	3,1 ± 0,6	79,4
Maíz integral extrudida	10,3 ± 0,3	1,23 ± 0,02	7,0 ± 0,1	3,6 ± 0,2	11,8 ± 1,1	66,1
Sorgo integral extrudida	11,0 ± 0,2	1,50 ± 0,02	10,2 ± 0,1	2,7 ± 0,1	13,3 ± 0,5	61,3
Sorgo cruda refinada	12,6 ± 0,3	1,00 ± 0,01	8,5 ± 0,1	2,6 ± 0,1	4,5 ± 0,1	70,8
Sorgo extrudida refinada	9,8 ± 0,2	1,20 ± 0,02	8,7 ± 0,1	1,5 ± 0,1	5,1 ± 0,1	73,7
Soja semidesgrasada extrudida ¹	7,5 ± 0,2	5,50 ± 0,21	42,4 ± 0,1	12,9 ± 0,2	21,5 ± 0,1	10,3
Soja semidesgrasada extrudida ²	7,6 ± 0,1	6,51 ± 0,42	44,8 ± 0,1	11,5 ± 0,1	18,8 ± 0,3	10,9

*FDT: Fibra dietaria total; **CH: Carbohidratos; ^{1,2} distintas partidas de soja

El contenido de humedad, cenizas, proteínas, grasa, fibra dietaria total y carbohidratos, se encontró en el rango de los informados en las Tablas de Composición de alimentos nacionales (Argenfoods, 2017), USDA (Departamento de Agricultura de Estados Unidos, 2017), y Tablas Alemanas (Souci & col, 1994).

Los valores obtenidos para arroz, tanto en la harina cruda como extrudida, respondieron a la composición propia del arroz, con bajo porcentaje de proteínas (7,2 - 8,2 %), muy bajo contenido de grasas (0,4 - 0,7 %) y de fibra dietaria (2,7 - 3,1 %). La utilización como principal ingrediente de muchos de los productos libres de gluten, junto a almidón de maíz, fécula de mandioca o papa, explicarían el bajo contenido proteico y de fibra dietaria que caracterizan a los productos libres de gluten.

La harina de maíz se obtuvo a partir del grano entero. Presenta un porcentaje de proteínas similar al arroz (7 %), pero es reconocida su baja calidad proteica debido a la deficiencia no solo en lisina como todos los cereales, sino también en triptófano (Pita Martín de Portela, 2006). El porcentaje de grasa, si bien es bajo (3,6 %), fue superior a las harinas de arroz. La fibra dietaria (11,8 %), fue muy superior a los valores hallados en la harina de arroz y los presentes en las féculas.

La harina de sorgo se ha utilizado tradicionalmente para alimentación animal. Sin embargo, en Argentina desde hace pocos años, empresas de primera línea la utilizan como ingrediente minoritario en la formulación de productos de consumo masivo (galletitería, alfajores, etc.) (Dyner & col, 2017; Lopez & col, 2016). Se ha propuesto su uso en productos libres de gluten por la menor velocidad de endurecimiento de la masa, buenas propiedades aglutinantes y espesantes y capacidad antioxidante, aunque la calidad tecnológica es inferior a la harina de trigo. Las muestras estudiadas fueron todas de sorgo blanco, ya que otras variedades que también se cultivan en el país, presentan alto contenido de taninos condensados no recomendables para consumo humanos (sorgo marrón). Además de las propiedades sensoriales aceptables que presentan las harinas de sorgo blanco, su uso también se justifica por su menor costo y las ventajas en el cultivo (resistencia a la sequía y al calor). Las muestras refinadas con o sin extrusión, presentaron una disminución muy marcada en el nivel de fibra dietaria respecto a la integral (4,5 - 5,1 % vs 13,3%). La reducción en proteínas (8,6 % vs 10,2%) y grasa (1,5 - 2,6 % vs 2,7 %), no fue tan pronunciada.

Respecto a la soja, debido a su elevado contenido de grasa, se debe realizar un desgrasado parcial previo a la extrusión, proceso durante el cual también se inactivan enzimas como las lipooxigenasas aumentando la estabilidad de la harina frente a la oxidación. Su consumo se recomienda, entre otros

aspectos, por el importante aporte de fibra dietaria. En las muestras de harina de soja semidesgrasada extrudidas, se destaca tanto el alto porcentaje de proteínas (42,4 y 44,8%), como el de fibra dietaria (18,8 y 21,5%). La grasa se encontró en porcentajes (11,5 y 12,9 %), similares a los niveles informados para harinas parcialmente desgrasadas (11,5%, USDA 2017). El porcentaje de carbohidratos es tan solo del 10,6 %. Por sus características nutricionales y tecnológicas, constituye una alternativa muy apreciada en la elaboración de alimentos libres de gluten (Ribotta & col., 2004).

Conclusión parcial. Se caracterizaron a través de la composición centesimal distintas harinas con o sin extrusión. Al comparar los valores obtenidos, se observó que el contenido de proteínas fue moderado en las harinas de arroz, sorgo y maíz (7 - 10,2 %) y elevado en soja semidesgrasada (43 %). El contenido de materia grasa fue muy bajo en las muestras de arroz (0,6 %), bajo en sorgo y maíz (1,5 - 3,6 %) y moderado en soja semidesgrasada (12 %). Las harinas con menor contenido de fibra dietaria fueron arroz y sorgo refinado (2,7 – 5,1 %), mientras que fue intermedio en maíz y sorgo integral (11,8 - 13,3 %) y muy elevado en soja semidesgrasada (20 %). El contenido de carbohidratos fue elevado en los cereales (60 – 80 %), mientras que la soja semidesgrasada presentó un valor muy inferior (10,6%).

Minerales. El contenido de minerales en los granos está influenciado por las características de los suelos, técnicas de cultivo (en particular fertilizantes utilizados) y condiciones climáticas. Luego de la cosecha, influyen el tipo de molienda y nivel de refinación de la harina con eliminación variable de las capas externas del grano y del germen. También hay eliminación parcial de los inositoles fosfatos y de la fibra dietaria, pudiendo aumentar la disponibilidad potencial de cada mineral.

En la Tabla 7 se presenta el contenido de Fe, Zn, Ca, Mg, Na, K y Cu, expresados en mg/100g.

Tabla 7. Contenido de minerales (mg/100g) de las harinas estudiadas.

Harinas	Fe	Zn	Ca	Mg	Na	K	Cu
Arroz cruda	0,18 ± 0,01	1,76 ± 0,06	5,3 ± 0,5	36 ± 5	5,3 ± 0,1	53 ± 2	0,14 ± 0,03
Arroz extrudida	0,57 ± 0,07	1,48 ± 0,03	6,6 ± 0,7	43 ± 2	2,3 ± 0,1	68 ± 5	0,14 ± 0,02
Maíz integral extrudida	3,30 ± 0,34	2,10 ± 0,09	11,7 ± 0,9	116 ± 3	1,0 ± 0,1	387 ± 12	0,12 ± 0,01
Sorgo integral extrudida	6,58 ± 0,06	2,81 ± 0,07	21,5 ± 2,7	157 ± 13	4,5 ± 0,1	473 ± 6	0,45 ± 0,02
Sorgo refinada cruda	1,98 ± 0,03	1,80 ± 0,03	8,6 ± 0,8	124 ± 2	1,3 ± 0,1	278 ± 1	0,17 ± 0,01
Sorgo refinada extrudida	2,88 ± 0,18	1,90 ± 0,02	9,8 ± 0,4	130 ± 7	4,0 ± 0,1	338 ± 7	0,21 ± 0,01
Soja semidesgrasada extrudida ¹	14,03 ± 0,42	4,42 ± 0,32	436,7 ± 92,0	291 ± 17	0,6 ± 0,1	1333 ± 50	1,33 ± 0,09
Soja semidesgrasada extrudida ²	7,10 ± 0,1	3,61 ± 0,1	277,6 ± 7,6	299 ± 1	1,0 ± 0,1	354 ± 9	1,17 ± 0,10

^{1,2}distintas partidas de soja

Los resultados obtenidos fueron similares a los indicados en Tablas de Composición de alimentos nacionales (Argenfoods, 2017), USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, 2017), y Tablas Alemanas (Souci & col, 1994).

Las harinas de arroz resultaron las de menor contenido de Fe (0,18-0,57 mg/100g), seguidas de sorgo refinada con y sin extrusión y maíz (1,98 - 3,30 mg/100g). La refinación provocó fuerte disminución del Fe en sorgo (6,6 a 2-2,9 mg/100g). El nivel hallado en soja fue muy dispar (7,1 – 14,0 mg/100g), lo cual podría deberse a partidas de diferentes años.

Respecto al Zn, los valores hallados en los cereales (1,48 - 2,81 mg/100g), fueron superiores a los resultados propios obtenidos en harinas de trigo comerciales (no detectable - 0,36 mg/100g). El valor hallado en soja fue superior (3,6-4,4 mg/100g).

El rango hallado para Ca, fue muy bajo para todas las harinas de cereales (5,3 – 21,5 mg/100g), mientras que las distintas partidas de soja presentaron valores superiores y muy diferentes entre sí (278 - 436 mg/100g).

En lo referente al contenido de Mg, las harinas de arroz presentaron el menor contenido (36 - 43 mg/100g), mientras que, en las harinas de sorgo y maíz integral, el rango fue muy superior (116 - 157 mg/100g). La soja semidesgrasada fue quien presentó el mayor valor (291 - 299 mg/100g).

El Na se encontró en niveles sumamente bajos en todas las harinas (< 5,3 mg/100g).

El contenido de K en las harinas de arroz fue muy bajo (53 - 68 mg/100g). En el resto de los cereales fue elevado en harina de maíz integral (387 mg/100g) y sorgo integral (473 mg/100g). En este último caso, la reducción fue importante con la refinación (278 - 338 mg/100g). En soja los valores fueron muy dispares (354 y 1333 mg/100g). En todas las muestras se encuentra naturalmente en niveles muy superiores al Na.

La OMS recomiendan reducir la ingesta de Na (< 2000 mg), con el objetivo de hacer frente al creciente aumento de enfermedades coronarias e hipertensión arterial (OMS, 2012). Considerando que el Institute of Medicine, National Academies of Sciences (2005), ha propuesto una relación (en peso) K/Na > 2, se observó en todos los casos una relación muy superior a 2 (NAS, 2005).

Para Cu los valores fueron similares para todos los cereales (0,12-0,45 mg/100g), mientras que en soja se hallaron valores superiores (1,17 – 1,33 mg/100g).

Conclusión parcial. Estos resultados indicarían que, de acuerdo al tipo de harinas y proporciones utilizadas en las formulaciones de productos libres de gluten, el contenido de Fe, podría encontrarse en niveles muy variables y en algunos casos sensiblemente inferiores a las harinas de trigo comerciales enriquecidas.

Respecto al resto de los minerales, el contenido de Zn fue superior a la harina de trigo; el contenido de Mg fue bajo en arroz y comparativamente elevado en soja.

El contenido de Na fue muy bajo, aspecto positivo para su inclusión en la formulación de productos saludables. En relación al K, las harinas de arroz presentaron valores muy bajos, fueron superiores en maíz y sorgo integral, y el mayor contenido se observó en soja semidesgrasada

4.4 DESARROLLO DE PREMEZCLAS LIBRES DE GLUTEN

Una de las recomendaciones de la OMS (2004), es la diversificación de ingredientes, a efectos de ampliar el limitado número de productos consumidos en algunas dietas. Esto se fundamenta no solo en la complementación y aporte de nutrientes de distintas fuentes, sino también por la presencia de componentes bioactivos que pudieran estar en ingredientes que no son usualmente utilizados (Taylor & col., 2014; Awika & col, 2004).

Se desarrollaron 10 premezclas con el objetivo de disponer de productos que faciliten a nivel hogareño la elaboración de una amplia variedad de platos de uso cotidiano. Como se dijo previamente, se formularon premezclas para productos panificados en general (panadería, pan de molde), farináceos dulces (galletitas dulces, bizcochuelo, budín, panqueques) y platos salados (pastas, ñoquis, pizza, rebozador).

Además de los ingredientes usuales en las premezclas comerciales (harina de arroz y féculas), se incluyeron las siguientes harinas: maíz integral, sorgo blanco refinada y soja semidesgrasada, todas extrudidas. La utilización de harinas obtenidas por extrusión, se fundamentó en los beneficios que el proceso proporciona (Singh & col, 2007; Abd El-Hady & col, 2003).

Se seleccionaron las premezclas que presentaron propiedades funcionales y características organolépticas evaluados por el grado de aceptabilidad global y sensorial y su conveniencia de uso (Focus

Group). En las Fig. 3 y 4, se presentan algunos de los productos finales.

Los distintos ingredientes en orden decreciente de proporciones se presentan en Tabla 8

Tabla 8. Ingredientes en orden decreciente de proporciones de premezclas libres de gluten desarrolladas.

Premezcla	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	Ingredientes minoritarios
1-Panadería y repostería	Harina de arroz	Harina de sorgo	Almidón de maíz	Leche entera deshidratada	Harina de soja	Sal		
2-Pan de molde	Almidón de maíz	Harina de sorgo	Harina de arroz	Azúcar	Ovoalbúmina en polvo	Sal		Contiene un sobre de 10g de levadura
3-Galletitas dulces	Azúcar	Harina de arroz	Harina de sorgo	Almidón de maíz	Leche entera deshidratada	Harina de soja	Huevo entero en polvo	Leudantes químicos
4-Biscochuelo	Azúcar	Huevo entero en polvo	Harina de arroz	Harina de sorgo	Almidón de maíz	Leche entera deshidratada	Harina de soja	Emulsionantes Leudantes químicos
5-Budín	Azúcar	Huevo entero en polvo	Harina de sorgo	Almidón de maíz	Harina de arroz	Harina de soja	Leche entera deshidratada	Emulsionantes Leudantes químicos
6-Panqueques	Harina de arroz	Huevo entero en polvo	Harina de sorgo	Almidón de maíz	Leche entera deshidratada	Harina de soja	Sal	
7-Pastas	Harina de arroz	Harina de sorgo	Almidón de maíz	Huevo entero en polvo	Leche entera deshidratada	Harina de soja	Sal	Estabilizante
8-Pizza	Almidón de maíz	Harina de sorgo	Harina de arroz	Dextrosa	Leche entera deshidratada	Ovoalbúmina en polvo	Estabilizantes	Emulsionantes Leudantes químicos Contiene sobre con 10 g de levadura
9-Ñoquis	Papa deshidratada	Harina de arroz	Harina de sorgo	Almidón de maíz	Huevo entero en polvo	Leche entera deshidratada	Harina de soja	Sal
10-Rebozador	Harina de maíz	Harina de sorgo	Harina de soja	Sal				

Todas las harinas fueron extrudidas; Harina de arroz: extrudida; Harina de maíz: integral extrudida; Harina de sorgo: blanco refinada extrudida; Harina de soja: semidesgrasada.

Al comparar los ingredientes utilizados y el orden relativo de proporciones respecto a las muestras comerciales, se observa:

- si bien se utilizaron harina de arroz y almidón de maíz, las proporciones fueron diferentes respecto a las utilizadas en las premezclas comerciales debido al agregado de otras materias primas.
- la harina de sorgo blanco extrudida, se utilizó en todas las premezclas.
- la harina de soja semidesgrasada extrudida se utilizó en 8 de las 10 premezclas.
- huevo entero en polvo o derivados en 8 de las 10 premezclas.
- leche entera en polvo en 8 de las 10 premezclas.
- en las 3 premezclas para preparaciones dulces, se utilizó azúcar como primer ingrediente. Sin embargo, el 2º fue huevo entero en polvo.

En función de lo anterior, fue posible obtener premezclas con diversificación de los ingredientes utilizados e incorporando materias primas de buena calidad nutricional.

Composición de premezclas. Los resultados obtenidos de la composición centesimal de la premezclas desarrolladas se presentan en Tabla 9.

Tabla 9. Composición centesimal (g/100g) y Valor Energético (VE) (kcal/100g) de premezclas libres de gluten desarrolladas

Premezcla	Humedad	Cenizas	Proteínas	Grasas	FDT*	CH	VE
1 - Panadería y repostería	9,7 ± 0,1	2,74 ± 0,06	10,9 ± 0,1	5,5 ± 0,1	4,6 ± 0,1	66,7	360
2 - Pan de molde	9,3 ± 0,1	2,37 ± 0,03	5,9 ± 0,1	5,4 ± 0,3	2,8 ± 0,2	74,1	369
3 - Galletitas dulces	6,8 ± 0,1	1,34 ± 0,14	9,9 ± 0,1	9,5 ± 0,2	3,2 ± 0,1	69,3	402
4 - Bizcochuelo	5,2 ± 0,1	2,73 ± 0,05	12,8 ± 0,3	13,9 ± 0,1	2,6 ± 0,2	62,9	431
5 - Budín	4,8 ± 0,1	1,82 ± 0,01	13,8 ± 0,4	11,8 ± 0,9	2,7 ± 0,1	65,1	422
6 - Panqueques	7,9 ± 0,2	3,10 ± 0,03	19,7 ± 0,3	12,3 ± 0,1	5,1 ± 0,4	51,9	397
7 - Pastas	7,7 ± 0,1	3,27 ± 0,05	15,4 ± 0,2	11,8 ± 0,1	4,7 ± 0,1	57,1	396
8 – Ñoquis	8,4 ± 0,1	2,99 ± 0,06	13,1 ± 0,2	6,8 ± 0,0	4,4 ± 0,5	64,4	371
9 – Pizza	9,0 ± 0,1	2,59 ± 0,02	5,6 ± 0,1	6,6 ± 0,0	3,6 ± 0,4	72,7	372
10 - Rebozado	9,6 ± 0,1	3,84 ± 0,09	11,1 ± 0,2	5,8 ± 0,1	13,5 ± 0,9	56,1	321
\bar{x}	7,8	2,68	11,9	8,9	4,7	64,0	384

*FDT: Fibra dietaria total

El contenido de proteínas fue relativamente bajo en pan de molde y pizza (5,9 y 5,6 % respectivamente), mientras que en el resto de las muestras estuvo comprendido entre 9,9 – 19,7 %, con un valor medio de 11,9 %. Este porcentaje duplica el promedio obtenido en las premezclas comerciales (4,9 %). Entre las premezclas de mayor consumo previsto, se destaca la de panadería y repostería con buen porcentaje proteico (10,9 %).

Los valores de grasa total compatibles con las características deseadas para los productos diseñados, se encontró en el rango 5,4 - 13,9 %. Al igual que en proteínas, el valor medio (8,9 %), duplica el obtenido en las premezclas comerciales (2,8 %).

En fibra dietaria los valores se encontraron en el rango del 2,6 - 5,1 %, excepto en el rebozador (13,5 %). En este caso, el contenido fue superior debido al agregado de harina de maíz integral y soja semidesgrasada, ambas con alto contenido de fibra. El valor medio obtenido (4,7%), es superior al obtenido en las muestras comerciales (3,4 %).

El promedio de carbohidratos (64 %), es menor al valor hallado en las premezclas comerciales (77,5 %). Dado que se calcularon por diferencia a 100, los datos son consistentes con el mayor porcentaje de proteínas, grasa total y fibra de las premezclas desarrolladas.

El VE estuvo comprendido entre las 321 - 431 kcal/100 g, con un promedio de 384 kcal/100g. Si bien el nivel calórico fue mayor a los productos comerciales, la distribución energética es más equilibrada ya que la fuente predominante no son carbohidratos. Las premezclas para productos dulces fueron las que presentaron mayor VE debido a su formulación (Tabla 8).

Conclusión parcial. Fue posible la obtención de premezclas de buenas características funcionales y sensoriales incorporando harinas de maíz, sorgo y soja semidesgrasada extrudidas, más agregado de huevo en polvo o derivados y leche entera, además del uso de harinas o féculas usualmente utilizadas en productos comerciales. Las premezclas presentaron mayor contenido proteico, grasa total y de fibra dietaria que los productos comerciales libres de gluten con un VE ligeramente superior.

Contenido mineral de las premezclas desarrolladas. Los resultados obtenidos se presentan en Tabla

Tabla 10. Contenido de minerales (mg/100g) de las premezclas desarrollada

Premezcla	Fe	Zn	Ca	Mg	Na	K
1 - Panadería y repostería	1,6 ± 0,1	1,05 ± 0,02	131 ± 2	302 ± 1	612 ± 3	352 ± 4
2 - Pan de molde	1,3 ± 0,1	0,45 ± 0,02	23 ± 1	193 ± 1	854 ± 7	97 ± 1
3 - Galletitas dulces	2,1 ± 0,1	0,84 ± 0,01	94 ± 1	217 ± 1	137 ± 4	247 ± 4
4 - Bizcochuelo	2,5 ± 0,1	1,02 ± 0,03	204 ± 2	139 ± 1	564 ± 6	196 ± 1
5 - Budín	1,7 ± 0,1	0,95 ± 0,03	119 ± 1	182 ± 2	329 ± 5	227 ± 1
6 - Panqueques	2,9 ± 0,1	1,55 ± 0,01	160 ± 3	297 ± 1	663 ± 5	371 ± 4
7 - Pastas	2,5 ± 0,1	1,49 ± 0,01	165 ± 1	317 ± 1	871 ± 2	392 ± 1
8 - Pizza	2,2 ± 0,1	1,05 ± 0,01	105 ± 2	289 ± 1	455 ± 5	564 ± 1
9 - Ñoquis	2,3 ± 0,1	0,48 ± 0,01	84 ± 2	138 ± 1	845 ± 6	155 ± 3
10 - Rebozador	3,7 ± 0,1	1,59 ± 0,03	27 ± 1	131 ± 1	1033 ± 8	468 ± 3
\bar{x}	2,3	1,05	110	221	636	307

El contenido de Fe en las premezclas se encontró en el rango 1,3 – 3,7 mg/100g, con un valor medio de 2,3 mg/100g. Estos niveles fueron superiores a los hallados en las muestras comerciales (0,18 mg/100g) y se encuentran cercanos al valor de la harina de trigo enriquecida (3 mg/100g).

Respecto al Zn, el rango hallado fue 0,45 -1,59 mg/100g, con valor medio de 1,05 mg/100g. Este nivel duplica el hallado en muestras comerciales (0,48 mg/100g).

El contenido de Ca fue en todas las muestras muy bajo, en el rango 23 – 204 mg/100g con un valor promedio de 111 mg/100g. Si bien es ligeramente superior al hallado en los productos comerciales (83 mg/100g), ningún producto sería un aportador importante de este mineral (Dyner& col, 2016).

Los valores hallado para Mg, se encontraron en el rango 131- 317 mg/100g con valor promedio de 221 mg/100g.

En la formulación de los productos se aplicaron pautas de alimentación saludable respecto al Na, mediante la utilización de la mínima cantidad de sal compatible con las características organolépticas. Sin embargo, los valores hallados fueron muy dispares en función de las aplicaciones dulces o saladas, siendo el rango de 137 – 1033 mg/100g, con un valor promedio de 636 mg/100g. Si bien todos los productos cumplen con la Ley de disminución de Na (Ley 26905, 2013), estos niveles son similares al promedio informado de las dos muestras comerciales con agregado de sal en la formulación (656 mg/100g) (Tablas 1 y 2).

El valor de K hallado se encontró en el rango 97 – 564 mg/100g con un valor promedio de 307 mg/100g.

4.5 CONCLUSIONES

- 1) De las encuestas a familias de niños celíacos, surge que por razones económicas y de practicidad, utilizan la misma premezcla básica para la preparación de los distintos productos, ya sean dulces o salados. Se identificaron las cuatro premezclas comerciales libres de gluten más utilizadas.
- 2) A partir del listado de ingredientes en orden decreciente de proporciones, declarados en los envases, se observó que las premezclas comerciales están formuladas con un reducido número de ingredientes. Éstos presentan un perfil nutricional con alto contenido de carbohidratos: almidón de maíz, harina de arroz y féculas de mandioca o papa. Como características saludables se destaca que no se declararon grasas parcialmente hidrogenadas y dos muestras no tenían agregado de sal.

- 3) De acuerdo a los resultados de composición hallados, las premezclas comerciales contienen muy bajo porcentaje de proteínas, grasa total y fibra dietaria, con elevado contenido de carbohidratos, siendo esta la principal fuente del VE que aportan. La diversificación en la formulación de las premezclas con ingredientes más ricos en proteínas, grasa total y fibra, favorecería la ingesta de una dieta más equilibrada de los niños celíacos, con disminución del elevado consumo de carbohidratos.
- 4) El contenido de minerales de las premezclas comerciales, arrojó muy bajo aporte de Fe respecto a la harina de trigo enriquecida, lo cual pone de relevancia la necesidad de considerar el agregado obligatorio de Fe a este tipo de premezclas o alguna de las principales harinas.
- 5) Respecto al contenido de Zn, las premezclas comerciales presentaron valores superiores a la harina de trigo.
- 6) Respecto al Ca, los cereales no son buena fuente de este mineral, por lo cual las premezclas son consistentes con esta característica.
- 7) Entre 3 y 4 de cada 10 niños en edad escolar, que asistieron a un hospital público de La Plata, presentaron valores de ferritina sérica por debajo de las recomendaciones.
- 8) Uno de cada 10 niños presentó niveles de Zn sérico por debajo de las recomendaciones. Sin embargo, esto no sería atribuible al contenido de Zn de las premezclas, ya que éstas presentaron niveles superiores respecto de la harina de trigo.
- 9) Se seleccionaron y caracterizaron harinas tradicionales (arroz y maíz) y alternativas (sorgo y soja), todas extrudidas. El contenido proteico fue moderado (7 - 10%), a excepción de la soja semidesgrasada que presentó un elevado porcentaje (42 %). El contenido de materia grasa fue muy bajo en las muestras de arroz (0,4-0,7%), bajo en las de sorgo y maíz (1,5-3,5%) y moderado en la de soja semidesgrasada (13 %).
- 10) Se estableció el contenido de minerales de interés nutricional en las harinas tradicionales y alternativas: Fe, Zn, Ca, Mg, Na, K y Cu. Todas presentaron bajo contenido de Fe, excepto la soja. Respecto al Zn, las harinas de arroz, sorgo y maíz serían malas aportadoras, seguido de la harina de soja semidesgrasada. Se destaca que todas las harinas resultaron malas aportadoras de Ca. Todas las harinas mostraron una buena relación (en peso) K/Na respecto a las recomendaciones internacionales.
- 11) Fue posible desarrollar 10 premezclas para elaborar una amplia variedad de productos que incluyeran panificados, así como productos dulces y salados, todos con buenas características organolépticas. Se utilizaron harinas de sorgo y soja semidesgrasada extrudidas, harina de arroz extrudida y se agregó huevo en polvo o derivados y leche entera en polvo. Esto permitió diversificar las materias primas utilizadas no limitándose a un reducido número de ingredientes.
- 12) La composición de las premezclas desarrolladas duplicó el contenido proteico y de grasa total de las premezclas comerciales. La fibra dietaria si bien fue superior, sería recomendable su aumento si las características tecnológicas y sensoriales lo permitieran.
- 13) El Fe se encontró en niveles muy superiores a las premezclas comerciales y cercano a la harina de trigo enriquecida.
- 14) Respecto al Zn, se duplicó el valor hallado en muestras comerciales, mientras el Ca si bien es superior, ningún producto sería un aportador importante de este mineral.
- 15) El valor de Na en la premezclas desarrolladas fue similar al promedio informado en las dos muestras comerciales con agregado de sal. De acuerdo a pautas saludables, sería recomendable su reducción u ofrecer premezclas sin sal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. (2000). *Official Methods of Analysis*. 17th edition. Vol. I y II. Published by the Association of Official Analytical Chemists, (W. Horwitz Ed). Maryland, USA.
- Abd El-Hady E.A., Habiba R.A. (2003). Effect of soaking and extrusion conditions on antinutrients and protein digestibility of legume seeds. *LW und Technologie*. **36**(3) 285-93.
- Anton A., Gary Fulcher R., Arntfield S.D. (2009). Physical and nutritional impact of fortification of corn starch-based extruded snacks with common bean (*Phaseolus vulgaris* L) flour: effects of bean addition and extrusion cooking. *Food Chemistry*. **113**, 989-96.
- Añón M.C., Puppo M-C., Pedrosa-Islas R., Oliette B. Villagomez-Zabala D (2009). "Valor nutricional y saludable de materias primas para la elaboración de productos de panificación". En: "Aspectos nutricionales y saludables de los productos de panificación". (Lutz. M. y León A. ed). Universidad Valparaíso, Chile Ed. 73-123.
- Argenfoods. "Tabla de composición de alimentos". Disponible en: (<http://www.unlu.edu.ar/argenfood/Tablas/Grupo/Cereales.pdf>). Consultado 12 marzo 2017.
- Awika J.M., Rooney L.W. (2004). Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. Review. *Phytochemistry* **65**: 1199–221.
- Bengoa J.M. (2007). Nutrition in public health: an unfinished story. First World Congress on Public Health Nutrition. *Food Nutr Bull*. **28** (2): 243-5.
- Catassi C., Yachha S.K. (2009). The epidemiology of celiac disease. In: The science of gluten-free foods and beverages (Arendt E.K, Dal Bello F., Ed). AACC International. USA, pp. 1-13.
- CODEX STAN 118 (1979, actualizado 2008). Codex standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten. Disponible en: (<http://www.codexalimentarius.net>). Consultado el 6 marzo 2017.
- Código Alimentario Argentino. Capítulo XVII, Alimentos de régimen o dietéticos. Art. 1383. Disponible en: (http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XVII.pdf). Consultado: 20 enero 2017.
- Código Alimentario Argentino. Capítulo V, RESOLUCIÓN GMC Nº 46/03 – Reglamento Técnico Mercosur sobre el Rotulado Nutricional de Alimentos Envasados Item 3.5.1. Disponible en (http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_V.pdf). Consultado 1 julio 2017.
- de Garine I. (2007). Social Science and Malnutrition. First World Congress on Public Health Nutrition. *Food Nutr Bull*. **28** (2): 245-7.
- Dyner L., Ferreyra V., Sánchez E., Cagnasso C., Olivera Carrión M. (2017) Composición y contenido de minerales de harinas de sorgo blanco utilizadas en productos de consumo general y en productos libres de gluten. *DIAETA (en prensa)*
- Dyner L., Cagnasso C., Ferreyra V., Pita Martín de Portela, M., Apro N., Olivera Carrión M. (2016). Contenido de Calcio, fibra dietaria y fitatos en diversas harinas de cereales, pseudocereales y otros. *Acta Bioquímica Latinoamericana*, **50** (3): 435-43.
- Dyner, L.M. (2011). Nuevo enfoque sobre el valor nutricional del amaranto como ingrediente de alimentos tradicionales y de nuevas formulaciones. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- FAO. (2002). Food energy – methods of analysis and conversion factors. Food and Nutrition Paper 77. Report of a Technical Workshop, Rome.
- Ferreyra V., Cagnasso C., Sánchez E., Fornés D., Parzanese M., Canepare C., et al. (2015). Obtención en planta piloto de harinas de trigo sarraceno (*Fagopyrum sagittatum ghibib*) y evaluación de sus características nutricionales. Fournier M. *Heladería Panadería Latinoamericana*. **238**: 58–62.
- Frias J., Giacomino S., Peñas E. Pellegrino N., Ferreyra V., Apro N. et al. (2011). Assessment of the nutritional quality of raw and extruded *Pisum sativum* L. var. Laguna seeds. *LWT- Food Sci Technol*. **44** (5): 1303-8.
- Gallagher E., Gomrley T.R., Sabat R. (2004). Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends Food Sci Technol*, **15**: 143-52.
- Gambus H., Gambus F., Sabat R. (2002). The research on quality improvement of gluten-free bread by *Amaranthus* flour addition. *Zywnosc*. **9**: 99-112.
- García-Manzanares A., Lucendo A.J. (2011). Nutritional and dietary aspects on celiac disease. Review. *Nutr Clin Pract*; **26** (2): 163-73.

- Giacomino S., Peñas E., Ferreyra V., Pellegrino N., Fournier M., Apro N. *et al.* (2013). Extruded flaxseed meal enhances the nutritional quality of cereal-based products. *Plants Foods Hum Nutr.* **68** (2): 131-6.
- Gómez J. C., Selvaggio G., Viola M., Pizarro B., la Motta G., de Barrio S *et al.* (2001). Prevalence of Celiac Disease in Argentina: Screening of an adult population in the La Plata Area. *Am. J. Gastroenterol.*; **96**: 2700-04.
- Guevara-Pacheco G., Chávez-Cortés E., Castillo-Durán C. (2014). Deficiencias de micronutrientes y enfermedad celíaca en pediatría. *Arch Argent Pediatr.* **112** (5):457-63
- Gujral H.S., Rosell C.M. (2004). Improvement of breadmaking quality of rice flour by glucose oxidase. *Food Res Int.*, **37**: 75-81.
- Gujral H.S., Guardiola I., Carbonell J.V., Rosell C.M. (2002). Effect of cyclodextrinase on dough rheology and bread quality from rice flour. *J Agr Food Chem*, **51**: 3814-3818.
- Institute of Medicine (2005). Dietary Reference Intakes, The National Academies of Sciences (NAS).
- Kapur G., Patwari A.K., Narayan S., Anand V.K. (2003). Iron supplementation in children with coeliac disease. *Indian J Pediatr*, **70**: 955-8.
- Kirby M., Danner E. (2009) Nutritional deficiencies in children on restricted diets. *Pediatr Clin North Am.* **56** (5): 1085-103.
- Kogan L., Abeyá Gilardón E., Biblieri A., Mangialavori G., Calvo E., Durán P. (2008). Anemia: la desnutrición oculta. Resultados de la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud (ENNyS). Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. Disponible en: (<http://www.sap.org.ar/docs/profesionales/anemia-la-desnutricion-oculta.pdf>). Consultado 3 de mayo 2017
- Kupper C. (2005). Dietary guidelines and implementation for celiac disease. *Gastroenterology*, **128**: S121-7.
- Ley 26905 (2013). Ley de disminución del consumo de sodio. Ministerio de Salud. Argentina. Disponible en: (<http://www.infoleg.gob.ar>). Consultado 25 abril 2017.
- Ley 25.630. (2002). Enriquecimiento de harinas en Argentina. Decreto Reglamentario Nº 597/03. Disponible en: (<http://www.infoleg.gob.ar>). Consultado 23 marzo 2017.
- Lopez L.B., Martín M.E., Ronayne de Ferrer P. (2016). Declaración de alérgenos alimentarios en rótulos de alimentos habitualmente consumidos por niños. *DIAETA.* **34** (155): 15-24.
- Marugan De Miguelsanz J.M.; Ordóñez Bayón M.J.; Rodríguez Martínez, A. M. (2001). Análisis dietético en niños con enfermedad celíaca y alimentación exenta de gluten. Hospital Nueva León. España. *Bol pediatría.* **41**: 161-162.
- Matos Segura M.E., Rosell C.M. (2011). Chemical composition and starch digestibility of different gluten-free breads. *Plant Foods for Human Nutrition.* **66** (3): 224-30.
- Meyer D., Stavropolous S., Diamond B., SHane E. (2001). Osteoporosis in a North American adult population with celiac disease *Am J Gastroenterol.* **96** (1): 112-9.
- Midge K., Elaine D. (2009) Deficiencias nutricionales en niños con dietas restrictivas. *Pediatr Clin N Am*; **56** 1085–1103.
- Niewinski M.M. (2008). Advances in Celiac Disease and Gluten-Free diet. Review. *J Am Diet Assoc.* **108**: 661-72.
- OMS (2012): Sodium intake for adults and children. Disponible en: (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77985/1/9789241504836_eng.pdf). Consultado 2 de junio 2017
- OMS. (2004). En: Estrategia Mundial sobre Régimen Alimentario, Actividad Física y Salud. Disponible en: (<http://www.who.int/dietphysicalactivity/strategy/eb11344/strategy>). Consultado 12 marzo 2017.
- Panel on Dietary Reference Intakes for Electrolytes and Water. (2005). Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes Food and Nutrition Board. & Institute of Medicine, National Academy of Sciences, Washington, D.C.
- Pelegri Calvo C. (2011). Evaluación del estado de salud y nutricional de pacientes celíacos de la Comunidad de Valencia (tesis Doctoral). Universidad de Valencia.
- Perez G., Docena G., Curciarello R. (2009). "Productos de panificación dirigidos a grupos especiales de población". En: "Aspectos nutricionales y saludables de los productos de panificación". (Lutz. M. y León A. ed). Universidad Valparaíso, Chile Ed. 174-89.
- Pérez-Navarrete C., Betancur-Ancona D., Casotto M., Carmona A., Tovar J. (2007). Efecto de la extrusión sobre la biodisponibilidad de proteína y almidón en mezclas de harinas de maíz y frijol lima. *Archivos Lat Nut.* **57** (3): 278-86.
- Perkin-Elmer. (1982). Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry. Perkin-Elmer. Connecticut, USA.
- Pita Martín de Portela M.L. (2015, a) Hierro, Cap 20. En: Aspectos nutricionales de vitaminas y minerales en el Siglo XXI. (AATA ed) Latingráfica, Buenos Aires, pp. 241-62.

- Pita Martín de Portela M.L. (2015, b) Zinc, Cap 21. En: Aspectos nutricionales de vitaminas y minerales en el Siglo XXI . (AATA ed) Latingráfica, Buenos Aires, pp. 263-76.
- Pita Martín de Portela M.L. (2015, c) Calcio, Cap 17. En: Aspectos nutricionales de vitaminas y minerales en el Siglo XXI . (AATA ed) Latingráfica, Buenos Aires, pp. 207-28.
- Pita Martín de Portela M.L. (2006). "Componentes nutricionales del grano de maíz". En "Maíz y Nutrición", Serie de Informes Especiales, ILSI Argentina, pp: 44-50.
- Ribotta P.D., Ausar S., Morcillo Pérez GT, Beltramo D.M., León A.E. (2004). Production of gluten free bread using soybean flour. *J Sci Food Agric*, **84**: 1969-74.
- Rosell C.M. (2009). "Enzymatic manipulation of gluten-free breads". In: "Gluten-free food science and technology". (Gallagher E ed). Wiley-Blackwell, London, pp 83-98.
- Sánchez P.M.A., Varela G.N.S., Torres S.M.R., Valdéz L.R., Zacarías V.P.J., Martínez V.L.E. (2005). Consumo de una harina de maíz fortificada y su impacto en el estado nutricional de una población infantil. *Medicina Universitaria*. **7**: 209-14.
- Serdula M., Peña-Rosas J.P., Maberly G.F., Parvanta I. (2010). Flour Fortification with Iron, Folic acid, Vitamin B12, Vitamin A and Zinc: Proceedings of the second technical workshop on wheat flour fortification. *Food Nutr Bull*. **31**: 53-56.
- Singh S, Gamlath S and Wakeling L. (2007). Nutritional aspects of food extrusion: a review. *Int J Food Sci. Technol.* **42**: 916–929.
- Schober T.J., Messerschmidt M., Bean S.R., Park S.H., Arendt E.K. (2004). Gluten free bread from sorghum: quality difference among hybrids. *Cereal Chem*, **82**: 394-404.
- Souci S.; Fachmann W. & Kraut H. (1994). Food Composition and Nutrition Tables. 5th ed. Medpharm & CRC Press, Stuttgart.
- Taylor J.R.N., Belton P.S., Beta T., Duodu K.G. (2014). Increasing the utilisation of sorghum, millets and pseudocereals: Developments in the science of their phenolic phytochemicals, biofortification and protein functionality. Review. *J Cereal Sci*. **59**: 257-75.
- USDA. (2017). Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. National Nutrient database for Standard references, Release 22 Disponible en: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/research/>. Consultado 15 abril 2017.
- Xu J, Bietz JA, Carriere CJ. (2007). Viscoelastic properties of wheat gliadin and gluten in suspensions. *Food Chemistry* **101**, 1025-1030.

AGRADECIMIENTOS.

Se agradece a la Universidad de Buenos Aires el financiamiento parcial a través del Proyecto: "Caracterización de harinas crudas y extrudidas y alimentos elaborados destinados a grupos poblacionales con necesidades especiales", Código 20020160100060BA, UBACyT 2017-2019,

COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS CARDIOVASCULARES DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON β -BLOQUEANTES O AMLODIPINA EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS

Julieta S DEL MAURO¹, Paula D PRINCE², Martín DONATO³, Marcela A MORETTÓN⁴⁻⁵, Germán E GONZÁLEZ⁵, Facundo M BERTERA, Andrea CARRANZA⁷, Susana B GORZALCZANY¹, Diego A CHIAPPETTA⁵, Celina MORALES⁸⁻⁹, Ricardo J GELPI¹⁰, Carlos A TAIRA¹, Christian HÖCHT¹.

¹ Cátedra de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA; ²CONICET. Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL)-CONICET; ³Instituto de Fisiopatología Cardiovascular (INFICA); ⁴Dpto. de Patología, Fac. de Medicina, UBA; ⁵Cátedra de Tecnología Farmacéutica I, Dpto. de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; ⁶ Dpto. de Patología de la Facultad de Medicina -UBA.; ⁷ Cátedra de Fisiopatología - Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA; ⁸ Instituto de Fisiopatología Cardiovascular Dpto de Patología.Facultad de Medicina. UBA; ⁹Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL); ¹⁰ Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA

INDICE

RESUMEN	149
AGRADECIMIENTOS	150
INTRODUCCIÓN	150
MATERIALES Y MÉTODOS	151
Análisis estadístico	153
Consideraciones éticas	153
RESULTADOS	153
DISCUSIÓN	161
CONCLUSIÓN	164
REFERENCIAS	164

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue determinar los efectos de la administración oral crónica de atenolol, nebivolol, carvedilol o amlodipina sobre la variabilidad de la presión arterial de corto plazo y el daño de órgano blanco en el ventrículo izquierdo y la aorta torácica. Se incluyeron ratas espontáneamente hipertensas que fueron tratadas durante 8 semanas con una única administración diaria de atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Se determinó la presión arterial y su variabilidad a corto plazo y se realizó ecocardiografía. Se extrajo el ventrículo izquierdo y la aorta torácica para determinar la expresión del factor de crecimiento transformante β , el factor de necrosis tumoral α y la interleuquina 6. También se realizaron estudios histológicos en ambos órganos. Aunque el tratamiento crónico con atenolol, nebivolol, carvedilol y amlodipina redujo la presión arterial media, únicamente los β -bloqueantes de tercera generación y la amlodipina disminuyeron la variabilidad de corto plazo (WKY: $3,8 \pm 0,2$ mmHg; SHR: $6,2 \pm 0,3^a$ mmHg; SHR Atenolol: $5,4 \pm 0,3^a$ mmHg; SHR Nebivolol: $4,2 \pm 0,2^{b,c}$ mmHg; SHR Carvedilol: $4,0 \pm 0,2^{b,c}$ mmHg; SHR Amlodipina $3,5 \pm 0,1^{b,c}$ mmHg; ^a $p < 0,05$ versus ratas WKY; ^b $p < 0,05$ versus SHR; ^c $p < 0,05$ versus SHR Atenolol). El análisis del daño de órgano estableció que nebivolol y carvedilol reducen el contenido de fibrosis ventricular, disminuyen el espesor de la media aórtica e inducen una mayor reducción de la sobreexpresión del factor de crecimiento transformante β , el factor de necrosis tumoral α y la interleuquina 6 en ambos órganos en comparación con SHR tratadas con vehículo o atenolol y de manera similar a la amlodipina. Estos hallazgos sugieren que la mayor reducción de la labilidad de la presión arterial contribuiría en la superior protección del daño de órgano por el nebivolol y el carvedilol respectivamente.

PALABRAS CLAVES : Amlodipina, atenolol, carvedilol, daño de órgano blanco, nebivolol, ratas espontáneamente hipertensas, presión arterial, variabilidad de la presión arterial.

ABREVIATURAS			
DE	Desvío estándar	TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
IL-6	Interleuquina 6	TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
PA	Presión arterial	VI	Ventrículo izquierdo
PAM	Presión arterial media	VPA	Variabilidad de la presión arterial
PAS	Presión arterial sistólica	WKY	WistarKyoto
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas		

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue respaldado por becas de la Secretaría de Ciencia y Técnica, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Martín Donato, Germán E. González y Carlos A. Taira son investigadores de carrera de CONICET.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, las sucesivas guías de tratamiento de la hipertensión arterial (HTA), tanto en Europa como en Estados Unidos, han considerado a los β- bloqueantes como fármacos de primera línea (1). Sin embargo, desde hace un tiempo, los β-bloqueantes han dejado de ser recomendados para la terapia inicial en sujetos hipertensos no complicados, a partir de hallazgos obtenidos en estudios clínicos y meta-análisis, que demostraron una inferioridad de los β-bloqueantes respecto de otros agentes antihipertensivos en la reducción de accidentes cerebrovasculares y de la mortalidad cardiovascular total, a pesar de las diferencias relativamente pequeñas en términos de disminución de la presión arterial (PA) (2,3). En el estudio clínico LIFE, el tratamiento con el β-bloqueante atenolol se asoció a una mayor incidencia de eventos cardiovasculares mayores en comparación con el antagonista del receptor de angiotensina II, losartán (4). No obstante, cabe aclarar que en dicho estudio clínico y en los meta-análisis que concluyeron en inferioridad por parte de los β-bloqueantes, el atenolol ha sido el fármaco evaluado en la mayoría de los de segunda generación que a dosis terapéuticas posee cierta selectividad por el receptor β₁-adrenérgico (alrededor de 10 veces mayor respecto al adrenoceptor β₂), no presenta acción vasodilatadora periférica ni efectos pleiotrópicos.

La PA central, conceptualmente definida como la PA en el punto de salida del ventrículo izquierdo (VI) hacia la aorta, representa la presión directa ejercida sobre el cerebro, el corazón y los riñones y ha demostrado mayor correlación con el daño de órgano blanco y la incidencia de eventos cardiovasculares en comparación con la PA braquial o periférica. El análisis Conduit Artery Function Evaluation (CAFE), un subestudio del Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT), fue el primer ensayo clínico extenso que determinó el efecto del tratamiento antihipertensivo sobre la PA central (6). Aunque no se encontraron diferencias en los valores de PA braquial en individuos aleatorizados a recibir atenolol o amlodipina, la estimación de la presión central evidenció valores significativamente más bajos para el grupo tratado con el bloqueante cálcico. Más aún, la presión aórtica central se asoció directamente con el punto final compuesto de eventos cardiovasculares y el desarrollo de alteraciones renales. Debido a que durante el envejecimiento las arterias pierden sus propiedades elásticas, el atenolol y otros β-bloqueantes no vasodilatadores serían menos efectivos para disminuir la PA central en dosis que modifican la PA braquial. Por lo tanto, estos fármacos resultarían menos efectivos para proteger frente a eventos cardiovasculares en pacientes mayores (6). Contrariamente, nuevos estudios sugieren que los

β -bloqueantes de tercera generación presentan la capacidad de disminuir la PA central en mayor medida que los β -bloqueantes más antiguos, pese a reducciones similares de la PA braquial (7).

La diferencia en la capacidad cardioprotectora de los antihipertensivos también puede explicarse debido a la distinta eficacia en términos de control de la VPA. La presión arterial no es un parámetro constante sino que sufre de oscilaciones espontáneas tanto a corto (de minutos a horas) como a largo plazo (meses) (8). El incremento de la VPA se ha establecido como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de lesión de órgano blanco no sólo en pacientes hipertensos sino también en sujetos normotensos (8,9). Teniendo en cuenta esta relación, actualmente se postula que la reducción de la VPA debe ser considerada como una posible nueva meta terapéutica del tratamiento de la HTA, razón por la cual los fármacos antihipertensivos no sólo deben ser capaces de disminuir la PA sino también controlar su variabilidad (10). En este contexto, una amplia cantidad de estudios establece que la labilidad de la PA se asocia positivamente con la aparición de eventos cardiovasculares independientemente del valor de tensión arterial. Más aún, aproximadamente el 68% de las variaciones en la PA pueden ser atribuidas a efectos diferenciales entre antihipertensivos de distinta clase (11). Con respecto a este punto, un análisis a post hoc de los resultados obtenidos en el estudio ASCOT-BPLA demostró que el bloqueante cálcico amlodipina ejerce una mayor protección frente a eventos cardiovasculares en pacientes hipertensos al compararse con el bloqueante β -adrenérgico atenolol, como consecuencia de su mayor capacidad de reducir la VPA a corto y largo plazo (12). Aunque se desconoce el mecanismo por el cual el atenolol incrementa la VPA a largo plazo, este fenómeno se ha observado en numerosos ensayos clínicos realizados en los últimos 15 años (5).

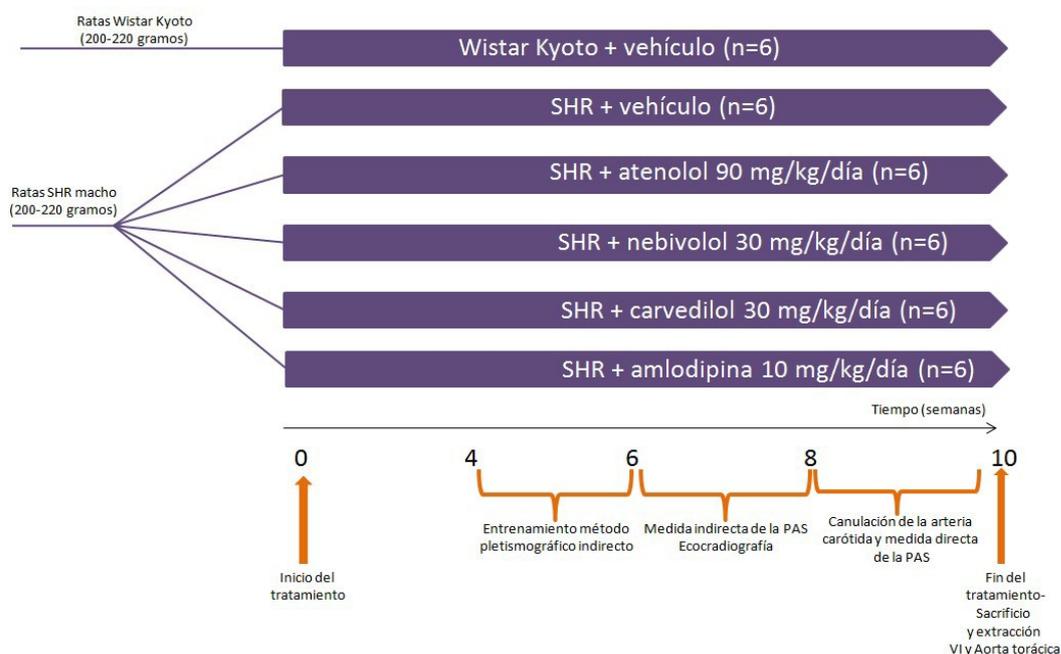
Los β -bloqueantes constituyen un amplio grupo farmacológico que presenta características heterogéneas en términos de selectividad β_1 -adrenérgica, actividad simpaticomimética intrínseca, liposolubilidad, semivida de eliminación, efectos sobre el metabolismo de hidratos de carbono y lípidos, y propiedades vasodilatadoras (5). A diferencia de los β -bloqueantes vasodilatadores de tercera generación, como el carvedilol y el nebivolol, reducen la PA central y mantienen un perfil metabólico neutral (2). Pese a ello, la superioridad de los β -bloqueantes de tercera generación por sobre el atenolol en términos de reducción de la VPA no fue evaluada a nivel clínico. El nebivolol es un β -bloqueante de tercera generación altamente cardioselectivo que ejerce un efecto vasodilatador por activación de la enzima óxido nítrico sintasa a través de su agonismo sobre los receptores β_2 -adrenérgicos (13). Por su parte, el carvedilol, además de su antagonismo sobre el receptor β -adrenérgico, se caracteriza por presentar bloqueo α_1 -adrenérgico a nivel periférico junto a numerosos efectos pleiotrópicos que contribuyen consistentemente a la protección del daño de órgano blanco (2). Tanto el carvedilol como el nebivolol presentan un efecto antioxidante directo por unión y neutralización de especies reactivas de oxígeno e indirecto por inhibición de la enzima NADPH oxidasa (14).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, un gran interrogante consiste en determinar si los hallazgos obtenidos para el atenolol en diversos estudios clínicos pueden ser extrapolados a otros β -bloqueantes, como el nebivolol y el carvedilol, que muestran propiedades farmacológicas adicionales. El objetivo del presente trabajo de investigación fue comparar el efecto de los bloqueantes β -adrenérgicos atenolol, carvedilol y nebivolol y el bloqueante cálcico amlodipina sobre la PA, su variabilidad y el daño de órgano blanco en el VI y la aorta torácica de animales SHR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon ratas macho espontáneamente hipertensas (SHR) (200-220 g) que fueron tratadas durante 8 semanas con atenolol 90 mg/kg/día (n=6), nebivolol 30 mg/kg/día (n=6), carvedilol 30 mg/kg/día, amlodipina 10 mg/kg/día o vehículo (n=6), diariamente por vía oral mediante el uso de trocar. Un cuarto grupo de ratas Wistar Kyoto (WKY) tratadas con vehículo fueron empleadas como control normotenso (Figura 1).

Figura 1. Diseño experimental y grupos de estudio



Durante la 2 últimas semanas de tratamiento, se evaluó la PAS en animales despiertos mediante el método indirecto pletoimográfico utilizando un esfigmomanómetro en la cola de la rata y un micrófono conectado a un amplificador Grass D.C. (modelo 7DAC, Grass Instruments Co. Quincy, MA, USA) acoplado a un polígrafo (modelo 79D, Grass Instruments Co. Quincy, MA, USA). Las ratas fueron entrenadas al método no invasivo detail-cuff3 veces a la semana durante 2 semanas previo a las determinaciones finales y bajo las mismas condiciones experimentales. Las ratas fueron acondicionadas en una habitación silenciosa y termostata a 28°C durante 60 minutos. Luego, los animales fueron colocados sobre una almohada térmica a 37°C dentro de un restrainer de acrílico con el esfigmomanómetro y el micrófono colocados sobre la cola. Después de 3 minutos de calor centralizado en la arteria de la cola de las ratas para lograr una adecuada vasodilatación y la obtención de pulso arterial se registró el valor de la PAS como el promedio de seis mediciones realizadas durante un período de 10 minutos. Se descartaron las medidas consideradas aberrantes por movimientos del animal o artefactos (15). Además, el experimento se realizó siempre en el mismo horario, iniciando a las 13:00 horas, con el fin de evitar interferencias del ritmo circadiano de la presión arterial sobre los valores obtenidos. Por último, se determinó el DE intradía de la PAS, a partir del DE de las seis mediciones consecutivas de la PAS para cada animal en un mismo día y el DE entredía de la PAS, se calculó como el DE del promedio de PAS obtenido para un mismo animal cada uno de los días en donde se realizó el experimento. En la última semana de tratamiento se realizaron mediciones ecocardiográficas con un ecógrafo (Acuson Sequoia C512, Siemens, Berlín, Alemania) equipado con un transductor de 7-14 Mhz en ratas anestesiadas con mezcla ketamina 35 mg/kg y xilazina 5 mg/kg. Luego, cumplidos los 2 meses de tratamiento, se canuló la arteria carótida y 24 horas después, los animales se conectaron a un transductor de presión Spectramed P23XL (Spectramed, Oxnard, CA, USA), acoplado a un polígrafo Grass 79D (Grass Instruments, Quincy, MA, USA) y a un convertidor digital (Polyview, PVA 1, Grass- Astro Med, West Warwick, RI USA). De esta manera, se obtuvieron registros continuos de PA durante dos horas que se analizaron con el software Polyview 2.3 (Astro-Med, West Warwick, RI, USA) estimándose la PAS, que por su sitio de toma representa la PA central. La VPA a corto plazo fue estimada a partir del cálculo del desvío estándar (DE) de la PA y el coeficiente de variación porcentual de la PA (CV%) a partir de registros de PA de 3 minutos (16).

Finalizada la determinación de los parámetros hemodinámicos, los animales fueron sacrificados con guillotina extrayéndose el VI y la aorta torácica para la evaluación del daño de órgano blanco. Como marcador morfológico de la hipertrofia ventricular se evaluó la relación entre el peso del VI y el peso corporal utilizando una balanza de precisión (modelo AR1140, OHAUS, New Jersey, USA) (17). Se realizó

La evaluación histopatológica del VI y de la aorta torácica sobre secciones transversales de tejido de 5 μm de espesor. Las aortas fueron teñidas con hematoxilina-eosina (H-E) mientras que los VI fueron coloreados con la tinción Sirius Red en la cual las fibras de colágeno se tiñen de color rosado y el resto del tejido intersticial de color amarillo. Se tomaron fotografías microscópicas de las secciones empleando un microscopio (Olympus CX31 microscope, Japan) acoplado a una cámara digital (UCMAD3 Olympus, Japan). A nivel ventricular se determinó la Fracción de Colágeno Intersticial (FCI), mientras que a nivel aórtico se evaluó el espesor de la túnica media aórtica y la relación espesor de la media/diámetro de la luz empleando un software analizador de imágenes (ImagePro-Plus 3.0; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA para los ventrículos izquierdos e ImageJ 1.49 V Wayne Rasband, National Institute of Health, USA para las aortas)(18,19).

Finalmente, como marcadores bioquímicos del daño de órgano blanco se determinó la expresión de la citoquina profibrótica -factor de crecimiento transformante β (TGF- β)- y los mediadores proinflamatorios -interleuquina 6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α)- en homogenatos de VI y de aorta torácica mediante la técnica de Western Blot. Los homogenatos (20 μg) se corrieron en gel de poliacrilamida con SDS (12%). La transferencia se realizó sobre membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) y luego del bloqueo fueron incubadas overnight con: mouse anti-TGF β (PM=13 kDa), goat anti-TNF α (PM= 17 kDa), goat anti-IL6 (PM= 21 kDa) y rabbit anti-Tubulina (PM=52 kDa) como control de carga. Las proteínas fueron detectadas por quimioluminiscencia mediante el uso de una película fotográfica y luego cuantificadas con el programa ImageJ(20).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La distribución normal de los datos y las variables del estudio se comprobaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media (EEM). La comparación estadística entre los grupos de tratamiento fue realizada mediante ANOVA de una vía y la aplicación del método de Tukey como test a posteriori utilizando GraphPad Prism versión 6.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). La significación estadística se definió como $p < 0,05$.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con los "Principios de cuidado de los animales de laboratorio" (publicación de NIH No. 85-3, Revisión de 1985) y fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL-FFyB) (EXP-UBA N°0062949/2015).

RESULTADOS

El análisis de la PA indirecta por el método de tail-cuff estableció que únicamente el tratamiento con atenolol y amlodipina disminuyó de manera significativa el incremento de la PAS de los animales SHR. En la evaluación de la PA directa, a nivel carotídeo, se determinó que los animales SHR presentaron un aumento de la PAS y de la frecuencia cardíaca. Aunque el atenolol y el carvedilol redujeron significativamente la PAS central, la administración del β -bloqueante de tercera generación nebivolol o amlodipina restableció los valores hasta alcanzar el nivel de presión de los animales WKY normotensos. En

igual sentido, si bien el atenolol disminuyó la frecuencia cardíaca, el nebivolol y el carvedilol mostraron un efecto más pronunciado, no así la amlodipina que presentó una acción taquicardizante (Tabla 1).

La estimación de la VPA por el método indirecto reveló que tanto los β - bloqueantes como la amlodipina reducen sustancialmente la fluctuación intradía de la PAS, un parámetro relacionado con la VPA de corto plazo. Sin embargo, únicamente el nebivolol, el carvedilol y la amlodipina revirtieron completamente el DE intradía de la PAS. La mayor atenuación de la VPA de corto plazo evidenciada con el nebivolol y el carvedilol, respecto al atenolol, fue confirmada en el análisis directo de PA. Si bien el atenolol redujo levemente el DE de la PA, los β -bloqueantes de tercera generación y el bloqueante cálcico mostraron un efecto superior. Más aún, aunque los cuatro agentes antihipertensivos estudiados disminuyeron el CV% de la PA en comparación con los animales hipertensos tratados con vehículo, el carvedilol y la amlodipina indujeron una reducción significativamente superior de este parámetro de variabilidad en comparación con el atenolol. Por su parte, el nebivolol mostró un efecto mayor que el atenolol, pero dicha diferencia no llega a ser estadísticamente relevante.

El efecto de los tratamientos sobre la VPA de mediano plazo o día-a-día fue evaluado a partir de la estimación del DE entredía de los registros de PAS indirecta. Mientras que carvedilol y atenolol no generaron un cambio significativo en este parámetro hemodinámico, el nebivolol y la amlodipina disminuyeron significativamente el DE entredía de la PAS (Tabla1).

Tabla1. Parámetros hemodinámicos directos e indirectos de ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos indican la media \pm EEM.

Parámetro hemodinámico	WKY (n=6)	SHR (n=6)	SHR Atenolol (n=6)	SHR Nebivolol (n=6)	SHR Carvedilol (n=6)	SHR Amlodipina (n=6)
Presión indirecta (tail cuff)						
PAS indirecta (mmHg)	134 \pm 2	184 \pm 6 ^a	169 \pm 2 ^{a,b}	170 \pm 4 ^a	170 \pm 4 ^a	124 \pm 2 ^{a,b,c,d,e}
DE intradía (mmHg)	3,38 \pm 0,52	9,21 \pm 0,59 ^a	6,42 \pm 0,35 ^{a,b}	3,76 \pm 0,40 ^{b,c}	3,59 \pm 0,35 ^{b,c}	3,08 \pm 0,24 ^{b,c}
DE interdía (mmHg)	3,04 \pm 0,75	10,42 \pm 0,80 ^a	13,90 \pm 2,08 ^a	7,30 \pm 0,84 ^{b,c}	8,55 \pm 1,03 ^{a,c}	6,48 \pm 1,12 ^{b,c}
Presión central en arteria carótida						
PAS directa (mmHg)	126,2 \pm 4,0	189,7 \pm 2,1 ^a	164,2 \pm 1,6 ^{a,b}	132,4 \pm 2,9 ^{b,c,e}	152,5 \pm 3,9 ^{a,b}	127,2 \pm 2,4 ^{b,c,e}
DE de la PA (mmHg)	3,8 \pm 0,2	6,2 \pm 0,3 ^a	5,4 \pm 0,3 ^a	4,2 \pm 0,2 ^{b,c}	4,0 \pm 0,2 ^{b,c}	3,5 \pm 0,1 ^{b,c}
CV de la PA (%)	2,6 \pm 0,1	4,2 \pm 0,2 ^a	3,6 \pm 0,2 ^{a,b}	3,2 \pm 0,2 ^{a,b}	2,9 \pm 0,2 ^{b,c}	3,0 \pm 0,1 ^{b,c}
Frecuencia cardíaca (lpm)	271 \pm 8	397 \pm 13 ^a	360 \pm 10 ^{a,b,f}	381 \pm 10 ^{b,c,f}	270 \pm 15 ^{b,c,f}	417 \pm 7 ^{a,c}
Índice de masa ventricular izquierda (mg/g)	2,17 \pm 0,10	3,51 \pm 0,18 ^a	3,52 \pm 0,02 ^a	2,98 \pm 0,06 ^{a,b,c}	2,95 \pm 0,08 ^{a,b,c}	3,31 \pm 0,13 ^{a,b}

^ap<0,05 vs. WKY; ^bp<0,05 vs. SHR; ^cp<0,05 vs. SHR Atenolol; ^dp<0,05 vs. SHR Nebivolol; ^ep<0,05 vs. SHR Carvedilol; ^fp<0,05 vs. SHR Amlodipina.

Entérminos de funcionalidad y morfología ventricular, hallazgos ecocardiográficos revelaron que los animales hipertensos presentan un aumento en el espesor de la pared anterior y posterior del VI tanto en la sístole como en la diástole respecto de las ratas normotensas, además de una prolongación del tiempo de relajación isovolumétrica (p<0,05). Los β -bloqueantes de tercera generación y la amlodipina

normalizaron el espesor de la pared anterior en la diástole y el espesor de la pared posterior en la sístole, pero sólo el carvedilol y el nebivolol redujeron el espesor de la pared posterior en la diástole. El carvedilol además fue el único que revirtió el espesor de la pared anterior en la sístole. Todos los fármacos antihipertensivos evaluados mejoraron sustancialmente el tiempo de relajación isovolumétrica (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros ecocardiográficos de ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos indican la media \pm EEM.

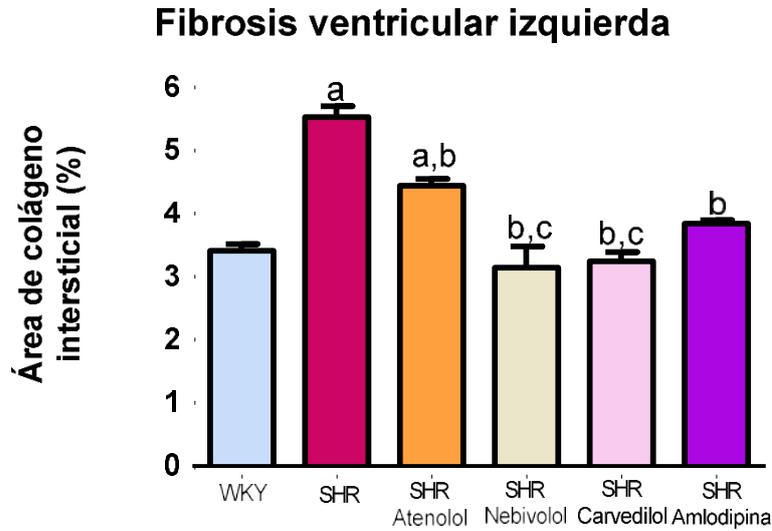
Parámetro ecocardiográfico	WKY (n=6)	SHR (n=6)	SHR Atenolol (n=6)	SHR Nebivolol (n=6)	SHR Carvedilol (n=6)	SHR Amlodipina (n=6)
Espesor de la pared anterior en diástole (mm)	1,44 \pm 0,12	2,28 \pm 0,15 ^a	1,93 \pm 0,07 ^a	1,80 \pm 0,05 ^b	1,58 \pm 0,11 ^b	1,80 \pm 0,03 ^b
Espesor de la pared posterior endiástole (mm)	1,31 \pm 0,08	2,10 \pm 0,11 ^a	2,20 \pm 0,01 ^a	1,80 \pm 0,05 ^{b,c}	1,55 \pm 0,10 ^{b,c,f}	1,98 \pm 0,10 ^a
Espesor de la pared anterior en sístole (mm)	2,31 \pm 0,06	2,83 \pm 0,11 ^a	2,83 \pm 0,11 ^a	2,80 \pm 0,10 ^a	2,05 \pm 0,08 ^{b,c,d,f}	2,58 \pm 0,05
Espesor de la pared posterior en sístole (mm)	2,27 \pm 0,13	2,70 \pm 0,03 ^a	2,87 \pm 0,04 ^a	2,53 \pm 0,01 ^{b,c}	2,08 \pm 0,13 ^{b,c,d}	2,35 \pm 0,03 ^{b,c}
Tiempo de relajación isovolumétrica (mseg)	25,3 \pm 2,4	39,5 \pm 2,1 ^a	29,0 \pm 3,5 ^b	27,0 \pm 0,1 ^b	28,3 \pm 0,6 ^b	23,7 \pm 2,3 ^b
Diámetro de fin de diástole (mm)	6,95 \pm 0,16	6,53 \pm 0,15	6,77 \pm 0,15	7,40 \pm 0,10	6,73 \pm 0,40	7,60 \pm 0,30 ^b
Diámetro de fin de sístole (mm)	4,14 \pm 0,12	4,05 \pm 0,16	4,07 \pm 0,01	4,60 \pm 0,20	4,53 \pm 0,32	4,80 \pm 0,25
Fracción de Eyección (%)	78,6 \pm 1,5	74,4 \pm 3,2	76,1 \pm 3,4	75,3 \pm 2,3	67,4 \pm 2,6 ^a	74,8 \pm 1,5
Fracción de Acortamiento (%)	40,4 \pm 1,4	35,0 \pm 1,6 ^a	41,7 \pm 4,3	37,5 \pm 2,0	34,6 \pm 1,0	36,9 \pm 1,3

^ap<0,05 vs. WKY; ^bp<0,05 vs. SHR; ^cp<0,05 vs. SHR Atenolol; ^dp<0,05 vs. SHR Nebivolol; ^ep<0,05 vs. SHR Carvedilol; ^fp<0,05 vs. SHR Amlodipina.

A nivel morfológico, los animales SHR tratados con vehículo documentaron hipertrofia del VI evidenciada por un aumento significativo de la relación entre el peso del VI y el peso del animal respecto del grupo normotenso WKY (Tabla 1). Mientras que el tratamiento crónico con atenolol no modificó este parámetro en comparación los animales SHR tratados con vehículo, la administración crónica de amlodipina, nebivolol y carvedilol resultó en una reducción del índice de masa ventricular izquierda (Tabla 1). La evaluación histopatológica ventricular estableció la existencia de un incremento en el depósito de colágeno intersticial del VI de los animales SHR en relación a los animales normotensos, evidenciado por una elevación del 62% de la FCI. Si bien el atenolol redujo el contenido de colágeno intersticial, el nebivolol, el carvedilol y la amlodipina revirtieron completamente esta alteración de la estructura histológica cardíaca, reduciendo sustancialmente la fibrosis del VI (Figura 1).

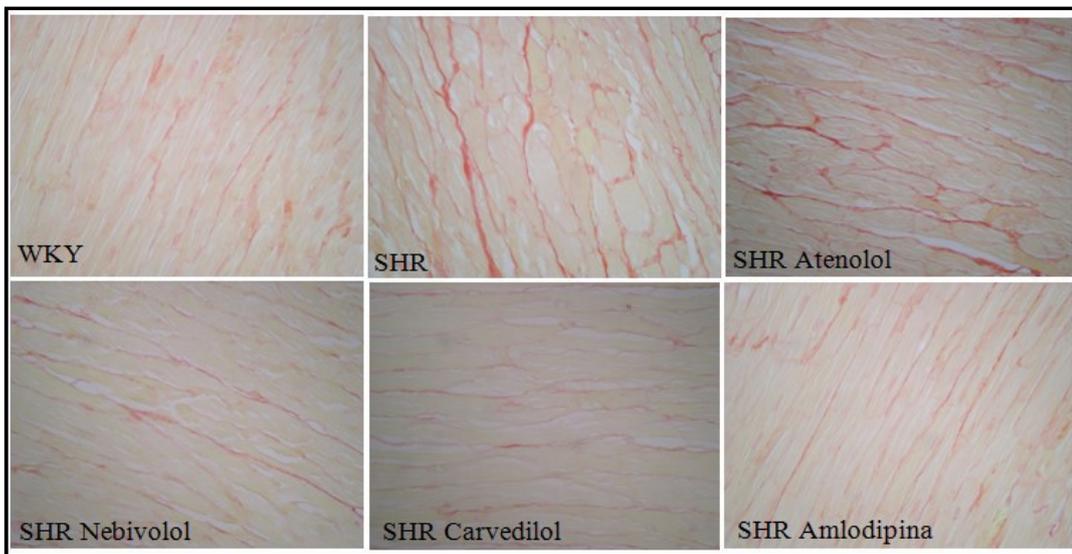
Figura 1. Fibrosis ventricular izquierda (A) e imágenes representativas de los ventrículos izquierdos teñidos con sirius red de ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo (B). Los datos indican la media \pm EEM.

A.



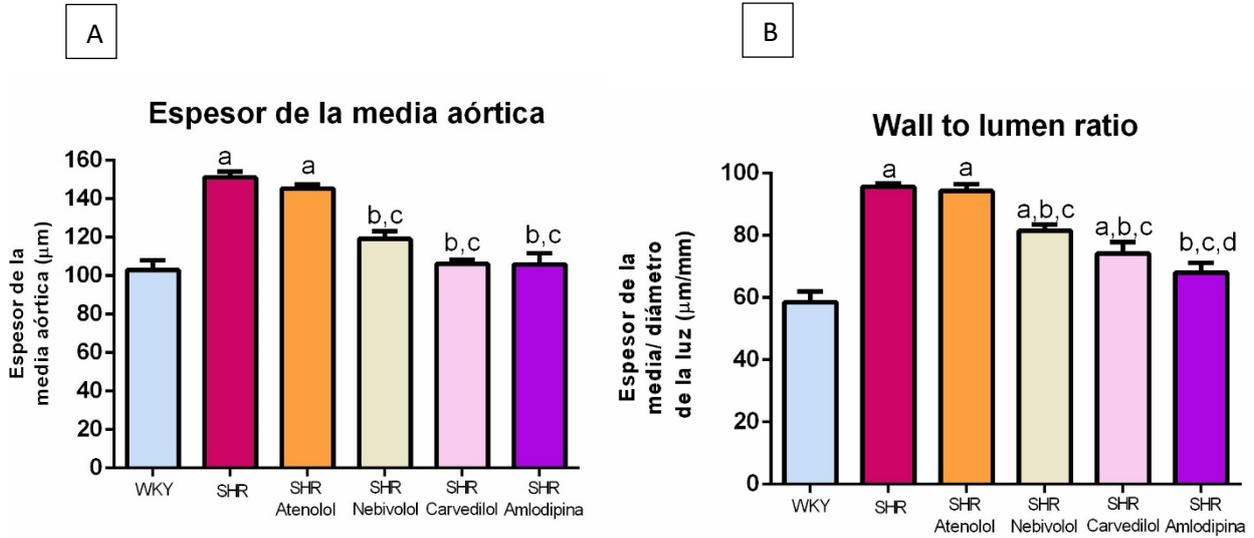
^ap<0,05 vs. WKY; ^bp<0,05 vs. SHR; ^cp<0,05 vs. SHR Atenolol

B.

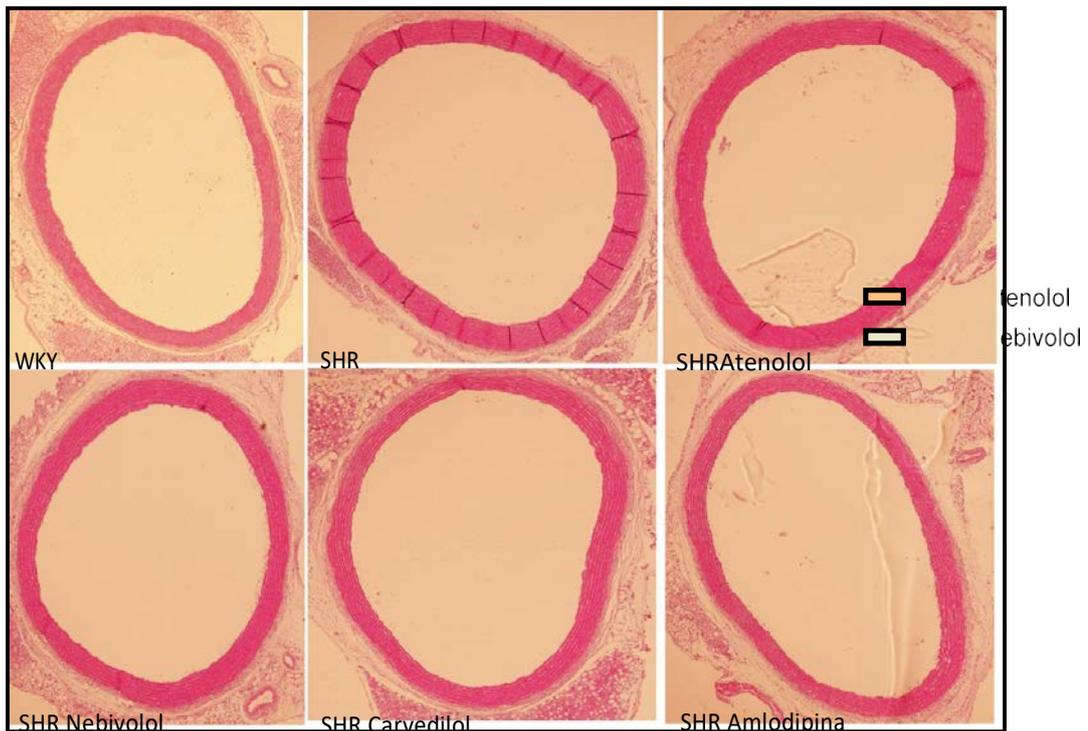


La evaluación morfométrica de la aorta torácica, a partir de la tinción con H-E de sus secciones transversales, reveló que la hipertensión experimental produce un aumento en el espesor de la capa media aórtica y eleva la relación existente entre el espesor de la media y el diámetro de la luz. Tanto los β -bloqueantes de tercera generación como el bloquean tecálcico normalizaron el espesor de la media aórtica y la relación espesor de la media/diámetro de la luz. Sin embargo, en este último parámetro de la morfología aórtica, el análisis de los resultados indica que la amlodipina resultó estadísticamente superior al nebivolol pero no al carvedilol para reducirlo (Figura2).

Figura 2. Espesor de la media aórtica (A), relación espesor de la media aórtica/diámetro de la luz (B) e imágenes representativas de los anillos aórticos teñidos con hematoxilina-eosina de ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo (C). Los datos indican la media \pm EEM.



^ap<0,05 vs. WKY; ^bp<0,05 vs. SHR; ^cp<0,05 vs. SHR Atenolol; ^dp<0,05 vs. SHR Nebivolol.

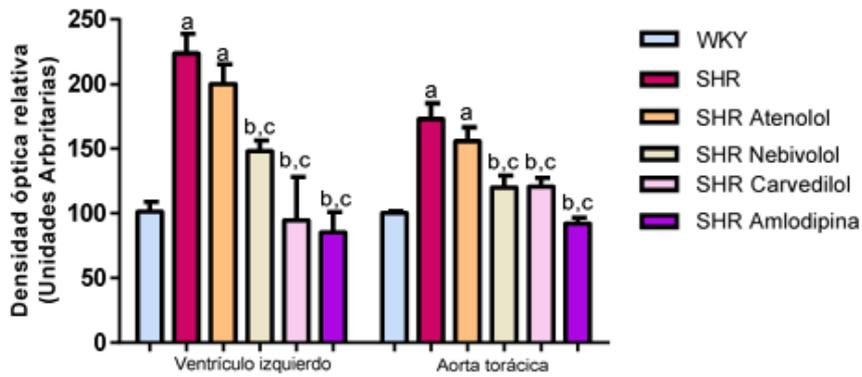


Por último, se realizó la determinación bioquímica del daño de órgano blanco a partir de la evaluación de marcadores moleculares de inflamación y fibrosis. El análisis de los resultados muestra la duplicación de los niveles de TGF- β en los animales SHR respecto de los controles WKY. La administración crónica y oral de nebivolol, carvedilol y amlodipina, pero no de atenolol, normalizó la sobreexpresión de esta citoquina profibrótica tanto a nivel del VI como de la aorta torácica (Figura 3).

Figura 3. Expresión de TGF- β (A) e imágenes representativas (B) de los revelados por western blot en VI y AT de ratas WKY y SHR tratadas de manera crónica con atenolol, nebivolol, carvedilol, amlodipina o vehículo. Los datos se expresan como densidad óptica relativa a los animales WKY controles.

A.

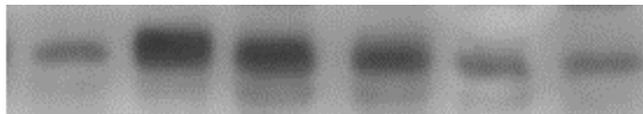
Expresión de TGF- β en Ventrículo Izquierdo y Aorta torácica



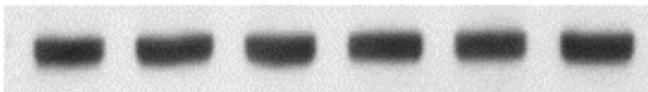
^ap<0,05 vs. WKY; ^bp<0,05 vs. SHR; ^cp<0,05 vs. SHR Atenolol.

B.

Ventrículo Izquierdo

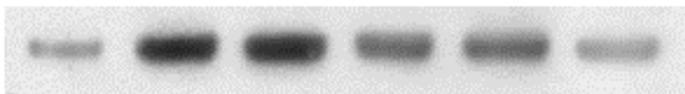


TGF- β 13 kDa



β -Tubulina 52 kDa

Aorta torácica



TGF- β 13 kDa



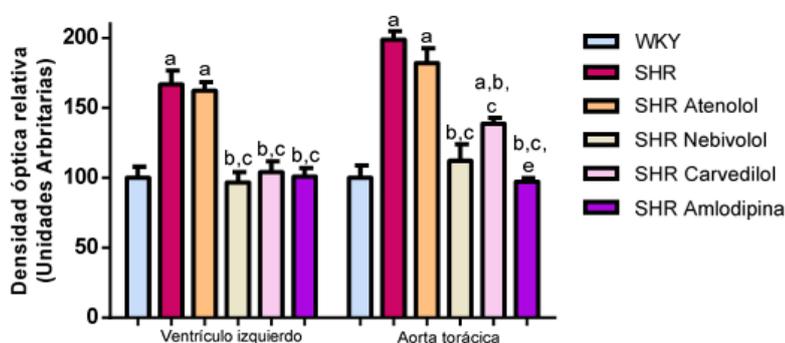
β -Tubulina 52 kDa

En las imágenes representativas del revelado de western blot, los homogenatos fueron sembrados en el mismo orden que se muestran los resultados en el gráfico del ítem A.

Resultados similares se obtuvieron al evaluar los datos obtenido para los mediadores inflamatorios TNF- α e IL-6. En el caso del TNF- α , los animales SHR tratados con vehículo mostraron un aumento del 66% y 98% en los niveles de la citoquina en el VI y la aorta torácica, respectivamente ($p < 0,05$). Aunque en el VI los β -bloqueantes de tercera generación y el bloqueante cálcico atenuaron completamente su sobreexpresión, en la aorta la amlodipina redujo los niveles de TNF- α de manera significativamente superior al carvedilol pero no al nebivolol (Figura 4 A). En el caso de la IL-6, en los animales SHR se observó un aumento del 59% y 215% en los niveles de lacitoquina en el VI y la aorta torácica, respectivamente ($p < 0,05$). En este caso, todos los fármacos evaluados redujeron los niveles de la IL-6 a nivel ventricular, pero en la aorta solo los β -bloqueantes de tercera generación y el bloqueante cálcico disminuyeron significativamente su sobreexpresión, resultando el efecto del nebivolol superior al carvedilol y la amlodipina (Figura 4B).

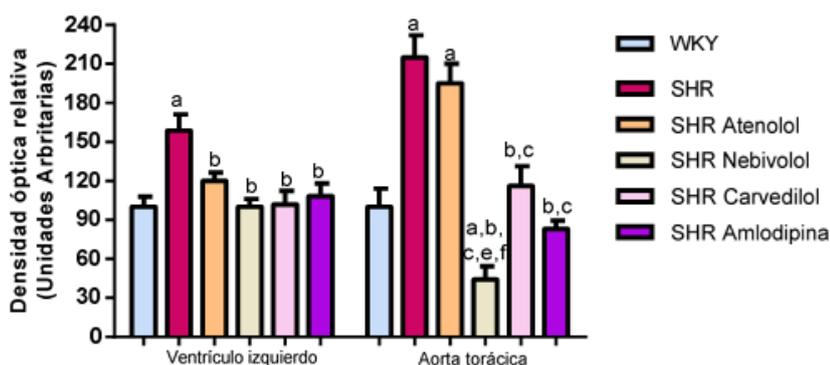
A.

Expresión de TNF- α en Ventriculo Izquierdo y Aorta torácica



B.

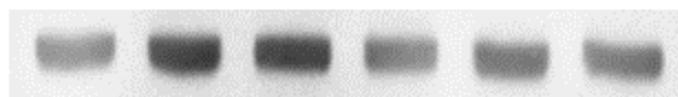
Expresión de IL-6 en Ventriculo Izquierdo y Aorta torácica



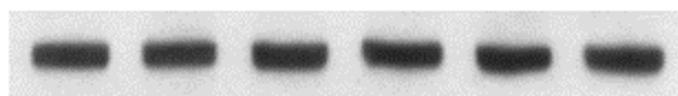
^a $p < 0.05$ vs. WKY, ^b $p < 0.05$ vs. SHR, ^c $p < 0.05$ vs. SHR Atenolol, ^d $p < 0.05$ vs. SHR Nebivolol, ^e $p < 0.05$ vs. SHR

C.

TNF- α en ventrículo izquierdo

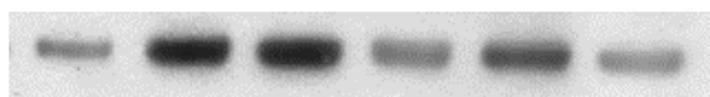


TNF- α 17 kDa



β -Tubulina 52 kDa

TNF- α en aorta torácica



TNF- α 17 kDa

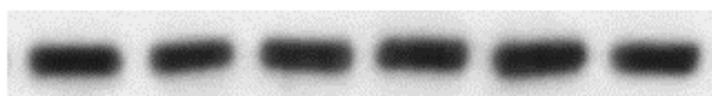


β -Tubulina 52 kDa

IL-6 en ventrículo izquierdo



IL-6 21 kDa



β -Tubulina 52 kDa

IL-6 en aorta torácica



IL-6 21 kDa



β -Tubulina 52 kDa

En las imágenes representativas del revelado de western blot, los homogenatos fueron sembrados en el mismo orden que se muestran los resultados en los gráficos del ítem A y B.

Con el objetivo de determinar la contribución relativa de los distintos parámetros hemodinámicos en el daño de órgano blanco se determinó el cociente de relación de Pearson para establecer la existencia de linealidad entre las variables evaluadas. Las relaciones encontradas entre la PA y la VPA de corto plazo con el daño morfológico o histológico de los órganos evaluados se muestran en la Tabla 3. Se evidenció una correlación positiva entre el índice de hipertrofia ventricular izquierda con la PAS periférica y la VPA determinada de manera directa e indirecta pero no con el nivel de PAS central. De manera similar, la fibrosis ventricular izquierda se asocia positivamente a los niveles de PAS central y de VPA determinada de manera directa e indirecta pero no con la PAS periférica. Por último, el análisis morfométrico de la aorta torácicas ecorrelacionó positivamente con la totalidad de los parámetros de PA y VPA (Tabla3).

TABLA 3. Coeficiente de regresión lineal (Pearson r) entre los parámetros de presión arterial y la variabilidad de presión arterial de corto plazo con los datos histomorfológicos de daño de órgano blanco

	Índice de hipertrofia ventricular izquierda (mg/g)	Fibrosis ventricular (%)	Espesor de la media aórtica (μm)	Espesor de la media/ diámetro de la luz ($\mu\text{m}/\text{mm}$)
PAS (MMHg)	0,4376*	0,4500	0,7435*	0,7790*
DE Intradía (mmHg)	0,4383*	0,5587*	0,6404*	0,6299*
DE Entredía (mmHg)	0,4931*	0,3272	0,3759*	0,5384*
PAM (mmHg)	0,0785	0,6063*	0,4139*	0,4222*
DE de la PA (mmHg)	0,4215*	0,5292*	0,6702*	0,7454*
CV de la PA (%)	0,4116*	0,4113*	0,6769*	0,6021*

* $p < 0,05$

DISCUSIÓN

Las ratas SHR han sido utilizadas durante mucho tiempo como modelo para analizar diferentes aspectos de la HTA, principalmente por su similitud con la hipertensión esencial del humano. Estas semejanzas incluyen la predisposición genética al desarrollo de HTA sin etiología específica, la hiperreactividad vascular, el incremento de la resistencia periférica total y la falla cardíaca tanto diastólica como sistólica (21,22). En el presente estudio, el tratamiento crónico y oral con los β -bloqueantes vasodilatadores de tercera generación nebivolol y carvedilol atenúa de manera marcada la VPA de corto plazo en el modelo SHR. El análisis en conjunto de los resultados de la medición directa e indirecta de la PA establece que el nebivolol y el carvedilol, en una dosis diaria de 30 mg/kg, son capaces de reducir de manera significativa el DE del registro de PA, un reconocido parámetro de la variabilidad de corto plazo.

A nivel indirecto, aunque ninguno de los β -bloqueantes vasodilatadores genera una reducción de la PAS, disminuyen su fluctuación a corto plazo de manera superior al atenolol y equiparable con la amlodipina. La diferente eficacia que presentan algunos fármacos en términos de disminución de la PAS central en comparación con la PAS periférica podría ser una de las causas por las cuales agentes que producen similar reducción de la PA periférica no alcanzan igual protección frente a eventos adversos cardiovasculares(23,24). Nebivolol y carvedilol son capaces de reducir la PA central y su variabilidad de manera superior al atenolol sugiriendo que los β -bloqueantes vasodilatadores brindan un beneficio hemodinámico mayor en comparación con los β -bloqueantes de segunda generación. Estos resultados también establecen que el nebivolol, el carvedilol y la amlodipina resultan más efectivos para controlar la variabilidad de corto plazo de la PA que la PA misma. Más aún, el análisis de la VPA a mediano plazo, estimada a partir del DE inter día de la medición de PAS, establece que tanto el nebivolol como la amlodipina controlan la variabilidad día a día en animales SHR. Para un mismo grupo experimental, las diferencias existentes en los resultados obtenidos entre los datos de PA y su variabilidad establecen la independencia entre dichos factores de riesgo cardiovascular(25).

Actualmente, el efecto de los β -bloqueante vasodilatadores sobre la VPA ha sido escasamente reportado en estudios preclínicos. En trabajos previos, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la administración aguda, por vía intravenosa, de nebivolol o carvedilol en animales SHR, hipertensos por la administración de L-NAME o normotensos pero con aumento de la fluctuación de la PA mediante la técnica de desnervación sino aórtica reduce sustancialmente la VPA de corto plazo (16,26-29). Existen estudios que a nivel clínico evidencian el efecto beneficioso del nebivolol y del carvedilol sobre la VPA. Gapon L y colaboradores han evidenciado que, aunque tanto el atenolol como el nebivolol exhiben propiedades antihipertensivas similares, el tratamiento con nebivolol previene en mayor medida que el atenolol el incremento matutino de la PA y de su variabilidad a lo largo de 24 horas en pacientes con hipertensión de segundo grado (30). Por otro lado, el tratamiento con 25 mg de carvedilol dos veces al día durante 3 meses atenúa el CV de la PA en pacientes con HTA moderada (31).

Un segundo objetivo del presente trabajo fue comparar el efecto del tratamiento crónico con atenolol, nebivolol, carvedilol o amlodipina sobre el daño de órgano blanco en el VI y de la aorta torácica en animales SHR a partir de determinaciones de tipo ecocardiográficas, morfológicas, histológicas y bioquímicas. En primer lugar, a nivel bioquímico, es bien conocido que las citoquinas inflamatorias, como el TNF- α y la IL-6, contribuyen al daño de órgano blanco durante la HTA. Más aún, la activación del TNF- α es un indicador independiente del pronóstico de mortalidad en pacientes con falla cardíaca (32,33). Diversos estudios establecen que en los animales espontáneamente hipertensos los niveles circulantes de TNF- α e IL-6 se encuentran significativamente incrementados (34,35). En nuestro trabajo, las ratas SHR presentan un incremento significativo de la expresión de las citoquinas proinflamatorias. Aunque el tratamiento con atenolol disminuye los niveles ventriculares de IL-6, no modifica la expresión de dicha citoquina en la aorta torácica ni la de TNF- α en ambos órganos estudiados. Estos datos establecen que la eficacia del atenolol para normalizar la expresión de factores profibróticos y proinflamatorios resulta menor al resto de las drogas evaluadas. La administración de nebivolol, carvedilol y amlodipina es capaz de disminuir la respuesta inflamatoria evidenciado por una reducción en los niveles de TNF- α e IL-6 en ambos órganos evaluados. Estudios previos han establecido que tanto el nebivolol como el carvedilol presentan una respuesta antiinflamatoria a nivel cardíaco en roedores (36,37). En este contexto, se evidenció que la activación del receptor β -adrenérgico eleva la expresión de los genes de la familia de IL-6 en fibroblastos cardíacos y promueve la apoptosis inducida por LPS a través del TNF- α (38,39). Por otro lado, el bloqueo de los canales de calcio con amlodipina reduce el estado proinflamatorio asociado a la hipertensión. Navarro- Gonzalez y colaboradores encontraron que el tratamiento con amlodipina de pacientes diabéticos e hipertensos reduce la elevación en los niveles circulantes de ciertas citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6 (40). Además de atenuar los procesos de tipo inflamatorios, únicamente los β -bloqueantes de tercera generación y el bloqueante cálcico fueron capaces de disminuir la sobreexpresión de TGF- β , una citoquina involucrada en procesos fibróticos que participa en el remodelado cardíaco y vascular durante la hipertensión arterial(41,42).

En concordancia con los efectos de los β -bloqueantes de tercera generación sobre los intermediarios proinflamatorios y profibróticos, dichos antihipertensivos fueron capaces de revertir el remodelado vascular y cardíaco propio de la patología hipertensiva evidenciado por hallazgos morfológicos, histológicos y ecocardiográficos. El tratamiento crónico con carvedilol o nebivolol es capaz de prevenir el daño de órgano en el miocardio de manera similar a la amlodipina. La reducción en la sobreexpresión de TGF- β a nivel ventricular para los β -bloqueantes de tercera generación y el bloqueante cálcico está acompañada por una disminución del contenido de colágeno intersticial en el VI y por la reducción del índice de hipertrofia ventricular izquierda. El efecto cardioprotector del nebivolol y el carvedilol, en términos de reducción de la hipertrofia ventricular, ha sido ampliamente reportado en animales SHR (43-45). Recientemente Varagic J y colaboradores revelaron que el nebivolol atenúa el remodelado y la disfunción cardíaca en animales SHR sensibles a través de un efecto independiente de su acción antihipertensiva. Por otro lado, la reducción de la hipertrofia y la fibrosis miocárdica del carvedilol en ratas con infarto agudo de miocardio se encuentra acompañada por una disminución en la expresión de la citoquina profibrótica TGF- β (46,47). En un modelo animal de síndrome metabólico, aunque la administración de nebivolol y atenolol reduce de manera equiparable los niveles de PA, únicamente el nebivolol es capaz de reducir la hipertrofia cardíaca y la sobreexpresión de TGF- β , evidenciando el mayor efecto cardioprotector de los β -bloqueantes vasodilatadores por sobre el atenolol (48). Los efectos beneficiosos de la amlodipina sobre las alteraciones ventriculares asociadas a la hipertensión también se describieron en estudios previos. Así, el tratamiento crónico y oral con amlodipina en dosis de 10 mg/kg/día fue capaz de prevenir la hipertrofia cardíaca y la fibrosis en ratas SHR (49). Los datos ecocardiográficos revelan que los animales espontáneamente hipertensos presentan hipertrofiado el VI, evidenciado por el incremento en el espesor de la pared posterior y anterior de dicho ventrículo tanto durante la sístole como la diástole. El incremento en el tiempo de relajación isovolumétrica, un marcador de la relajación del VI empleado tanto en estudios preclínicos como clínicos, establece la presencia de disfunción diastólica, mientras que la reducción de la fracción de acortamiento indica la existencia de disfunción sistólica (50). Estos hallazgos podrían ser causados por el incremento del depósito de colágeno intersticial de los animales SHR. Aunque todos los fármacos restablecieron el tiempo de relajación isovolumétrica indicando su efecto positivo sobre la disfunción diastólica. Únicamente los β -bloqueantes de tercera generación mostraron disminuir el espesor de la pared ventricular anterior y posterior durante la sístole y la diástole demostrando su elevada capacidad de reducir la hipertrofia ventricular y la fibrosis. Sin embargo, la amlodipina no logró corregir la totalidad de los espesores de la pared ventricular mientras que el atenolol no afectó ninguno de ellos.

Por último, a nivel vascular, el tratamiento crónico con nebivolol y carvedilol fue capaz de revertir el remodelado aórtico y la sobreexpresión de TGF- β de manera equiparable a la amlodipina y superior al atenolol. Estudios previos realizados en animales SHR evidenciaron la capacidad del nebivolol, el carvedilol y la amlodipina de reducir la hipertrofia vascular y el contenido de colágeno en la tunicamedia (51-53).

Con el objetivo de establecer la contribución relativa de la PA y de la VPA sobre la protección del daño de órgano blanco en el VI y la aorta torácica en animales SHR, correlacionamos los parámetros histológicos de daño de órgano con los datos hemodinámicos de los distintos grupos animales. El análisis de regresión establece una relación positiva y estadísticamente significativa entre los datos de morfometría aórtica tanto con la PA como con su variabilidad a corto y mediano plazo. Contrariamente, en el VI la PAS y la PAM no mostraron correlación con alguno de los parámetros evaluados. Estos resultados indican la importancia de la reducción no sólo de la PA sino también de la VPA a corto plazo para reducir el daño de órgano blanco. En este contexto, Xie y colaboradores describieron que el tratamiento a largo plazo con nifedipina, irbesartán o hidroclorotiazida reduce marcadamente la PA e incrementa la sensibilidad del barorreflejo logrando una protección significativa del daño de órgano blanco en animales SHR (54). El grado de VPA y de la sensibilidad del barorreflejo muestran una relación mucho más cercana al daño de órgano blanco a comparación de la PA (54). Más aún, a nivel clínico, un meta-análisis recientemente publicado demostró una correlación positiva entre la VPA a corto plazo y el índice de masa ventricular izquierda (55).

CONCLUSIÓN

En síntesis, los resultados del presente estudio revelan que el tratamiento crónico oral con nebivolol y carvedilol presenta efectos hemodinámicos superiores al atenolol y equiparables a la amlodipina evidenciado por una mayor reducción de la de la VPA de corto plazo. Dicho efecto se asocia a una atenuación del daño ventricular y vascular asociado a la HTA experimental (Tabla 4). Estos resultados sugieren que la menor protección cardiovascular del bloqueante β -adrenérgico de segunda generación atenolol en comparación a otros agentes antihipertensivos evidenciada en ensayos clínicos no debería extrapolarse a β -bloqueantes de tercera generación, con propiedades farmacológicas adicionales como el nebivolol y el carvedilol.

Tabla 4. Comparación cualitativa de los resultados finales obtenidos luego del tratamiento crónico y oral de animales SHR con atenolol, nebivolol, carvedilol o amlodipina.

	<i>β-bloqueantes</i>			<i>Bloqueante cálcico</i>
	2da. Generación	3ra. Generación	3ra. Generación	3ra. Generación
	Atenolol	Nebivolol	Carvedilol	Amlodipina
PAS Periférica	↓	↔	↔	↓↓
PAS Central	↓	↓↓	↓	↓↓
VPA Periférica	↓	↓↓	↓↓	↓↓
VPA Central	↔	↓↓	↓↓	↓↓
Hipertrofia ventricular	↔	↓↓	↓↓	↓↓
Fibrosis ventricular	↓	↓↓	↓↓	↓↓
Espesoraórtico	↔	↓↓	↓↓	↓↓
Expresión de TGF- β en VI y Ao	↔	↓↓	↓↓	↓↓
Expresión de citoquinas proinflamatorias VI y Ao (TNF- α e IL-6)	↔	↓↓	↓↓	↓↓

↓ = disminución leve; ↓ ↓ = disminución amplia; ↔ = sin modificación

REFERENCIAS

- Lenfant C, Chobanian AV, Jones DW, Rocella EJ, et al. Seventh report of the Joint National Committee on the Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC 7): resetting the hypertension sails. *Hypertension*. 2003;41:1178-9.
- Ripley TL, Saseen JJ. β -blockers: a review of their pharmacological and physiological diversity in hypertension. *Ann Pharmacother* 2014; 48:723-33.
- James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, et al. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA*. 2014; 311(5):507-20.
- Dahlöf B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet*. 2002 23;359:995-1003.

- ElliottWJ,ChildersWK.Should β blockersnolongerbeconsideredfirst-linetherapyfor the treatment of essential hypertension without comorbidities? *CurrCardiol Rep.* 2011;13:507-16.
- WilliamsB,LacyPS,ThomSM,CruickshankK,StantonA,CollierD,etal.Differential impact of blood pressure-lowering drugs on central aortic pressure and clinical outcomes: principal results of the Conduit Artery Function Evaluation (CAFE) study. *Circulation.* 2006;113:1213-25.
- DiNicolantonio JJ, Hackam DG. Carvedilol: a third-generation β -blocker should be a first-choice β -blocker.*ExpertRevCardiovascTher.*2012;10:13-25.
- Grassi G, Bombelli M, Brambilla G, Trevano FQ, Dell'oro R, Mancia G. Total cardiovascular risk, blood pressure variability and adrenergic overdrive in hypertension: evidence, mechanisms and clinical implications. *CurrHypertens Rep* 2012; 14:333-338.
- Parati G. Blood pressure variability: its measurement and significance in hypertension. *J HypertensSuppl* 2005; 23:S19-25.
- Höcht C. Blood Pressure Variability: Prognostic Value and Therapeutic Implications. *ISRN Hypertension* 2013, ID398485.
- Webb AJ, Fisher U, Mehta Z, Rothwell PM. Effects of antihypertensive-drug classon interindividual variation in blood pressure and risk of stroke: A systematic review and metaanalysis. *Lancet.*2010;375:906–15.
- RothwellPM,HowardSC,DolanE,O'BrienE,DobsonJE,DahlöfB,etal.Effectsofbeta- blockers and calcium channel blockers on within-individual variability in blood pressure and risk of stroke. *Lancet Neurol*2010; 9:469–80.
- Fongemie J, Felix-Getzik E. A Review of Nebivolol Pharmacology and Clinical Evidence. *Drugs* 2015; 75(12):1349-71.
- Vanhoutte, Gao. Beta blockers, nitric oxide, and cardiovascular disease. *CurrOpinPharmacol.* 2013Apr;13(2):265-73
- KurtzTW,GriffinKA,BidaniAK,DavisonRL,HallJE;SubcommitteeofProfessionaland Public Education of the American Heart Association. Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals. Part 2: Blood pressure measurement in experimental animals: a statement for professionals from the subcommittee of professional and public education of the American Heart Association councilonhighbloodpressureresearch.*Hypertension*2005;45:299-310.
- BerteraFM,DelMauroJS,LoveraV,ChiappettaD,PolizioAH,TairaCAycols.Acute effects of third generation β -blockers on short-term and beat-to-beat blood pressure variabilityinsinoaortic-denervatedrats.*HypertensRes.*2013;36(4):349-55.
- Miao CY, Xie HH, Zhan LS, Su DF. Blood pressure variability is more important than blood pressure level in determination of end-organ damage in rats. *J Hypertens* 2006; 24:1125-35.
- GonzálezGE,CassagliaP,NoliTruants,FernándezMM,WilenskyL,VolbergV,etal. Galectin-3 is essential for early wound healing and ventricular remodeling after myocardialinfarctioninmice.*IntJCardiol*2014;176:1423-5.
- Xiong X, You C, Feng QC, Yin T, Chen ZB, Ball P, Wang LX. Pulse width modulation electro-acupuncture on cardiovascular remodelling and plasma nitric oxide in spontaneously.
- Ceron, Rizzi, Guimarães, Martins-Oliveira, Gerlach, Tanus-Santos. Nebivolol attenuates prooxidant and profibrotic mechanisms involving TGF- β and MMPs, and decreases vascular remodeling in renovascular hypertension. *Free RadicBiol Med* 2913; 65: 47.56.

DISCUSIÓN

- HallbäckM,WeissL.Mechanismsfspontaneoushypertensioninrats.*MedClinNorth Am* 1977; 61:593-9.
- Chan V, Fenning A, Hoey A, Brown L. Chronic β -adrenoceptor antagonist treatment controls cardiovascular remodeling in heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat.*JCardiovascPharmacol.*2011;58:424-31.
- Roman MJ, Devereux RB. Association of central and peripheral blood pressures with intermediatecardiovascularphenotypes.*Hypertension*2014;63:1148-53.
- Trudeau L. Central blood pressure as an index of antihypertensive control: determinantsandpotentialvalue.*CanJCardiol*2014;30:S23-8.
- Berry M, Lairez O, Fourcade J, Roncalli J, Carrié D, Pathak A y cols. Prognostic value of systolic short-term blood pressure variability in systolic heart failure. *ClinHypertens.* 2016; 12:22-16.

- Bertera FM, Del Mauro JS, Lovera V, Chiappetta D, Polizio AH, Taira CA, et al. Enantioselective pharmacokinetics and cardiovascular effects of nebivolol in L-NAME hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2014;37:194-201.
- Bertera FM, Del Mauro JS, Polizio AH, Chiappetta D, Taira CA, Höcht C. Effect of nebivolol on beat-to-beat and short-term blood pressure variability in spontaneously hypertensive rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2012;385:833-43.
- Di Verniero CA, Bertera F, Buontempo F, Bernabeu E, Chiappetta D, Mayer MA, et al. Enantioselective pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of carvedilol in a N-nitro-L-arginine methyl ester rat model of secondary hypertension. *J Pharm Pharmacol.* 2010;62:890-900.
- Bertera FM, Del Mauro JS, Chiappetta D, Polizio AH, Buontempo F, Taira CA, et al. Enantioselective pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of carvedilol in spontaneously hypertensive rats: focus on blood pressure variability. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2012;385:325-35.
- Gapon L, Prilepova AA, Tsygol'nik MD. Effect of nebivolol on parameters of cerebral haemodynamics and 24-hour blood pressure profile in patients with arterial hypertension. *Kardiologiia.* 2005;45:18-22.
- Crippa G, Venturi C, Carrara G. Effect of antihypertensive treatment with carvedilol or lercanidipine on ambulatory blood pressure variability. *Am J Hypertens* 2002;15:50A.
- Morillas P, de Andrade H, Castillo J, Quiles J, Bertomeu-González V, Cordero A, et al. Inflammation and apoptosis in hypertension. Relevance of the extent of target organ damage. *Rev Esp Cardiol* 2012;65:819-825.
- Valgimigli M, Ceconi C, Malagutti P, Merli E, Soukhomovskaia O, Francolini G, et al. Tumor necrosis factor- α receptor 1 is a major predictor of mortality and new-onset heart failure in patients with acute myocardial infarction: the Cytokine-Activation and Long-Term Prognosis in Myocardial Infarction (CALPHA) study. *Circulation.* 2005;111:863-70.
- Lataro RM, Silva CA, Tefé-Silva C, Prado CM, Salgado HC. *Am J Hypertens.* 2015; 28:1201-8. Acetylcholinesterase Inhibition Attenuates the Development of Hypertension and Inflammation in Spontaneously Hypertensive Rats.
- Andrzejczak D, Górska D. The effects of celiprolol on serum concentrations of proinflammatory cytokines in hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. *Pharmacol Rep.* 2014; 66:68-73.
- Li B, Liao YH, Cheng X, Ge H, Guo H, Wang M. Effects of carvedilol on cardiac cytokines expression and remodeling in rat with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2006; 111:247-255.
- Imbaby S, Ewais M, Essawy S, Farag N. Cardioprotective effects of curcumin and nebivolol against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Hum Exp Toxicol.* 2014; 33:800-13.
- Yin F, Li P, Zheng M, Chen L, Xu Q, Chen K, et al. Interleukin-6 family of cytokines mediates isoproterenol-induced delayed STAT3 activation in mouse heart. *J Biol Chem* 2003;278:21070-5.
- Wang Y, Wang Y, Yang D, Yu X, Li H, Lv X, et al. β_1 -adrenoceptor stimulation promotes LPS-induced cardiomyocyte apoptosis through activating PKA and enhancing CaMKII and I κ B α phosphorylation. *Crit Care* 2015;19:76.
- Navarro-Gonzalez J, Mora-Fernandez C, Gomez-Chinchon M, Muros M, Herrera H, Garcia J. Serum and gene expression profile of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in hypertensive diabetic patients: effect of amlodipine administration. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010;23:51-59.
- Sun L, Jin H, Sun L, Chen S, Huang Y, Liu J, cols. Hydrogen sulfide alleviates myocardial collagen remodeling in association with inhibition of TGF- β /Smad signaling pathway in spontaneously hypertensive rats. *Mol Med.* 2015 Jan 20;20:503-15.
- Shang P, Liu W, Liu T, Zhang Y, Mu F, Zhu Z y cols. Acetyl-11-Keto- β -Boswellic Acid Attenuates Prooxidant and Profibrotic Mechanisms Involving Transforming Growth Factor- β 1, and Improves Vascular Remodeling in Spontaneously Hypertensive Rats. *Sci Rep.* 2016 Dec 23;6:39809.
- Guerrero E, Voces F, Ardanaz N, Montero MJ, Arévalo M, Sevilla MA. Long-term treatment with nebivolol improves arterial reactivity and reduces ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003; 42:348-55.
- Wang Y, Zhang MS, Liu Y. Nebivolol treatment improves resistant arterial function and reduces ventricular hypertrophy and angiotensin II in spontaneously hypertension rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2013;14:146-55.
- Barone FC, Willette RN, Nelson AH, Ohlstein EH, Brooks DP, Coatney RW. Carvedilol prevents and reverses hypertrophy-induced cardiac dysfunction. *Pharmacology.* 2007; 80:166-76.
- Varagic J, Ahmad S, Voncannon JL, Moniwa N, Simington SW Jr, Brosnihan BK y cols. Nebivolol reduces cardiac angiotensin II, associated oxidative stress and fibrosis but not arterial pressure in salt-loaded spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2012;30:1766-74.

- LiB,LiaoYH,ChengX, GeH,GuoH,WangM.Effectsofcarvediloloncardiaccytokines expression and remodeling in rat with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2006; 111:247-255.
- Toblli J, Cao G, Rivas C, Munoz M, Giani J, Dominici F, et al. Cardiovascular protective effects of nebivolol in Zucker diabetic fatty rats. *J Hypertens*. 2010; 28:1007-19.
- LuJ,LiuF,LiuD,DuH,HaoJ,YangX,CuiW.Amlodipineandatorvastatinimproved hypertensive cardiac hypertrophy through regulation of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/receptor activator of nuclear factor kappa B/osteoprotegerin system in spontaneous hypertension rats. *ExpBiol Med (Maywood)*. 2016; 241: 1237- 4.
- Brown L, Fenning A, Chan V, et al. Echocardiographic assessment of cardiac structure and function in rats. *Heart Lung Circ* 2002; 11:167-73.
- Guerrero EI, Ardanaz N, Sevilla MA, Arévalo MA, Montero MJ. Cardiovascular effects of nebivolol in spontaneously hypertensive rats persist after treatment withdrawal. *J Hypertens*. 2006Jan;24(1):151-8.
- Miao CY, Xie HH, Zhan LS, Su DF. Blood pressure variability is more important than blood pressure level in determination of end-organ damage in rats. *J Hypertens* 2006; 24:1125-1135.
- MaddenJM,O'FlynnAM,FitzgeraldAP,KearneyPM.Correlationbetweenshort-term blood pressure variability and left-ventricular mass index: a meta-analysis. *Hypertens Res* 2016;39:171-177.
- Xie HH, Shen FM, Zhang XF, Jiang YY, Su DF. Blood pressure variability, baroreflex sensitivity and organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with various antihypertensive drugs. *Eur J Pharmacol* 2006;543:77-82.
- MaddenJM,O'FlynnAM,FitzgeraldAP,KearneyPM.Correlationbetweenshort-term blood pressure variability and left-ventricular mass index: a meta-analysis. *Hypertens Res* 2016;39:171-177.

ENTEROCINA AP-CECT7121: ACTIVIDAD BACTERICIDA, SINERGIA ANTIMICROBIANA Y EVIDENCIAS DE PREVENCIÓN Y EFECTO ANTI-BIOFILM SOBRE *Staphylococcus aureus* MULTI-RESISTENTE

Gastón DELPECH, Mónica CECI, Sabina LISSARRAGUE & Mónica D. SPARO*

Microbiología Clínica, Medicina, UNCPBA, Olavarría, Argentina. *E-mail: monicasparo@gmail.com

RESUMEN	168
SUMMARY	169
INTRODUCCIÓN	169
MATERIALES Y MÉTODOS	170
Aislamientos bacterianos	170
Caracterización fenotípica y estudio de susceptibilidad antimicrobiana	171
Aislamiento del péptido antimicrobiano AP-CECT7121	171
Curvas de cinética de muerte	171
Actividad de AP-CECT7121 sobre <i>Staph. aureus</i> multi-resistentes productores	172
Detección de <i>biofilm</i> mediante Microscopia Electrónica de Barrido	172
Aspectos éticos	172
RESULTADOS	172
Microscopia Electrónica de Barrido	175
DISCUSIÓN	175
CONCLUSIONES	177
AGRADECIMIENTOS	177
REFERENCIAS	177

RESUMEN

Objetivos: evaluar en la enterocina AP-CECT7121 la actividad bactericida, sinergia antimicrobiana e investigar el efecto anti-biofilm y su prevención sobre *Staphylococcus aureus* multi-resistentes de origen humano. Métodos: en n=11 *Staph. aureus* de pacientes con infecciones de piel y partes blandas se evaluó la potencia de la enterocina AP-CECT7121 mediante curvas de cinética de muerte sola o con concentraciones subinhibitorias de gentamicina. Se realizaron recuentos de colonias a las 0, 2, 4 y 8 h. Se estudió el efecto anti-biofilm en n=7 *Staph. aureus* multi-resistentes aislados de hemocultivos. Se determinaron las CIM por microdilución en caldo. Para estudiar la actividad sobre células planctónicas, se agregó AP-CECT7121 (1xCIM, 4xCIM) a cultivos de estafilococos (108 UFC/mL), en una placa de 96 pocillos, e incubó a 37 °C. Se realizaron recuentos de viables (0, 4, 8, 24 h). Para evaluar la actividad sobre células de *Staph. aureus* en biofilm, se agregaron a los pocillos, suspensiones en caldo cerebro-corazón-glucosa (1%) y se incubó a 37 °C, 24 h. Luego se incubaron con enterocina (1x CIM, 4x CIM) durante 1 y 24 h. Se realizaron recuentos de viables. Microscopia Electrónica de Barrido (MEB): sobre vidrio (tratado con AP-CECT7121) y control se agregó *Staph. aureus* y se observó la formación de biofilm. Resultados: AP-CECT7121 presentó actividad bactericida sobre la mayoría de los estafilococos (16/22). Se observó sinergia AP-CECT7121/gentamicina a las 4-8 y 24 h. Se detectó actividad bactericida de AP-CECT7121 sobre células planctónicas entre 1 y 4 h de incubación. Se comprobó la prevención de formación de biofilm con AP-CECT7121, mediante MEB. Conclusiones: AP-CECT7121 constituye un candidato atractivo para su uso como una herramienta terapéutica natural para el tratamiento de infecciones causadas por *Staph. aureus* humanos multi-resistentes y para la prevención y tratamiento de infecciones asociadas a *biofilm*.

PALABRAS CLAVE: enterocina AP-CECT7121, actividad bactericida, efecto anti-*biofilm*

SUMMARY**ENTEROCIN AP-CECT7121: BACTERICIDAL ACTIVITY, ANTIMICROBIAL SYNERGY AND EVIDENCE OF PREVENTION AND ANTI-BIOFILM EFFECT AGAINST MULTI-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Aims: assess, in enterocin AP-CECT7121, bactericidal activity, antimicrobial and synergistic effect and to investigate anti-biofilm effect and prevention against human multi-resistant *Staphylococcus aureus*. **Methods:** in Isolates (n : 11) recovered from patients with soft tissue infections, AP-CECT7121 potency was assessed by time-kill curves alone or with subinhibitory concentrations of gentamicin. Colony counts were carried out at 0, 2, 4, 8, and 24 h of incubation. In n : 7 multi-resistant *Staph. aureus* isolated from blood cultures, anti-biofilm effect was studied. MICs determinations were done by the microdilution method in broth. For bactericidal activity against planktonic cells, AP-CECT7121 (1xMIC, 4xMIC) was added to staphylococcal cultures (10^8 CFU/mL), in a 96-well plate, and incubated at 37 °C. CFU counts were performed (0, 4, 8, 24 h). For assessing bactericidal activity against *Staph. aureus* biofilm cells, staphylococcal suspensions in Brain Heart Infusion broth-1% glucose were added to the wells and incubated for 24 h at 37 °C. Formed biofilms were incubated with the enterocin (1xMIC and 4xMIC) for 1 and 24 h. CFU counts were done. Scanning Electron Microscopy (SEM): to control and treated (with AP-CECT7121) glass slides, *Staph. aureus* was added and biofilm formation was observed. **Results:** APCECT7121 showed bactericidal activity against most of the staphylococci (16/22). AP-CECT7121/ gentamicin synergy was observed at 4-8 h and at 24 h. Bactericidal activity of AP-CECT7121 against planktonic cell was detected between 1-4 h of incubation. Through SEM, prevention of biofilm formation in samples treated with AP-CECT7121, was proved. **Conclusions:** AP-CECT7121 constitutes an attractive candidate for its use as a natural therapeutic tool for the treatment of infections produced by human multi-resistant *Staph. aureus* and, also, for prevention and treatment of biofilm-associated infections.

KEY WORDS: enterocin AP-CECT7121, bactericidal activity, anti-biofilm effect

INTRODUCCIÓN

Las bacterias multi-resistentes se encuentran diseminadas a nivel mundial y tienen un significativo impacto sobre la eficacia de la terapia antimicrobiana. De acuerdo al Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, EE.UU.), las bacterias que expresan resistencia a más de una clase de fármacos antimicrobianos son definidas como microorganismos multi-resistentes (https://www.cdc.gov/hicpac/mdro/mdro_2.html).

En Medicina Humana, el uso masivo de antimicrobianos ejerce una presión selectiva sobre patógenos prevalentes, como *Staphylococcus aureus* metilino-resistente (SAMR), que presenta resistencia a beta-lactámicos. La selección de bacterias multi-resistentes conduce a la disponibilidad de pocas opciones terapéuticas remanentes (Canton *et al.*, 2013).

Los aislamientos de SAMR originados en la comunidad difieren en ciertos aspectos con los asociados a cuidados de la salud, como: población blanco, síndromes clínicos (sepsis severa, fascitis necrotizante, neumonía necrotizante, etc.), perfiles de susceptibilidad antimicrobiana (*SCCmec*) e infecciones en ambientes sanitarios como en la comunidad (Lee *et al.*, 2007; David & Daum, 2010).

Las infecciones invasivas requieren para su terapéutica antimicrobianos bactericidas. En ocasiones se asocian drogas para lograr una sinergia bactericida. Gentamicina es utilizada ampliamente en combinación con agentes activos contra la pared celular bacteriana (beta-lactámicos, vancomicina) para el tratamiento de infecciones severas originadas por SAMR (Chambers, 1997).

Las infecciones de piel y partes blandas constituyen un conjunto de cuadros clínicos de distinta expresividad y gravedad que afectan la piel, el tejido celular subcutáneo y el músculo y representan un desafío terapéutico para los profesionales de la Salud. La elección de antimicrobianos adecuados es una de las claves

más importantes para lograr una terapia farmacológica efectiva. Las bacterias Gram positivas son las que se aíslan con mayor frecuencia (Ray *et al.*, 2013).

En las últimas décadas, se ha sumado a la multi-resistencia antimicrobiana un fenómeno que complicó el tratamiento de cuadros infecciosos causados por diversas especies bacterianas: la formación de *biofilm*. Los *biofilms* o biopelículas son una comunidad de microorganismos que se adhieren a superficies bióticas o abióticas. En un *biofilm*, las células bacterianas forman un *cluster* incrustado en una matriz extra-celular auto-sintetizada, constituida por biomoléculas como polisacáridos, proteínas, lípidos ácidos nucleicos (Flemming & Wingender, 2010; Sugimoto *et al.*, 2013). Las bacterias asociadas a *biofilm* presentan resistencia antimicrobiana y a las defensas del hospedador. Las infecciones asociadas a *biofilm* son frecuentemente crónicas o re-incidentes. Por lo tanto, la prevención y el tratamiento de este tipo de infecciones son relevantes para el sistema de Salud (Costerton *et al.*, 1999; Vlastarakos *et al.*, 2007).

Aunque varias especies bacterianas han sido relacionadas con las infecciones asociadas a *biofilms*, *Staph. aureus* y *Staph. epidermidis* son considerados como los agentes patógenos más frecuentes relacionados con este tipo de cuadros. El predominio de este género sobre otros productores de *biofilm* está vinculado con que estas bacterias constituyen comensales frecuentes de la piel y superficies mucosas humanas (Otto, 2008).

Actualmente, la ausencia de nuevas opciones farmacológicas para el tratamiento de enfermedades infecciosas determinó la búsqueda de estrategias terapéuticas alternativas que complementen a los antimicrobianos convencionales. Una posibilidad es el antagonismo mediado por proteínas bacterianas. Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos con actividad bactericida (Acuña *et al.*, 2011). Cuando estos compuestos son producidos por cepas del género *Enterococcus* se denominan enterocinas.

El péptido antimicrobiano AP-CECT7121 es una enterocina sintetizada por la bacteria probiótica *Enterococcus faecalis* CECT7121, una cepa no hemolítica y que no porta determinantes de virulencia y de resistencia de transferencia génica horizontal. *Ent. faecalis* CECT7121 fue recuperada de un ensilaje natural de maíz en un área rural del Partido de Tandil (Prov. Buenos Aires). Esta cepa no presenta multi-resistencia antimicrobiana.

Concentración	Los valores de	Inhibitoria	Mínima	(CIM)
---------------	----------------	-------------	--------	-------

para antimicrobianos de utilización clínica son: vancomicina: 0,12 mg/L; ampicilina: 0,5 mg/L; gentamicina: < 500 mg/L; estreptomina: < 1000 mg/L (Sparo, 2006; Sparo *et al.*, 2008). Estudios físico-químicos demostraron que AP.CECT7121 es termoestable (1 h, 75 °C), susceptible a enzimas proteolíticas, detergentes y agentes quelantes. Además, es estable frente a la acción de enzimas tales como DNasa, RNasa, amilasa, glucuronidasa y lipasa. Asimismo, presenta actividad inhibitoria en un rango amplio de pH (4,0-8,0). AP- CECT7121 es un péptido hidrofóbico catiónico, de bajo peso molecular (3.000 Da) y está incluido dentro de la clase II de las bacteriocinas. Su mecanismo de acción está mediado por la formación de poros en las membranas bacterianas, seguido por shock osmótico y lisis celular (Sparo, 2006).

Los objetivos de este trabajo fueron evaluar en la enterocina AP-CECT7121 la actividad bactericida, sinergia antimicrobiana e investigar el efecto anti-*biofilm* y su prevención sobre *Staph. aureus* multi-resistentes de origen humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos bacterianos

Durante el período enero de 2014 a diciembre de 2015, se incluyeron aislamientos (*n*: 11) de *Staph. aureus* multi-resistentes, recuperados de muestras para hemocultivos obtenidas por orden médica a partir de pacientes con infecciones de piel y partes blandas severas atendidos en el Servicio de Emergencias del Hospital “Ramón Santamarina” de Tandil. Se incluyó un aislamiento bacteriano por cada paciente.

Para investigar el efecto de AP-CECT7121 en la erradicación de células asociadas a la producción de *biofilm* (sésiles), durante el período enero-noviembre de 2016, se incluyeron *n*: 7 aislamientos de *Staph. aureus* multi-resistentes (HSSA32-HSSA38) recuperados de hemocultivos de pacientes internados en el hospital “Ramón Santamarina” de Tandil, con infecciones en prótesis de cadera.

Caracterización fenotípica y estudio de susceptibilidad antimicrobiana

Se realizó la caracterización fenotípica de *Staph. aureus*, de acuerdo a Winn *et al.* (2008). Los resultados fueron validados empleando el sistema automatizado VITEK 2® Compact (bioMérieux, Buenos Aires, Argentina).

Mediante el estudio preliminar de la susceptibilidad antimicrobiana, por difusión con discos, se seleccionaron aislamientos de *Staph. aureus* multi-resistentes (resistentes a beta-lactámicos, eritromicina y tetraciclina).

Se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por el método de dilución en agar, según las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI (2016). Antimicrobianos ensayados: cefoxitina y gentamicina. La cepa *Staph. aureus* ATCC 29213 se utilizó como control de calidad.

Aislamiento del péptido antimicrobiano AP-CECT7121

Se realizó el aislamiento de AP-CECT7121 mediante el protocolo de Sparo *et al.* (2009). Se incubó la cepa probiótica *Ent. faecalis* CECT7121 (depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo, CECT, Burjasot, Valencia, España) a 35 ± 2 °C, durante 18 h, en caldo infusión cerebro-corazón (BHI, Laboratorio Britania, Buenos Aires, Argentina). Se inoculó el cultivo en 4 L de caldo BHI e incubó a 35 ± 2 °C, durante 9 h. Luego, se centrifugó a 15.000 *g*, a 4 °C, durante 20 min. El sobrenadante se ajustó a pH: 7,0 y se precipitó de acuerdo a Dawson *et al.* (1969). Se centrifugó a 20.000 *g*, a 4 °C, durante 20 min. El precipitado se re-suspendió en 40 mL de buffer fosfato salino (PBS), 5 mM, pH: 7,0. Se aisló AP-CECT7121 mediante una extracción físico-química, empleando cartuchos Sep-Pak™ C18 (Waters, Milford, EE.UU.). El extracto de *Ent. faecalis* (5 mL) se cargó en un cartucho, lavado previamente con acetonitrilo en ácido trifluoro acético (TFA, 0,1%) y se eluyó con acetonitrilo (60%)-TFA (0,1%). El eluato se evaporó a sequedad utilizando una centrifuga de vacío (ThermoSavant Instruments, Hollbrook, EE.UU.). Se re-suspendió el precipitado en PBS (250 µL). Se inyectaron alícuotas de la suspensión (20 µL) en un sistema HPLC de fase reversa (Shimadzu, Kyoto, Japón) y se separaron en una columna Nucleosil C18 (5 µm, Pharmacia, Uppsala, Suecia). Fase móvil: buffer A (TFA 0,1%) y buffer B (acetonitrilo 95% en TFA 0,1%). Se eluyó AP-CECT7121 en un gradiente lineal (95%A/5%B a 15%A/85%B), con una tasa de flujo de 0,2 mL/min, controlando la elución con un detector UV. Se recolectaron las fracciones en períodos regulares de tiempo. Se evaporó la fracción activa hasta sequedad y se re-suspendió en buffer fosfato (50 mM, pH: 7,0). Se detectó actividad biológica de AP-CECT7121 en las fracciones eluidas luego de 30 min de la inyección de la muestra, con aproximadamente 40% de buffer B.

Curvas de cinética de muerte

Se realizaron curvas de cinética de muerte (tres para cada aislamiento bacteriano) para evaluar la actividad bactericida *in vitro* de AP-CECT7121 solo o combinado con gentamicina. Se lavaron, suspendieron y diluyeron cultivos frescos de las células bacterianas en PBS, 50 mM, pH: 7,0, para obtener inóculos de 10^6 UFC. Se obtuvieron muestras (100 µL) de cada suspensión bacteriana a las 0, 4, 8 y 24 h de incubación a 35 ± 2 °C. Se realizaron recuentos de células viables en agar BHI, incubando a 35 ± 2 °C durante 24 h. Concentración de AP-CECT7121: 12 mg/L. Como control de calidad, se realizó un recuento de viables, en las mismas condiciones experimentales, con PBS (Sparo *et al.*, 2009).

Para investigar la existencia de sinergia, se realizaron recuentos de viables con AP-CECT7121 combinado con concentraciones sub-inhedoras de gentamicina (CIM/4) y únicamente con gentamicina. Se definió como efecto bactericida a la disminución de los recuentos de viables, únicamente con AP-CECT7121 ($\Delta \geq -3 \log_{10}$). Sinergia: incremento de la letalidad $\geq 1 \log_{10}$ a las 4-8 h (sinergia temprana, $\Delta \geq -1 \log_{10}$) y $\geq -2 \log_{10}$ luego de 24 h de incubación (sinergia tardía, $\Delta \geq -2 \log_{10}$), para la combinación AP-CECT7121/gentamicina comparado con AP-CECT7121 solo.

Actividad de AP-CECT7121 sobre *Staph. aureus* multi-resistentes productores de *biofilm*

Para el estudio *in vitro* se utilizó AP-CECT7121 previamente purificado. Se determinaron las CIM mediante el micro-método de dilución en caldo. Se evaluó la actividad bactericida del péptido antimicrobiano sobre células plantónicas. A cultivos de estafilococos en placas con 96 pocillos, se les agregó AP-CECT7121 en concentraciones finales de 1xCIM y 4xCIM, incubando a 37 °C. Se realizaron recuentos de viables (UFC) a las 0,4, 8 y 24 h de incubación.

Para estudiar la actividad bactericida de AP-CECT7121 sobre células sésiles de *Staph. aureus* se agregaron suspensiones bacterianas, en caldo BHI con glucosa 1%, a los pocillos y se incubó a 37 °C durante 24 h. Los *biofilm* formados se incubaron con AP-CECT7121 (1xCIM y 4xCIM) durante 1 y 24 h. Luego, se realizaron recuentos de células sésiles viables. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Detección de *biofilm* mediante Microscopía Electrónica de Barrido

La observación de *biofilms* mediante Microscopía Electrónica de Barrido se realizó en el Servicio de Microscopía Electrónica y Microanálisis (SeMFI), Laboratorio de Investigaciones de Metalurgia Física (LMIF), Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata.

Se siguió la técnica descrita por Ait Quali *et al.* (2014) con modificaciones. Se colocaron individualmente segmentos de vidrio (1 cm²) estériles en contenedores estériles plásticos cerrados (4,5 cm x 4,5 cm x 1 cm). A 1 grupo (*n*: 2) se le adicionaron 4 mL de AP-CECT7121 (concentración CIMx1 de aislamiento con mayor valor obtenido con células sésiles) y se efectuó un grupo control (*n*: 2) al que se le agregó caldo BHI. Se incubó durante 2 h a 37 °C y se eliminó el líquido de cada contenedor. Posteriormente, se agregaron a cada recipiente 4,5 mL de una suspensión de *Staph aureus* a una concentración final de 10⁸ UFC/mL. Luego de 1 h de incubación a 35 °C, se removió el líquido sobrenadante de cada contenedor, se agregó 1 mL de caldo BHI sobre la superficie de cada segmento de vidrio y se incubó durante 5 días cambiando el medio cada 24 h. Cuando los segmentos de vidrio se retiraron del medio se colocaron individualmente en una solución de paraformaldehído al 8%, tampón de fosfato y 16% de glutaraldehído y se fijaron durante 48 h a 4 °C. Se lavaron 3 veces durante 10 min con tampón fosfato. Se añadió una solución tampón de osmio / fosfato 1/1 (2% de OsO₄) y se mantuvo durante 18 h. El osmio se desechó y las muestras se lavaron dos veces durante 10 min con alcohol etílico al 30%. Posteriormente, las muestras se deshidrataron a través de una serie de concentraciones de alcohol etílico 50%, 70%, 80%, 90% y 3 veces 100%, con 10 min para cada paso. Las muestras se secaron en desecador por punto crítico, se montaron sobre un soporte de muestra recubierto por pulverización catódica con oro y se observaron a alto vacío con un microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM), Modelo FEI ESEM Quanta 200. Se tomaron microfotografías a 3.000 y 80.000 X.

Aspectos éticos

Para la obtención de las muestras de sangre, se realizaron reuniones informativas con los pacientes. Se observó el cumplimiento de la legislación vigente (Declaración de Helsinki, Ley Nacional de Protección de Datos Personales).

RESULTADOS

La totalidad de los aislamientos de *Staph. aureus* incluidos, productores de infecciones de piel y partes blandas, expresó resistencia a cefoxitina (CIM ≥8 mg/L) se caracterizaron como SAMR. No se observó resistencia a gentamicina (CIM ≤4 mg/L).

Los SAMR fueron recuperados de muestras de sangre, obtenidas de pacientes en el Servicio de Emergencias del Hospital. Las infecciones de piel y partes blandas fueron severas y de origen comunitario. Los pacientes no tenían antecedentes registrados de colonización o infección con SAMR. Además, no contaban, en el año previo, con hospitalizaciones, cirugías, diálisis o admisiones en geriátricos. Asimismo, no estaban cateterizados en forma permanente ni en contacto con instrumental médico que pasara a través de la piel. Se detectó un amplio rango etario entre los pacientes incluidos (30-60 años). Los aislamientos de *Staph. aureus* fueron recuperados de mujeres (6/11) y hombres (5/11).

Se observó actividad bactericida de AP-CECT7121 en 9/11 (81,8%) SAMR de la comunidad (-3,1 a -3,8 log₁₀ UFC/mL), recuperados de pacientes con infecciones de piel y partes blandas (**Tabla 1**).

Tabla 1. Variación de recuentos de viables ($\Delta\log_{10}$ UFC/mL) de *Staph. aureus* multi-resistentes, productores de infecciones de piel y partes blandas, luego de agregar AP-CECT7121 y/o gentamicina

AISLAMIENTO	TIEMPO (h)	SIN ATM ^a ($\Delta\log_{10}$ UFC/mL)	AP-CECT7121 ($\Delta\log_{10}$ UFC/mL)	GEN ^b ($\Delta\log_{10}$ UFC/mL)	APCECT+ GEN ($\Delta\log_{10}$ UFC/mL)
HS-224	0	0	0	0	0
	4	1.8	-0.7	-0.9	-0.9
	8	2.7	-1.4	-1.5	-2.7
	24	3.9	-3.8	-2.8	-3.7
HS-228	0	0	0	0	0
	4	1.6	-0.8	-0.7	-0.7
	8	2.5	-1.7	-1.7	-2.7
	24	3.8	-3.8	-2.9	-3.9
HS-232	0	0	0	0	0
	4	1.3	-0.8	-0.8	-0.6
	8	2.6	-1.6	-1.7	-2.8
	24	3.7	-3.5	-3.0	-3.6
HS-235	0	0	0	0	0
	4	1.8	-0.7	-0.7	-0.9
	8	2.4	-1.1	-1.5	-2.2
	24	3.5	-3.2	-2.7	-3.2
HS-242	0	0	0	0	0
	4	1.6	-0.5	-0.9	-0.9
	8	2.1	-1.2	-1.5	-2.2
	24	3.4	-2.6	-2.7	-2.5
HS-243	0	0	0	0	0
	4	1.4	-0.8	-0.4	-0.7
	8	2.0	-1.6	-1.4	-2.8
	24	3.5	-3.3	-2.9	-3.3
HS-247	0	0	0	0	0
	4	1.5	-0.7	-0.7	-0.8
	8	2.3	-1.5	-1.5	-2.7
	24	3.2	-3.1	-3.0	-3.2
HS-253	0	0	0	0	0
	4	1.3	-0.9	-0.5	-0.6
	8	2.5	-1.4	-1.2	-2.5
	24	3.8	-3.6	-2.8	-3.5
HS-256	0	0	0	0	0
	4	1.6	-0.4	-0.5	-0.4
	8	2.7	-1.1	-1.0	-2.2
	24	3.8	-2.4	-2.2	-2.3
HS-257	0	0	0	0	0
	4	1.1	-0.7	-0.6	-0.8
	8	1.7	-1.4	-1.0	-2.6
	24	3.4	-3.1	-2.7	-3.2
HS-262	0	0	0	0	0
	4	1.3	-1.0	-0.6	-0.8
	8	2.5	-1.7	-1.1	-2.7
	24	3.6	-3.4	-3.0	-3.5

Los resultados provienen del promedio de tres experimentos realizados por duplicado ^aATM: antimicrobiano.

^bGEN: gentamicina.

Se detectó sinergia temprana en todos los estafilococos a las 4-8 h (-1.0 to -1.3 log₁₀ UFC/mL). Sin embargo, se observó indiferencia a las 24 h en el 100% de los estafilococos (≤ -1.1 log₁₀ UFC/mL).

Al determinar la CIM de AP-CECT7121 sobre los aislamientos de *Staph. aureus* multiresistentes recuperados de hemocultivos, para estudiar el efecto anti-*biofilm*, se observó un rango de concentraciones comprendido entre 1,8 y 3,1 mg/L (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración Inhibitoria Mínima de AP-CECT7121 para *Staph. aureus* multi-resistentes

<u><i>Staph. aureus</i></u>	<u>CIM (mg/L)</u>
HSSA32	2,5
HSSA33	3,1
HSSA34	2,1
HSSA35	2,9
HSSA36	2,7
HSSA37	1,8
HSSA38	2,3

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

Se detectó actividad bactericida de AP-CECT7121 sobre células plantónicas de estafilococos entre 1 y 4 h de incubación (Tabla 3).

Tabla 3. Actividad bactericida de AP-CECT7121 sobre células plantónicas de *Staph. Aureus*

<i>Staph aureus</i>	0 h			4 h			8 h			24 h		
	ΔLog_{10} UFC/mL			ΔLog_{10} UFC/mL			ΔLog_{10} UFC/mL			ΔLog_{10} UFC/mL		
	Control	1xCIM	4xCIM									
HSSA32	0	0	0	1,3	-3,8	-6,7	1,8	-3,9	-6,7	2,4	-3,9	-6,7
HSSA33	0	0	0	1,2	-3,1	-6,4	1,6	-3,2	-6,6	2,3	-3,3	-6,7
HSSA34	0	0	0	1,4	-3,4	-6,5	1,6	-3,4	-6,5	2,1	-3,5	-6,7
HSSA35	0	0	0	1,3	-3,2	-6,4	1,7	-3,3	-6,5	2,0	-3,4	-6,7
HSSA36	0	0	0	1,2	-3,1	-6,9	1,6	-3,2	-6,9	1,9	-3,2	-6,7
HSSA37	0	0	0	1,4	-3,3	-6,7	1,5	-3,3	-6,7	2,0	-3,4	-6,7
HSSA38	0	0	0	1,1	-3,9	-6,8	1,7	-3,8	-6,9	2,1	-3,9	-6,7

Los resultados provienen del promedio de tres experimentos realizados por duplicado CIM: Concentración Inhibitoria Mínima.

Se observó un efecto dosis dependiente de AP-CECT7121 sobre las células del *biofilm*. La enterocina en una concentración de 4xCIM presentó actividad bactericida, aunque no se detectó mortalidad completa (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad bactericida de AP-CECT7121 sobre *Staph. aureus* en *biofilm*

<i>Staph aureus</i>	0 h			1 h			24 h		
	ΔLog_{10} UFC/mL			ΔLog_{10} UFC/mL			ΔLog_{10} UFC/mL		
	Control	1xCIM	4xCIM	Control	1xCIM	4xCIM	Control	1xCIM	4xCIM
HSSA32	0	0	0	0,2	-1,0	-2,9	0,7	-1,8	-3,0
HSSA33	0	0	0	0,3	-0,9	-2,8	0,6	-1,4	-3,1
HSSA34	0	0	0	0,2	-0,8	-2,7	0,5	-1,5	-3,0
HSSA35	0	0	0	0,4	-0,7	-2,8	0,7	-1,6	-3,2
HSSA36	0	0	0	0,3	-0,9	-2,9	0,6	-1,9	-3,3
HSSA37	0	0	0	0,4	-0,8	-2,9	0,7	-1,8	-3,1
HSSA38	0	0	0	0,2	-0,9	-2,8	0,4	-1,7	-3,2

Los resultados provienen del promedio de tres experimentos realizados por duplicado CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

El análisis microscópico con Microscopía Electrónica de Barrido mostró menor número de células adherentes en los dispositivos de vidrio tratados con la enterocina en relación al control (**Figura 1, Figura 2**).

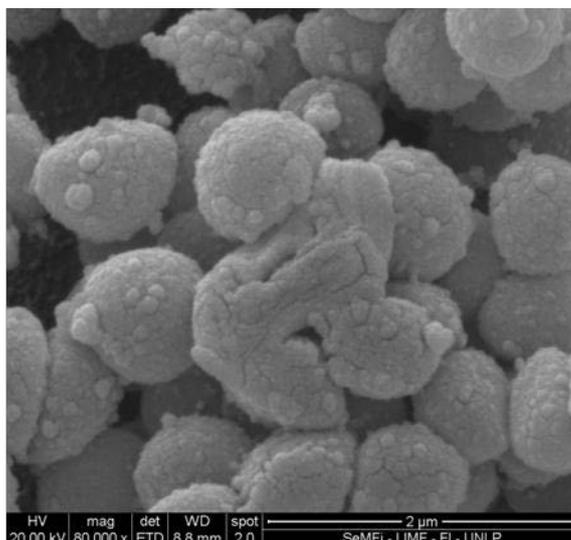


Figura 1. Microscopía Electrónica de Barrido. Muestra no tratada (control) con AP-CECT7121 luego de 5 días de la formación de *biofilm*. Amplificación: 80.000 X.

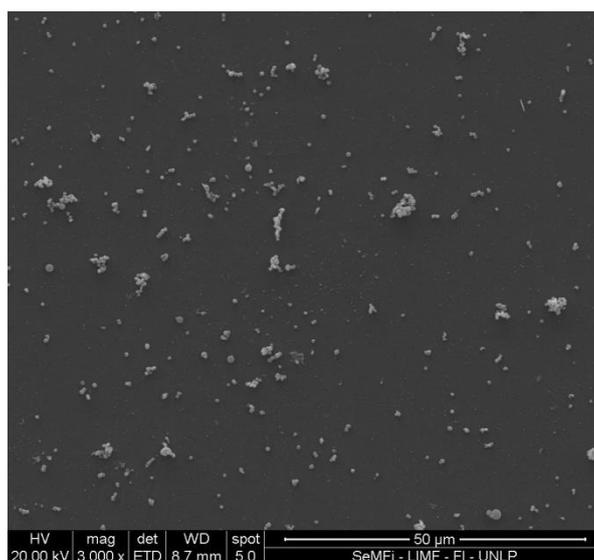


Figura 2. Microscopía Electrónica de Barrido. *Staph. aureus* HSSA33 tratado con CIMx1 (31 mg/L) de AP-CECT7121 luego de 5 días de formación de *biofilm*. Amplificación: 3.000 X.

DISCUSIÓN

Se evaluó la actividad bactericida, sinergia con gentamicina y el efecto anti-*biofilm* del péptido AP-CECT7121 sobre *Staph. aureus* multi-resistentes de origen humano. La emergencia de SAMR de origen comunitario se ha asociado con un incremento en la utilización de antimicrobianos beta-lactámicos. Recientemente, en un meta-análisis donde se analizaron las frecuencias de infecciones comunitarias originadas por *Staph. aureus* multi-resistentes se documentaron los siguientes porcentajes: Asia, 23,1%; Europa, 37,4%; América del Norte, 47,4%. También, SAMR es un patógeno prevalente en América Latina y,

específicamente, en Argentina (Egea *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014). Estos hallazgos remarcan la relevancia epidemiológica de SAMR de origen comunitario como agente etiológico de infecciones severas.

En el presente estudio, se investigó la eficacia de la enterocina AP-CECT7121 producida por una cepa ambiental *Ent. faecalis* CECT7121 con características fenotípicas y genotípicas de las bacterias probióticas (Sparo, 2006). Otros autores analizaron la utilidad de bacteriocinas producidas por otros géneros como *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. y *Lactococcus* spp. (Hammami *et al.*, 2013).

Hasta el momento, la investigación para el desarrollo de bacteriocinas con fines terapéuticos se ha enfocado en péptidos antimicrobianos como nisina, lacticina y lisostafina (Hassan *et al.*, 2012). Es importante destacar que en AP-CECT7121 se ha demostrado la ausencia de efectos tóxicos o nocivos (Sparo, 2006).

Se evaluó la eficacia *in vitro* de AP-CECT7121 sobre *Staph. aureus* multi-resistentes. Se detectó actividad bactericida contra el 81,8% de los aislamientos incluidos. También otras bacteriocinas como pumicilina 4 y nisina presentaron efecto inhibitorio con una disminución significativa de la viabilidad de los estafilococos (Severina *et al.*, 1998; Aumpad & Na-Bangchang, 2007).

Se investigó la existencia de sinergia entre AP-CECT7121 y un antimicrobiano de uso habitual como gentamicina; se observó sinergia temprana. En un estudio reciente, otros autores también detectaron sinergia cuando evaluaron dos enterocinas, DD28 y DD93, asociadas con kanamicina sobre *Staph. aureus* multi-resistente de origen clínico recuperado de un paciente humano (Al Atya *et al.*, 2016).

Aproximadamente, 7-10% de los pacientes hospitalizados son afectados por infecciones de piel y partes blandas. Dependiendo de la severidad de la infección, el área corporal involucrada puede convertirse en disfuncional (Swartz, 2004; Ki & Rotstein, 2008).

Tradicionalmente, las infecciones estafilocócicas han sido tratadas con antimicrobianos de uso habitual, aunque la emergencia de bacterias resistentes constituye hoy en día una preocupación terapéutica relevante. SAMR de origen comunitario puede causar infecciones severas o fatales. En estos cuadros se requiere emplear antimicrobianos de segunda línea, como vancomicina. Existen ciertos aspectos contraproducentes asociados con el empleo de glucopéptidos, como bacteriemia prolongada durante el tratamiento, altas tasas de falla clínica y nefrotoxicidad (Dombrowski & Winston, 2008).

En la literatura existe escasa información sobre la eficacia de bacteriocinas para el tratamiento de infecciones de piel y partes blandas. Fernández *et al.* (2008) observaron que aunque la nisina era propuesta como una alternativa eficaz para el tratamiento de este tipo de infecciones, su efecto sobre *Staphylococcus* era bacteriostático. La enterocina AP-CECT7121 presentó actividad bactericida homogénea sobre aislamientos de SAMR de origen humano.

En esta investigación se incluyeron aislamientos de *Staph. aureus* productores de *biofilm* y se evaluó el efecto anti-*biofilm* del péptido antimicrobiano AP-CECT7121, observando actividad bactericida dosis dependiente sobre células sésiles.

En un estudio previo, otros autores estudiaron la actividad de tres bacteriocinas (nisina A, lacticina Q, nukacina ISK-1) con estructuras diferentes sobre un aislamiento clínico de SAMR. Nisina A y lacticina Q presentaron actividad bactericida sobre células planctónicas, aunque variaron en su efecto sobre células asociadas a *biofilm*; siendo nisina la que presentó mayor actividad. En cambio, en nukacina ISK-1 se observó un efecto bacteriostático sobre células planctónicas, mientras que no se detectó un efecto bactericida sobre *biofilm* (Okuda *et al.* 2013).

Staph. aureus puede formar *biofilms* sobre diversos biomateriales y son responsables de infecciones recurrentes en pacientes hospitalizados por tiempo prolongado (Nan *et al.*, 2015). Las biopelículas o *biofilms* maduros son de difícil erradicación, complicando el tratamiento del agente patógeno (Dosler & Mataraci, 2013). La enterocina AP-CECT7121 impide la colonización de *Staph aureus* sobre una superficie inerte y por lo tanto también constituye una potencial herramienta para prevenir la instalación de biopelículas de *Staph. aureus* sobre diferentes biomateriales.

CONCLUSIONES

AP-CECT7121 presentó actividad bactericida sobre *Staph. aureus* multi-resistentes recuperados de pacientes con infecciones de piel y partes blandas. Por lo tanto este péptido es un candidato viable para constituirse en una alternativa antimicrobiana para la terapéutica de infecciones producidas por estafilococos meticilino-resistentes.

Se observó actividad bactericida de AP-CECT7121 sobre células sésiles de *Staph. aureus*, pudiendo ser considerado como un candidato para futuras aplicaciones en el tratamiento de infecciones asociadas a *biofilms* como también la prevención de colonización de biomateriales por *Staph. aureus* formadores de biopelículas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Ing. Adriana Kang y a Santiago Noval del Servicio de Microscopía Electrónica y Microanálisis (SeMFI-LMIF, Facultad de Ingeniería-UNLP) y a

REFERENCIAS

- Ait Ouali F., I. Al Kassaa, B. Cudennec, M. Abdallah, F. Bendali, D. Sadoun, *et al.* (2014) Identification of lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. *Int. J. Food. Microbiol.* **191**: 116-24.
- Al Atya A.K., Y. Belguesmia, G. Chataigne, R. Ravallec, A. Vachée, S. Szunerits, *et al.* (2016) Anti-MRSA activities of enterocins DD28 and DD93 and evidences on their role in the inhibition of biofilm formation. *Front. Microbiol.* **7**: 817.
- Aumpad R. & K. Na-Bangchang (2007) Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. *Curr. Microbiol.* **55**: 308-3.
- Canton R., J.P. Horcajada, A. Oliver, P. Ruiz Garbajosa & J. Vila (2013) Inappropriate use of antibiotics in hospitals: the complex relationship between antibiotic use and antimicrobial resistance. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin* **31**: 3-11.
- Chambers H.F. (1997) Methicilin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**: 781-91.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2016) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 26th informational supplement. M100-S26. CLSI, Wayne, PA. Costerton J.W., P.S. Stewart & E.P. Greenberg (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-22.
- David M.Z. & R.S. Daum (2010) Community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**: 616-87.
- Dawson R.M.C., D.C. Elliot, W.H. Elliot & K.M. Jones (1969) Data for biochemical research, 2nd edn. Oxford University Press, Oxford.
- Dombrowski J.C. & L.G. Winston (2008) Clinical failures of appropriately-treated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *J. Inf. Secur.* **57**: 110-5.
- Dosler S. & E. Mataraci (2013) *In vitro* pharmacokinetics of antimicrobial cationic peptides alone and in combination with antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Peptides* **49**: 53-8.
- Egea A.L., P. Gagetti, R. Lamberghini, D. Faccone, C. Lucero, A. Vindel, *et al.* (2014) New patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones, community associated MRSA genotypes behave like healthcare-associated MRSA genotypes within hospitals, Argentina. *Int. J. Med. Microbiol.* **304**:1086-99.
- Fernández L., S. Delgado, H. Herrera, A. Maldonado & J.M. Rodríguez (2008) The bacteriocin Nisin, an effective agent for the treatment of staphylococcal mastitis during lactation. *J. Hum. Lact.* **24**: 311-6.
- Flemming H.C. & J. Wingender (2010) The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 623-33. Hammami R., B. Fernandez, C. Lacroix & I. Fliss (2013) Anti-infective properties of bacteriocins: an update. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**: 2947-67.
- Hassan M., M. Kjos, I.F. Nes, D.B. Diep & F. Loftipour (2012) Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.* **113**: 723-36.

- Ki V. & C. Rotstein (2008) Bacterial skin and soft tissue infections in adults: a review of their epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment and site of care. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **19**: 173-84.
- Krapp C. & J.A. Moody (1992) Timed kill assay for determining synergy. In: Isenberg HD ed. ASM Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington DC.
- Lee T.C., M.M. Carrick, B.G. Scott, J.C. Hodges & H.Q. Pham (2007) Incidence and clinical characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* necrotizing fasciitis in a large urban hospital. *Am. J. Surg.* **194**: 809-12.
- Li S., J. Li, Y. Qiao, X. Ning, T. Zeng & X. Shen (2014) Prevalence and invasiveness of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis. *Indian J. Pathol. Microbiol.* **57**: 418-22.
- Nan L., K. Yang & G. Ren. (2015) Anti-biofilm formation of a novel stainless steel against *Staphylococcus aureus*. *Mater. Sci. Eng. Mater. Biol. Appl.* **51**: 356-61.
- Okuda K.I., T. Zendo, S. Sugimoto, T. Iwase, A. Tajima, S. Yamada, *et al.* (2013) Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother.* **57**: 5572-9.
- Otto M. (2008) Staphylococcal biofilms. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **322**: 207-28.
- Ray G.T., J.A. Suaya & R. Baxter (2013) Incidence, microbiology, and patient characteristics of skin and soft-tissue infections in a U.S. population: a retrospective population-based study. *BMC Infect. Dis.* **13**: 252.
- Severina E., A. Severin A & A. Tomasz (1998) Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram positive pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**: 341-7.
- Sparo M (2006) Investigación de bacteriocinas de bacterias ácido-lácticas en el Partido de Tandil. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.
- Sparo M., G.G. Nuñez, M. Castro, M.L. Calcagno, M.A. García Allende, M. Ceci, *et al.* (2008) Characteristics of an environmental strain, *Enterococcus faecalis* CECT7121 and its effects as additive on craft dry-fermented sausages. *Food Microbiol.* **25**: 607-15.
- Sparo M.D., D.G. Jones & S.F. Sánchez Bruni (2009) Assessment of the *in vitro* efficacy of the novel antimicrobial peptide CECT7121 against human Gram-positive bacteria from serious infections refractory to treatment. *Chemotherapy* **55**: 270-7.
- Sugimoto S., T. Iwamoto, K. Takada, K. Okuda, A. Tajima, T. Iwase, *et al.* (2013) *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host pathogen interaction. *J. Bacteriol.* **195**: 1645-55.
- Swartz M.N. (2004) Clinical practice. Cellulitis. *N Engl J Med* **350**: 904-12.
- Vlastarakos P.V., T.P. Nikolopoulos, P. Maragoudakis, A. Tzagaroulakis, E. Ferekidis (2007) Biofilms in ear, nose, and throat infections: how important are they? *Laryngoscope* **117**: 668-3.
- Winn W.C., S.D. Allen, W.M. Janda, E.W. Koneman, G.W. Procop, P.C. Schreckenberger, *et al.* (2008). Koneman. Diagnóstico microbiológico. 6ª ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.