UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, QUÍMICAS Y NATURALES

CENTRO DE INVESTIGACIÓN y DESARROLLO TECNOLÓGICO DR. ROGELIO S. STAMPELLA (CIDeT)
Directora: Miguel Schmalko

Revista de Ciencia Y Tecnología

COMITÉ EDITORIAL
Directora/Editora: Dra. María Cristina Area. (m_c_area@fceqyn.unam.edu.ar).
Área Bioquímica y Farmacia: Dr. Severino Bargardi. (sebarces@escenf.unam.edu.ar).
Área Ingeniería y Tecnología: Dra. Alicia Ares. (aares@fceqyn.unam.edu.ar).
Área Genética y Biología: Dr. Sergio Andrés Tonón. (labimap@mbf.unam.edu.ar).

COMITÉ DE REVISIÓN

Área Bioquímica y Farmacia:
Dra. Regina de Wikinski. UBA. Metabolismo de lípidos y bioquímica clínica.
Dr. Eduardo Ercoli. U.N. Cuyo. Microbiología industrial.
Dra. María M. Elías. U.N. Rosario. Bioquímica clínica.
Dra. Clara E. López. U.N. Rosario. Micología.
Dr. Alfredo Zurita. U.N.N.E. Parasitología.

Área Genética y Biología:
Prof. Ing. Fernando Dulout. U.N. La Plata. Genotoxicidad y genética general.
Ing. Aveliano Fernández. U.N.N.E. Genética vegetal.
Dr. Juan L. Santos. U. Comp. de Madrid. Biología general.
Dr. Carlos M. Abatte. PROIMI. Tucumán. Microbiología industrial.
Dr. Marcelo Cabada. U.N. Rosario. Biología del Desarrollo.
Dr. Alfredo Recca. Sec. Rec. Nat. y D.S. Medio ambiente.
Lic. Beatriz A. de Avanza. U.N.N.E. Herpetología, Anatomía Comparada.
Dr. Edgardo Romero. U.B.A. Palinología, paleobotánica, paleofitogeografía.
Dr. Mario A. Poli. CNIA - INTA. Castelar. Genética de bovinos, caprinos y ovinos. Genética de poblaciones.
Dr. Vilardi, Juan César. UBA. Genética y Evolución. Genética vegetal y de poblaciones.
Dra. Mónica Martella. U. N. Córdoba. Ecología, conservación y manejo de especies de flora y fauna amenazadas.
Prof. Dr. Eduardo A. Ceccarelli. U.N. Rosario. CONICET - Biología molecular.

Esta Revista es un servicio del CIDET. Está prohibida su venta a terceros como también la reproducción total o parcial con fines comerciales. Los trabajos presentados han sido aceptados para su publicación por el Consejo de Dirección y el Consejo de Edición. La Revista no se hace responsable de las opiniones contenidas en los artículos, siendo de responsabilidad exclusiva de los autores de los mismos. La edición de la Revista cuenta con el apoyo económico de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales y de la Secretaría General de Ciencia y Tecnología de la UNaM.

Toda correspondencia relacionada a la Revista, debe ser dirigida a: Sr. Director del CIDeT / Félix de Azara 1552 / 3300 POSADAS. Misiones. Rep. Argentina / Teléfono: 54 - 3752 - 422186 - Fax: 54 - 3752 - 425414- E-mail: cidet@fceqyn.unam.edu.ar

EQUIPO EDITORIAL

Diseño de Maquetas: Sergio Manela

Armado de interiores y cubierta: Francisco A. Sánchez

Revisión de texto: Amelia E. Morgenstern

Revisión de texto en inglés: Cristina E. Mayol, M. A.

Colaboradora Técnica: Zulma Achar

Revista de Ciencia y Tecnología on line: www.fceqyn.unam.edu.ar/recyt

Hecho el depósito de la Ley 11723

Impreso en Argentina

ISSN: 0329-8922

Revista de Ciencia y Tecnología

Bioquímica y Farmacia / Genética y Biología

ÍNDICE

AÑO 7 / Nº 7a / 2005

BIOQUÍMICA Y FARMACIA

5 Análisis costo efectividad Ace del tratamiento de cáncer prostático en la seguridad social de la provincia de Misiones Argentina / Falkowski, J. C.; Blariza, J. M.; Bañay, E.; Gómez, L.; Jabornisky, J.; Duarte, A.

13 Micósis sistémicas oportunistas en nuestro medio / Vedoya, M. C.; Medvedeff, M. G.; Mereles, B. E.; Chade, M. E.; Silva, G.

18 Cuantificación de Amoxicilina en formas farmacéuticas por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa / De Battista, G. A.; Valdéz, J. R.

28 *Escherichia coli* enteropatógena: influencia de concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacina sobre factores asociados a la virulencia / Quiroga, M.; Oviedo, P.; Pegels, E.; Husulak, E.; Jordá, G.; Ortíz, A.; Ruttler, M. E.; Vergara, M.

37 Homeostasis de los electrolitos sodio y potasio en población normotensa de la ciudad de Posadas / Maskin de Jensen, A.; López, M.; Jiménez de Aragón, S.; Mir, C.; Fernández, V.

45 Factores de riesgo aterogénicos: influencia sobre glúcidos y lípidos sanguíneos de ancianos del Nordeste argentino / Mussart, N. B.; Coppo, J. A.; Coppo, D. J.

53 Impacto de la parasitosis en infantes residentes del municipio de Colonia Aurora, Provincia de Misiones / Meyer, A. G.; De Torres, R.

60 Nivel de informacion sobre factores de riesgo aterogenico en empleados de dos hospitales publicos / Castillo Rascón, M. S.; Bonneau, G. A.; Sánchez, A. R.; Ceballos, B.; Malarczuk, E. C.; Medina, G. E.; Jiménez, S.; Pianesi, M. E.; Castillo, C.

GENÉTICA Y BIOLOGÍA

68 Estudios citogeneticos en tres especies de aves antárticas / Ledesma, M. A.; Cardozo, D. E.; Montalti, D.; Leotta, G. A.; Gunski, R. J.

73 Lista de las especies de peces del tramo Ituzaingó-Iguazú del Río Alto Paraná (Argentina) / Roa, B. H.

80 Método para el aislamiento y purificación de ADN de *microcystis* spp. / Llano, V. M.; Meichtry, N. R.; Tonon, S. A.

87 Detección molecular de Virus Herpes Simple en muestras aórticas de pacientes con aterosclerosis coronaria. / D'Errico, R. A.; Gotti, A.; Gomez Moreno, J.; Tonon, S. A.

95 LISTADO DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN VIGENTES (DICIEMBRE 2004)

97 GUÍA PARA AUTORES

In memorian:

Dr. Fernando O. Benassi (falleció en enero 2005)
Ing. Federico Emiliani (falleció en octubre 2004)

Rev. Cienc. Tecnol.
Año 7 / Nº 7a / 2005 / 5-12

ANÁLISIS COSTO EFECTIVIDAD ACE DEL TRATAMIENTO DE CÁNCER PROSTÁTICO EN LA SEGURIDAD SOCIAL DE MISIONES ARGENTINA

Falkowski, J. C. / Blariza, J. M. / Bañay, E. / Gómez, L. / Jabornisky, J. / Duarte, A.
Modulo de Bioquímica y Farmacia, Cátedras de Química Medicinal y Fisiopatología, F.C.E.Q.yN, Universidad Nacional de Misiones. Mariano Moreno Nº 1375, Posadas, Misiones, CP 3300, valproat@hotmail.com.

ABSTRACT

COST-UTILITY AND EFFECTIVENESS IN THE TREATMENT OF PROSTATIC CÁNCER IN THE SOCIAL SECURITY OF PROVINCE MISIONES ARGENTINA

Prostate cancer is the most common malignancy in men and is second only to lung cancer in cancer related deaths. Androgen suppression, or hormonal therapy, is the support of treatment for recurrent or advanced (non-localized) prostate cancer. There is no difference in survival among different treatments of androgen blockade monotherapy. The choice of monotherapy is based on professional preference but will be associated with marked differences in cost of the drugs used. The androgen suppression with LHRH analogues is the better relation cost effectiveness. and in thus case triptoreline is one of the minor cost. All other strategies — LHRH, NSAA, and both combined androgen blockade strategies or Maximun Androgenic Blockade (MAB) therapy had higer costs and little advantage in relation to the effectivity in years adjusted for quality of life compared to triptoreline therapy . Marginal cost effectiveness ratio of NSAA + LHRH versus triptoreline is $401926/ QALY).

KEY WORDS: Prostate cancer, cost-effectiveness, Triptoreline, Hormonal treatment.

RESUMEN

El cáncer de próstata es la enfermedad neoplásica más común en los hombres y la de mayor mortalidad después del cáncer de pulmón. La supresión de andrógenos o la terapia hormonal, es el soporte principal de tratamiento para el cáncer de próstata avanzado (no localizado) o recurrente. No hay ninguna diferencia en la supervivencia entre los diferentes tratamientos de bloqueo androgénico con monoterapia. La opción por la terapia está basada en la preferencia del médico prescriptor pero se asociará con marcadas diferencias en el costo de acuerdo a la droga utilizada. La supresión del andrógeno con los análogos de LHRH, es el de mejor relación costo eficacia siendo la triptorelina la de menor costo. Todas las otras estrategias terapéuticas -con otros análogos de LHRH, Antiandrógenos esteroides o no esteroides, o las terapias de Bloqueo Androgénico Máximo - tienen costos más altos y poca ventaja respecto a la efectividad en años ajustados por calidad de vida comparadas al régimen de triptorelina (el costo utilidad incremental de diferentes antiandrógenos + análogos de LHRH contra la monoterapia con triptorelina es cercano a $401926/ AVACs).

PALABRAS CLAVES: Cáncer de próstata, costo efectividad, Triptorelina, tratamiento hormonal.

INTRODUCCIÓN

En la Argentina el cáncer es la segunda causa de muerte (el primer lugar lo ocupan las enfermedades cardiovasculares). Para los varones, el de mayor incidencia en la mortalidad es el cáncer de pulmón, seguido por el de próstata, colon y recto, estómago y esófago.

El estudio en particular utiliza el Banco de Datos de Auditoría Oncológica del Instituto Provincial de Previsión Social (IPSM) y los registros actuariales del valor de consumo en Dosis Definidas Diarias (DDD) establecidas por el Nordic Council on Medicines y posteriormente generalizadas por el European Drug Utilization Research Group para cada droga. [1,2].

Dentro del contexto de la economía de la salud y, más precisamente, de la farmacoeconomía, el análisis económico mediante la aplicación de diferentes técnicas de estimación/determinación de costos y beneficios se ha ido extendiendo de manera creciente con lo cual existen métodos para la evaluación del costo efectividad y costo utilidad de cada protocolo aplicado [3]. En nuestro país se encuentran formas comerciales de cualquiera de las drogas citadas. Dentro de las opciones terapéuticas se encuentran: Bloqueos Hormonal Simple con antiandrógenos, dietiletilbestrol o análogos LHRH y Bloqueo androgénico Máximo (MAB) basado en el uso de análogos LHRH combinados con antiandrógenos. Se calcula el costo a cinco años de cada protocolo de acuerdo a las ecuaciones farmacoeconómicas clásicas. En este artículo en particular se determinan los costos de tratamiento a Mayo 2003. Respecto a la eficacia de las diferentes terapias, estas se evalúan en función de la producción de salud que relaciona el gasto por protocolo con la esperanza de vida o años de vida ajustados por calidad (AVAC's) [2,3]. La supervivencia a 5 años para los dos regímenes terapéuticos no varía entre las drogas utilizadas dentro de las diferentes categorías farmacológicas siendo similares entre sí y que la supervivencia a 5 años comparada entre el Bloqueo Hormonal Simple y el Bloqueo Hormonal Máximo es de solo 3 % con un incremento de 0.25 AVACs. En tal perspectiva la maximización del resultado en términos de salud conduce a la regla de decisión óptima de cobertura basada en aplicar un valor umbral por año de vida ganado consistente con la eficacia del recurso terapéutico.

Otros recursos terapéuticos como: Tratamiento Hormonal con dietilbestrol; Bloqueo Hormonal Quirúrgico (Orquidectomia bilateral); Braquiterapia de implantación; prostatectomía radical con linfadectomía y radioterapia [6]: si bien constituyen recursos terapéuticos no presentan utilización en nuestro medio. La eficacia de los nuevos protocolos intermitentes (Bloqueo Androgenico Intermitente BAI) actualmente se encuentran en estudio; desconociéndose su eficacia (AVACs) a nivel mundial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizan bancos de datos comerciales para la obtención de campos representativos de costos, específicamente para este fin se utiliza el Banco de datos Alfa Beta. Por otro lado se utiliza un banco de datos propios del Área de Auditoria Médico Farmacéutica IPSM: Banco de datos BACPA para la obtención de campos representativos de código ATC. Las aplicaciones están realizadas mediante Sistema Acces 2000/Visual Basic 6.0.

Se plantea un Análisis de Costo Efectividad (ACE) , utilizado con frecuencia en la evaluación de tecnología sanitaria y comúnmente aceptado tanto por economistas como por profesionales sanitarios La unidad con la cual se miden los resultados es el año vida ajustado por calidad AVACs [7]. Los AVAC constituyen una medida del output sanitario que combina ganancias en cantidad y calidad de vida para obtener un índice sintético que permite comparar ganancias en la salud conseguidas de muy diversas formas. Para obtener AVAC se utilizan, con bastante frecuencia, los denominados perfiles de calidad de vida basados en utilidades. Entre ellos cabe destacar el Quality of Well- Being scale (QWB), el Euroqol y el Health Utility Index (HUI). Por lo tanto, la calidad de vida [Qt(s)] de las personas es consecuencia tanto del paso de la edad como de la presencia de diversas enfermedades. De ahí que la calidad de vida [8] esperada puede expresarse de la siguiente manera:

Qt(s)=[AVAC para edad s] + S Pr [problema d a la edad s] x [AVAC para d]

Donde "d" es un determinado problema de salud. La variación en Qt(s) nos sirve para medir la variación en la cantidad de salud (AVAC) de que pueden disfrutar las personas entre dos momentos del tiempo determinados.

En términos prácticos este tipo de medidas nos permite comparar programas e intervenciones sanitarias en términos de eficacia relativa y orientar tomas de decisiones. Se utilizan los valores de AVACs [8] para las diferentes opciones terapéuticas a través de los valores calculados por la Agency for Health Care Policy and Research, Rockville [14] en concordancia con otras bases internacionales.

Como criterio de trabajo se atribuye la equivalencia de los valores correspondientes a los AVACs (QALYs) calculados según métodos de valoración contingente

para USA/CANADÁ de los estudios citados con los de nuestro medio. Esta asunción puede ser admitida bajo la circunstancia de que el cáncer de próstata ocurre en pacientes en general retirados y sin actividad laboral (añosos) con lo cual el efecto valorativo de ingresos laborales/calidad de vida presentan sesgos mínimos respectos a ingresos y los errores provenientes de esta asunción pueden considerarse admisibles [9].

Respecto al cálculo de costos acumulados por protocolo, se resume en la expresión 1:

$$\text{Costo Trat} = \sum_{T=1}^{T=AVACs} \left(\left[\sum_{N=1}^{N=x} \text{DDD consumidos X Costo DDD}_{\text{i}} \right]_t + \left[\sum_{N=1}^{N=x} fc_i \right] \right) \qquad \text{(expresión 1)}$$

Siendo el componente Costo DDDi una función compleja (ecuación 1) dependiente del costo en pesos de la presentación comercial (CN) ; unidades por presentación comercial (UPN); mg por forma farmacéutica (mg f.f.) y mg por dosis diaria definida (mg DDD).

$$\text{Costo DDD i} = \frac{\text{CN X mg DDDi}}{\text{UPN X mg f.f.i}} \quad \text{(ecuación 1)}$$

y el componente de costo no directo fc i = factor de costo no directo solo válido para los análogos LHRH por inyección subcutánea abdominal efectuada por el médico en aplicación ambulatoria (requiriendo una consulta específica), por lo cual se calcula un valor de $0.5 diario dado que la aplicación es mensual [7]. El resto de los tratamientos con ciproterona, flutamida, etc., poseen un fc i=0 , dado que son de uso oral. Se plantean respectivamente como elementos de la sumatoria:

Los meses en tratamiento desde el de inicio (mes 1), hasta el valor correspondiente al AVACs de cada protocolo (T), las diferentes combinaciones de drogas utilizadas , es decir que por caso se plantea el cálculo de costo de cada tratamiento en función de la suma de la contribución de cada tipo de medicación utilizada (análogos LHRH, ciproterona, flutamida, etc.). No se considera el cálculo de costo indirecto. Se calcula por tanto el valor de ACU según la expresión 2 y el ACU incremental según la expresión 3 [7]:

$$\text{ACU} = \text{Costo / AVAC} \qquad \text{(expresión 2)}$$

$$\text{ACU incremental} = \text{Costo protocolo 1} - \text{Costo protocolo 2 / AVACs 1 - AVACs 2} \qquad \text{(expresión 3)}$$

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se considera el tratamiento aplicado al cáncer de próstata avanzado [6] (cuyos criterios de estadificación se encuentra más allá del presente artículo) clasificados como: T4, N0, M0, cualquier G; o cualquier T, N1 a N3, M0, cualquier G; Estadios D1 o D2. Dentro de las opciones terapéuticas reconocidas para el tratamiento de estos estadíos [11] se encuentran la terapia hormonal, con cualquiera de las siguientes drogas antiandrógenos; análogos LHRH (hormona liberadora de hormona luteinizante), análogos LHRH más antiandrógeno (MAB Maximun Androgenic Blockade) y estrógenos (dietiletilbestrol). Dentro de los tratamientos no hormonales se encuentra la orquidectomía bilateral como recurso antihormonal. Están bajo investigación la prostatectomía radical con orquiectomía inmediata, la quimioterapia sistémica, la radioterapia y braquioterapia. La curación es infrecuente, pero pueden ocurrir respuestas subjetivas u objetivas sorprendentes en muchos pacientes. En nuestro medio no se practica la prostectomía radical, la orquidectomía bilateral, ni la braquiterapia radiante.

El mayor tipo de tratamiento utilizado corresponde al de la terapia hormonal (99% de los casos) definiéndose la dosificación y uso de las diferentes drogas a través de los DDD mensuales por protocolo (Tabla 1).

En general se ha encontrado que el único tipo de tratamiento aplicado al cáncer de próstata (incluso con valores TNM y Gleasson menores, ya que no se suele llegar a un diagnóstico con determinación exacta del estadio) son los citados anteriormente como Análogos LHRH y Análogos LHRH más antiandrógeno (MAB Maximun Androgenic Blockade).

Existen en el mercado argentino una oferta integral de diferentes drogas antihormonales aplicadas al tratamiento del cáncer de próstata [10]; verificándose entre las drogas Análogos de LHRH (hormona liberadora de hormona luteinizante) una oferta de 5 presentaciones comerciales de Leuprolide de 22. ; 7.5 y 3.75 mg; 3 presentaciones de Goserelin de 10 y 3.6 mg ; una presentación comercial de Buserelin de 6.3 mg. y 2 presentaciones de Triptorelina 0.1 y 11.25 mg. (Figura 1).

Entre las drogas Antiandrógenas no esteroideas existe una oferta de 1 presentación comercial de Nilutamida de150 mg; 12 presentaciones de Flutamida de 250 mg; y 10 presentaciones comerciales de Bicalutamida de 50 mg. Entre las drogas Antiandrógenas esteroideas existe una oferta de 20 presentaciones comerciales de Ciproterona de 50 mg. (Figura 2).

Tambien se presentan metanálisis [11,12] y estudios clínicos que justifican el presente estudio de costo. Die-

Tabla1: Protocolos Terapéuticos por drogas, Dosis Diarias Definidas unitarias y por protocolo mensual

Protocolos Terapéuticos	Drogas	DDD mensuales por protocolo	Dosis Diaria Definida en mg
MAB Máximo Bloqueo Androgénico	Leuprolide	65.22	0.115
	Goserelin	28.13	0.128
	Buserelin	114.55	0.11
	Triptorelina	27.99	0.134
	Ciproterona	75	100
	Bicalutamida	30	50
	Flutamida	333.32	75
Bloqueo Androgénico	Ciproterona	150	100
	Bicalutamida	30	50
	Flutamida	333.32	75
Bloqueo androgénico con An LHRH	Leuprolide	65.22	0.115
	Goserelin	28.13	0.128
	Buserelin	114.55	0.11
	Triptorelina	27.99	0.134

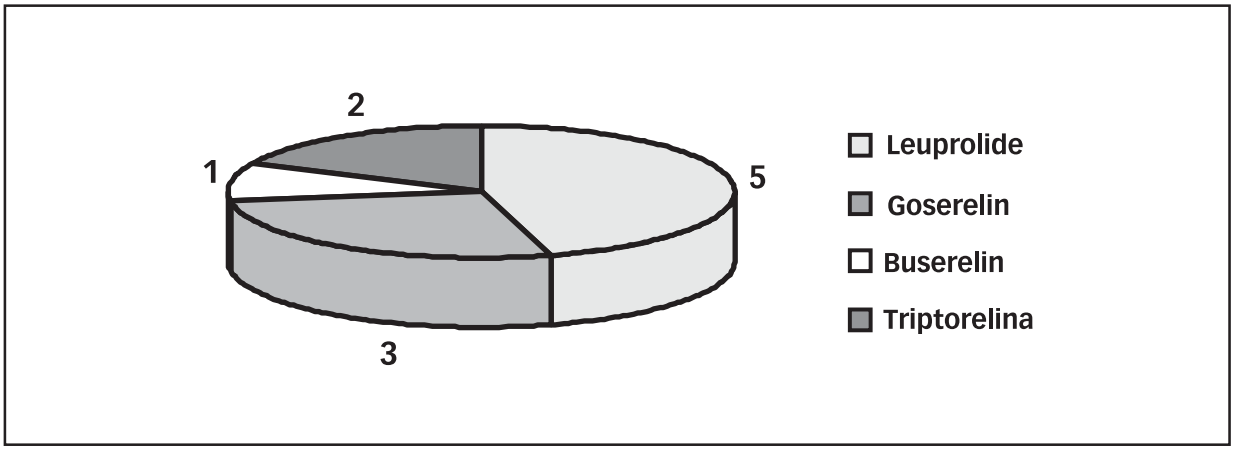

FIGURA 1: Oferta de LHRH en el Mercado Farmacéutico Argentino.

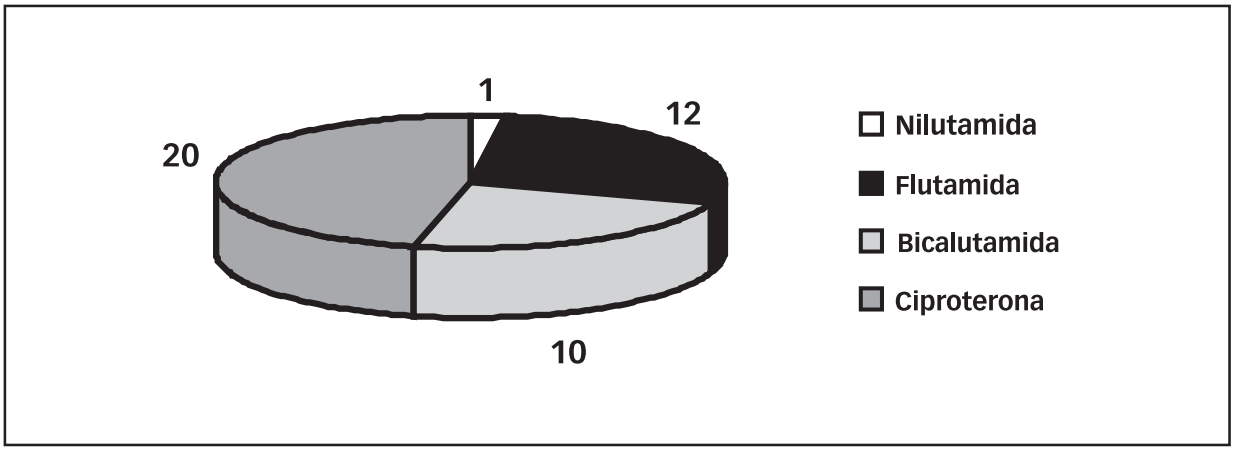

FIGURA 2: Oferta de Antiandrógenos en el Mercado Farmacéutico Argentino.

ciocho ensayos clínicos no han reportado diferencias significativas en la supervivencia, incluyendo el más grande de los estudios clínicos (Intergroup trial (INT 0105)), a cargo del the Southwestern Oncology Group (SWOG), que ha incluido 1.382 pacientes en la comparación entre el uso de la terapia MAB y las de Castración química con análogos LHRH. Tres ensayos clínicos han reportado diferencias significativas en la supervivencia favoreciendo la terapia MAB. Se reporta una supervivencia de 3.7 a 7 meses; y un incremento en sobrevida a los 5-años de 3 a 9 por ciento. En tanto los metanálisis no demuestran diferencias entre monoterapias y MAB en la sobreviva a 2 años (hazard ratio=0.970; 95 por ciento CI=0.866 a 1.087). Pero se verifica una ventaja relativa para la MAB en la supervivencia a 5 años (hazard ratio=0.871; 95 por ciento CI= 0.805 a 0.942) [12].

En la figura 3 se comparan las curvas de supervivencia para los diferentes esquemas de tratamiento se puede observar que la supervivencia a 5 años para los dos regímenes terapéuticos no varía entre las drogas utilizadas dentro de las diferentes categorías farmacológicas siendo similares entre sí. Tambien se demuestra que la supervivencia a 5 años comparada entre el Bloqueo Hormonal Simple y el Bloqueo Hormonal Máximo es de solo 3% con un incremento de 0.25 AVACs (Figura 3).

Por lo tanto se ha planteado el cálculo de costo acumulado para los dos protocolos de tratamiento Bloqueo Hormonal Simple con los diferentes análogos LHRH o antiandrógenos como monoterapia y el Bloqueo Hormonal Máximo con asociaciones de los diferentes análogos LHRH y antiandrógenos.

Se obtiene el costo por periodo en función de cálculos progresivos de costo (expresión 1), aplicando los valores consignados en la tabla 1 y las ecuaciones anteriormente citadas (Tabla 2, Tabla 3).

En tal perspectiva la maximización del resultado en términos de salud conduce a la regla de decisión óptima de cobertura basada en aplicar un valor umbral por año de vida ganado consistente con la eficacia del recurso terapéutico.

El protocolo de menor costo corresponde al uso del dietiletilbestrol con 718 $/AVACs con una eficacia de 4.68 AVACs, siendo a la vez el de mayor experiencia acumulada. Si bien presenta una alta incidencia de efectos adversos; hoy en día en desuso, este tipo de terapia no se utiliza y no hubo casos de pacientes con este tratamiento.

El protocolo de mejor relación costo eficacia es el de triptorelina con 10297 $/AVACs con una eficacia cercana a 4.9 AVACs. Dentro del mismo tipo de tratamiento con análogos LHRH tenemos como protocolo de mayor costo al de leuprolide con 17469 $/AVACs. Lo que implica un aumento cercano al 70% para dos tratamiento equivalentes en eficacia.

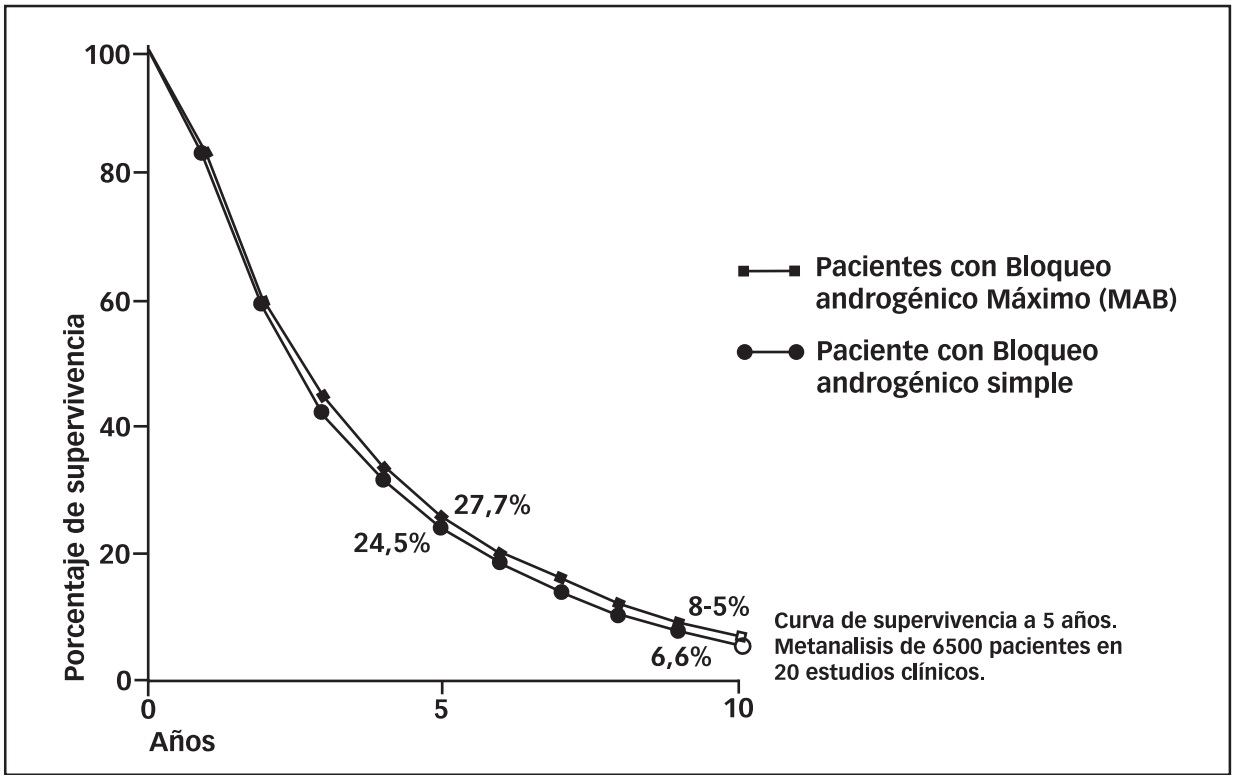

FIGURA 3: Eficacia relativa comparada entre protocolos de bloqueo androgénico simple y bloqueo androgénico máximo.

En tanto el protocolo de mayor costo correspondiente a la asociación de análogos LHRH y antiandrógeno (MAB Maximun Androgenic Blockade) corresponde a la asociación leuprolide + ciproterona con 30069.24 $/AVACs con una eficacia de 5.15 AVACs; seguido por el de buserelin + ciproterona con un costo eficacia de 26760 $/AVACs. y el de goserelin + ciproterona con 25826.64$/AVACs. Se han encontrado una gran cantidad de casos con este tipo de tratamiento; representando cerca del 47% del total de los diagnósticos de cancer de próstata.

En una segunda instancia se plantea la comparación de los dos tipos de tratamiento: ¿cuán más eficiente es el

Tabla 2: drogas y protocolos aplicados al tratamiento del cáncer de próstata, eficacia en AVACs y costos

Protocolo	Droga	Droga	costo mensual en pesos	efectividad en AVACs	Costo/AVACs	Costo trat. en pesos
LHRH	leuprolide		1455.77	4.89	17469.24	85424.58
	goserelin		1102.22	4.89	13226.64	64678.27
	buserelin		1180	4.89	14160.00	69242.4
	triptorelina		858.14	4.89	10297.68	50355.66
Antiandrógenos	ciproterona		1050	4.61	12600.00	58086
	bicalutamida		276	4.61	3312.00	15268.32
	flutamida		300	4.61	3600.00	16596
	ciproterona		2100	4.61	25200.00	116172
MAB (Asociación)	leuprolide	ciproterona	2505.77	5.15	30069.24	154856.59
	leuprolide	bicalutamida	1455.77	5.15	17469.24	89966.59
	leuprolide	flutamida	1755.77	5.15	21069.24	108506.59
	goserelin	ciproterona	2152.22	5.15	25826.64	133007.2
	goserelin	bicalutamida	1378.22	5.15	16538.64	85174
	goserelin	flutamida	1402.22	5.15	16826.64	86657.2
	buserelin	ciproterona	2230	5.15	26760.00	137814
	buserelin	bicalutamida	1456	5.15	17472.00	89980.8
	Buserelin	flutamida	1480	5.15	17760.00	91464
	triptorelina	ciproterona	1908.14	5.15	22897.68	117923.05
	triptorelina	bicalutamida	1134.14	5.15	13609.68	70089.85
	triptorelina	flutamida	1158.14	5.15	13897.68	71573.05

Tabla 3: drogas y protocolos aplicados al tratamiento del cáncer de próstata, costos por DDD

Terapia	Droga	mg por forma farm.	unidades por present. Com.	Dosis Diaria Definida	Dosis Diaria por present.	Factor de costo no directo	DDD mens. por protocolo	Costo por DDD consumida pesos	Costo directo por trat. mensual (pesos)	Costo no directo por trat. mensual (pesos)	Total (pesos)
		Mg f.f.	UP_N	mg DDD	UP_N X mgf.f.i mg DDDi	fc_i		C_N X mg DDD UPN X mg f.f.i			
LHRH	leuprolide	7.5	1	0.115	65.22	0.5	65.22	21.86	1425.77	30	1455.77
	Goserelin	3.6	1	0.128	28.13	0.5	28.13	38.12	1072.22	30	1102.22
	buserelin	12.6	1	0.11	114.55	0.5	114.55	10.04	1150	30	1180
	triptorelina	3.75	1	0.134	27.99	0.5	27.99	29.59	828.14	30	858.14
antiandrogenos	ciproterona	50	50	100	25	0	75	14	1050	0	1050
	bicalutamida	50	50	50	50	0	30	9.2	276	0	276
	flutamida	250	50	75	166..66	0	333.32	0.9	300	0	300
	Ciproterona*	50	50	100	25	0	150	14	2100	0	2100

* cuando es utilizado como monoterapia.

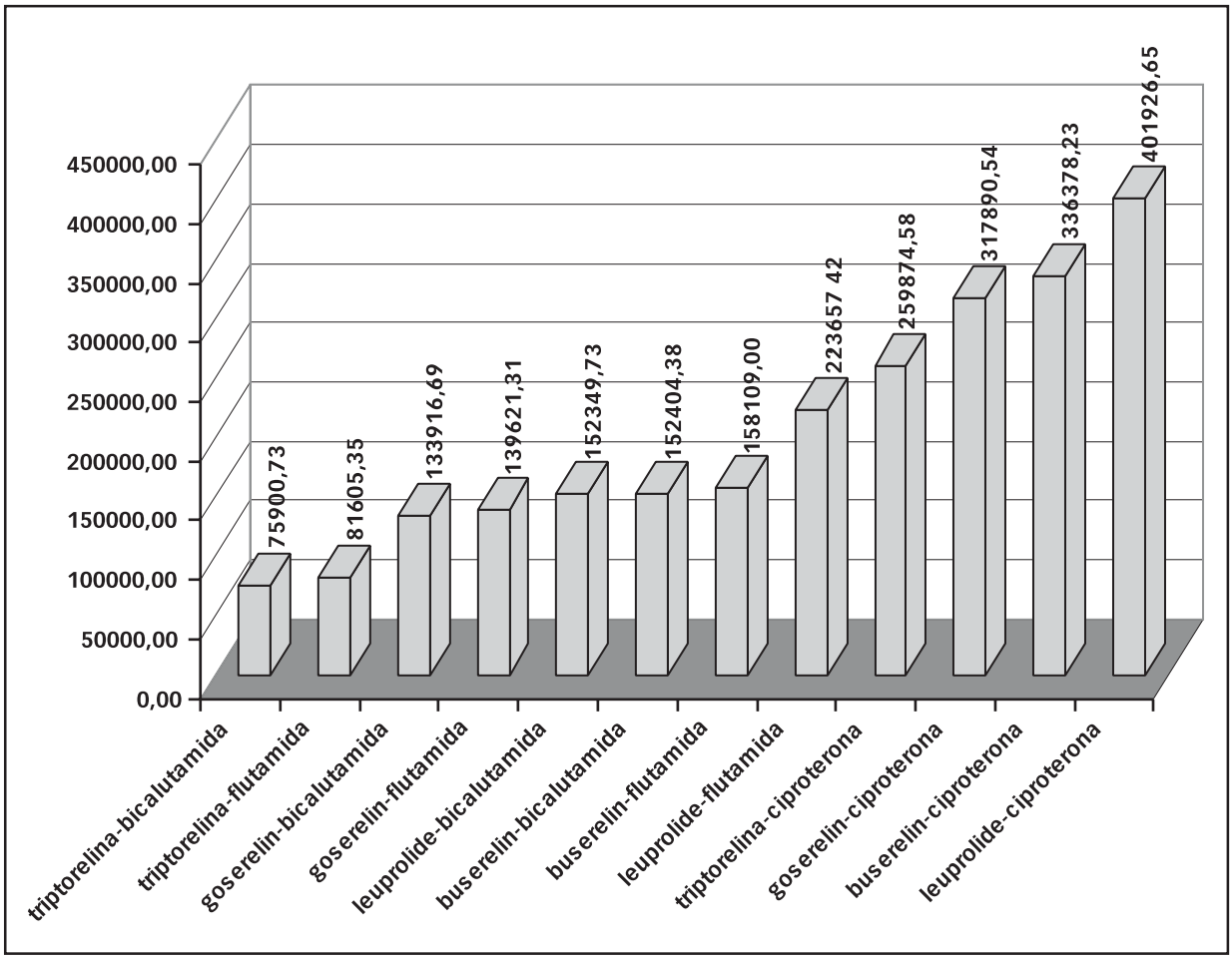

FIGURA 4: Costo Utilidad Incremental de diferentes asociaciones MAB versus triptorelina.

tratamiento de bloqueo hormonal con análogos *versus* el MAB? Sabemos por un lado que las diferencias en la eficacia corresponde a 0,26 AVACs; pero con grandes diferencias de costo (por ejemplo el bloqueo con triptorelina 10297 $/AVACs respecto al tratamiento combinado MAB leuprolide + ciproterona con 30069.24 $/AVACs). La relación establecida para definir este tipo de comparación se establece a través del denominado ACU incremental [7] y se encuentra ilustrado en la (Figura 4).

Al comparar los dos protocolos se encuentra una relación de costo utilidad incremental de 401926 $/AVACs para el protocolo leuprolide + ciproterona versus triptorelina. Es necesario señalar que en la evaluación sanitaria costo-utilidad una conducta es admisible con cocientes de costo-utilidad incremental menor a U$S 50.000 por AVACs (por ejemplo el transplante renal, posee una valor cercano a U$S 38.000 por AVACs) y teniendo en cuenta que la Seguridad Social financia de este tipo de protocolos combinados; es compatible con la observación de inequidades en salud.

Este tipo de consideraciones respecto a la justificación de costo efectividad agregada a evidencias experimentales referente a la hormonodependencia parcial del cáncer de próstata motiva un gran impulso que se está dando a nivel mundial respecto a una nueva modalidad de tratamiento denominada bloqueo androgénico intermitente (BAI); pero la eficacia no ha sido adecuadamente determinada para ser incluida en el presente trabajo [13] .

El uso de antiandrógenos en Bloqueo Hormonal Simple, poseen relaciones de costo eficacia realmente poco favorables con costos que oscilan entre 18260 $/AVACs con eficacias menores a los 4.6 AVACs; siendo poco utilizados y no existiendo casos de pacientes con este tratamiento en monoterapia.

CONCLUSIÓN

La supervivencia y la calidad de vida son las dos variables finales con las que se debe evaluar cualquier tratamiento anticanceroso. En un conjunto de situaciones de alto impacto en cuanto a años de vida perdidos, dado que la tercera parte de los pacientes tienen menos de 65 años y con un alto consumo de recursos en aumento vertiginoso (9 billones $ en 1985 mundial, con proyec-

ción de 28 billones $ en el año 2005), la optimización de estos recursos nos obliga a ofrecer alta calidad a bajo coste, usando los conceptos de eficacia, seguridad, efectividad y eficiencia [3].

Ejemplos paradigmáticos los encontramos en la estrategia del tratamiento del cáncer de próstata avanzado en donde existen protocolos con similares grados de eficacias pero con diferencias de costos de hasta un 300%, en tanto el agente financiador (Seguridad Social) no discrimina estos aspectos en sus tareas de auditorías.

Las conclusiones de amplios metaanálisis sobre situaciones de alta prevalencia como el cáncer de próstata avanzado nos pueden ayudar a confeccionar guías clínicas que contemplen el tratamiento específico (que sabemos costoso), en este sentido el bloqueo hormonal con análogo de LHRH con triptorelina es el de costo más eficiente en beneficio de las utilidades bajo un principio económico de restricción presupuestaria [7]. Desde el punto de vista del cálculo de coste por proceso, los estudios de farmacoeconomía y calidad de vida, nos permitirán desmitificar posturas tópicas de "criterio médico hegemónico" [4,5] o de encarnizamiento terapéutico.

El componente de ahorro generado por este tipo de análisis puede permitir la disminución de la cápita oncológica de las prestaciones, respecto a otras prestaciones especiales como diabetes, atención primaria, etc. ●

REFERENCIAS

1. Laporte, J. R.; Tognoni, G.
Principios de Epidemiología del Medicamento, Ed. 2 Edic. Científicas y Técnicas Masson Salvat Barcelona, 1993.

2. Capella, D.
Descriptive tools and análisis, Dukes MNG ed. Drug utilization studies: methods and uses, Copenaghe: WHO Regional Office for Europe, 1970.

3. Eisenberg, J. M.; Schulman, K. A.; Glick, H.; Koffer H.
Pharmacoeconomics: Economic Evaluation of Pharmaceuticals. In: Strom B, ed., Pharmacoepidemiology. New York: John Wiley & Sons, 1995; 469-505.

4. Gálvez González, A. M.
La farmacoeconomía en la eficiencia de la salud pública, Rev. Cubana Salud Pública; 1999; 25 [1]: 81-5

5. Meyerhoff, R.
Descentralización, Financiamiento, Costo y Autogestión de Establecimientos de Salud: una visión integrada. Publicación OPS. 1997.

6. The National Cáncer Institute of The National Institute sof Health. *PDQ Treatment Summary for Health Professionals: Prostate Cancer.*

7. Vega, A. H.; De Las Cuevas, C. I.; Señaris, J.
Economía de la Salud, Ed. Pirámide, Madrid, 2001.

8. Pinto Prades, J.
El Valor de la Salud: un enfoque basado en el análisis Coste Beneficio. Centre de Recerca en Economia i Salut, Barcelona.

9. Blomqvist A.
Economic efficiency and QALY-based Cost-Utility Analysis in Health Care Department of Economics, University of Western Ontario, London, Canada, N6A 5C2.).

10. Dr. Franco, J. C.; Jaborniski, J.; Falkowski J. C.
Informe de Auditoría Oncológica, IPSM, 2000.

11. Murphy, G.; Laurence, W.; Lenhard, R.
Oncología Clínica Manual de la American Cáncer Society, ED. 2 Pub. Cientif. N 559, OPS, Washington, 1996.

12. Prostate Cáncer Trialists' Collaborative Group: *Maximum androgen blockade in advanced prostate cáncer: an overview of 22 randomised trials with 3283 deaths in 5710 patients.* Lancet 346, (8970): 265-269, 1995.

13. Vilanova, M.
Cáncer de próstata. Bloqueo androgénico intermitente, Oncologia Clinica, Vol. VIII, Nº 1.

14. T*he Relative Effectiveness and Cost-Effectiveness of Methods of Androgen Suppression in the Treatment of Advanced Prostatic Cáncer. Summary, Evidence Report/Technology Assessment: Number 4*, January 1999. Agency for Health Care Policy and Research, Rockville.

Recibido: 01 de Octubre de 2003.
Aprobado: 01 de Octubre de 2004.

Rev. Cienc. Tecnol.
Año 7 / Nº 7a / 2005 / 13-17

MICOSIS SISTÉMICAS OPORTUNISTAS EN NUESTRO MEDIO

Vedoya, M. C. / Medvedeff, M. G. / Mereles, B. E. / Chade, M. E. / Silva, G.
Laboratorio de Micología. Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico. CIDeT. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Av. Mariano Moreno 1375. (3300), Posadas. Misiones. Argentina. Telefax: 54 3752-435118. E-mail: micologia@fceqyn.unam.edu.ar.

ABSTRACT

SYSTEMIC OPPORTUNISTIC MYCOSES OF OUR ENVIROMENT

We present a compilation of opportunistic systemic mycoses detected at the mycology laboratory of the Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales of the Universidad Nacional de Misiones, Argentina, during the year 2003.

Our laboratory covers patients from the Regional Central Hospital "Dr. Madariaga" and the main clinical centres of Posadas City, capital of Misiones, Argentina.

Samples were processed according to the classical diagnostic algorithm: direct microscopic observation of samples, in vitro culturing and taxonomic identification of isolated fungi. In some cases, serological techniques were used, allowing for fungal antigens or circulating antibodies to be detected.

Ninety two samples in total were processed, from which 6 *Cryptococcus neoformans*, 5 *Candida albicans*, 1 *Candida krusei* y 1 *Aspergillus fumigatus* were isolated.

We highlight the importance of the isolation and identification of these fungi from human samples, in particular when clinical signs are not clear.

KEY WORDS: opportunistic systemic mycoses, *Cryptococcus neoformans*, *Candida spp*, *Aspergillus fumigatus*.

RESUMEN

Nos proponemos en el presente trabajo realizar una revisión de la situación actual de las micosis sistémicas oportunistas en el último año.

Las muestras se recepcionaron en el laboratorio de micología de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, servicio que presta a pacientes internados y ambulatorios del Hospital Regional Ramón Madariaga y otros centros asistenciales de la ciudad de Posadas (noreste de la República Argentina).

Las muestras se procesaron de acuerdo al esquema básico de diagnóstico clásico: observación microscópica directa de la muestra patológica procedente de la lesión, cultivo de la misma para aislamiento final e identificación de la especie fúngica implicada. Se aplicaron, además, métodos alternativos al cultivo como técnicas serológicas que permitieron la detección de antígenos fúngicos y anticuerpos circulantes.

Se procesaron 92 muestras de las cuales se aislaron 6 *Cryptococcus neoformans*, 5 *Candida albicans*, 1 *Candida krusei* y 1 *Aspergillus fumigatus*.

Cabe destacar la importancia del diagnóstico de este tipo de micosis, sobre todo cuando el cuadro clínico se presenta con características semejantes a otras patologías más frecuentes, algunas veces tratadas erróneamente por no contar con el diagnóstico de laboratorio.

PALABRAS CLAVES: micosis sistémicas oportunistas, *Cryptococcus neoformans*, *Candida spp*, *Aspergillus fumigatus*.

INTRODUCCIÓN

Las micosis oportunistas han aumentado en los últimos años en forma considerable y estamos asistiendo a un incremento importante de infecciones sistémicas producidas por hongos [1]. Los hongos considerados oportunistas poseen virulencia inherente muy baja, por lo que las defensas del huésped tienen que estar muy disminuidas para que se establezca una infección. Entre los agentes etiológicos más frecuentes se encuentran: *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, entre otros.

El establecimiento de las infecciones oportunistas depende primero de que se haya alterado la resistencia del huésped, más que del tamaño del inóculo. No tienen un área geográfica restringida. El aumento de la frecuencia de estas infecciones ha ido en paralelo con el uso de antibióticos, citostáticos, inmunosupresores, esteroides y procedimientos invasivos, quemaduras extensas, traumatismos, heridas graves, diabetes, transplantes, neutropenia severas, disgamma globulinemias, agranulocitosis, linfomas, SIDA y otras enfermedades mortales. La respuesta celular usual es necrótica supurante que a menudo está pobremente organizada en una reacción granulomatosa [2].

Las enfermedades ocasionadas por levaduras del género *Candida* afectan piel, mucosas y, en ocasiones, a los órganos internos, pudiendo dar origen a micosis sistémicas, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos [3].

La criptococosis es una infección exógena, cosmopolita, de evolución crónica o subaguda, producida por *Cryptococcus neoformans*. La *criptococosis* puede producirse en sujetos normales, pero afecta sobre todo a pacientes inmunodeprimidos o con enfermedades debilitantes. Es la micosis sistémica que con mayor frecuencia se asocia al SIDA y una de las principales causas de muerte de estos pacientes [4].

La *aspergilosis* puede presentarse de múltiples formas clínicas, principalmente asociadas al aparato respiratorio y a la piel, en personas inmunocompetentes (aspergiloma), atópica (aspergilosis broncopulmonar alérgica) o inmunosuprimidas (aspergilosis pulmonar invasora) [5]. El aspergiloma o aspergilosis intracavitaria ha aumentado su frecuencia con la administración de tuberculostáticos cada vez de mayor eficiencia [6].

El objetivo de este trabajo fue presentar los hallazgos de hongos oportunistas, aislados en muestras clínicas de pacientes internados y ambulatorios, con diagnóstico presuntivo de micosis sistémicas del Hospital Regional Ramón Madariaga y otros centros asistenciales de la ciudad de Posadas (Misiones), durante el año 2002.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras clínicas

Las muestras procesadas fueron: esputos seriados, lavado broncoalveolar (BAL), suero, sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), material de biopsia, líquido pleural, hisopado de fauces, secreción bronquial, sonda y materia fecal.

Examen directo de las muestras

Se realizaron observaciones microscópicas directas de los materiales en busca de elementos fúngicos con:

- KOH en concentraciones del 10 al 40%.
- Tinta china.
- Coloraciones (Giemsa, Gram, Kinyoun).

Cultivo de las muestras clínicas

Se realizaron cultivos en:

- Agar glucosado Sabouraud (Merck-Merck Química Argentina).
- Agar selectivo para hongos patógenos (Merck-Merck Química Argentina).
- Agar Infusión cerebro corazón (Merck-Merck Química Argentina).
- CHROMagar Candida (CHROMagar París, Francia).
- Corn meal agar-tween 80 (Britania. Bs. As. Argentina).
- Agar extracto de semilla de girasol.
- Los cultivos se incubaron a 28ºC y a 37ºC. Las placas se observaron diariamente y aquellas en las que no se detectó desarrollo fúngico se descartaron a los 30 días.

Identificación de agentes etiológicos aislados

Se realizaron de acuerdo con las características culturales y micromorfológicas de los cultivos desarrollados en medio agar glucosado Sabouraud, CHROMagar *Candida*, Corn meal agar-tween 80, agar extracto de semilla de girasol, agar infusión cerebro corazón. En hongos levaduriformes se recurrió, además, a técnicas auxiliares de identificación: auxonograma, zimograma, urea de Christensen. [7, 8, 9, 10, 11, 12].

Inmunodiagnóstico

Las técnicas serológicas empleadas fueron:

- Inmunodifusión doble, con aspergilina (*A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger*).
- Contrainmunoelectroforesis, con aspergilina (*A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger*).
- Aglutinación con partículas de látex sensibilizadas con suero de conejo anti polisacárido capsular de *Cryp-*

tococcus neoformans, para determinar presencia de antígeno capsular en muestras de LCR, suero y orina (IMMY Latex Crypto antigen detection system. EEUU) [13, 14].

Los antígenos de las tres especies de *Aspergillus* utilizados en las técnicas de precipitación en medio sólido, fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Dr. Carlos Malbrán.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sobre un total de 92 muestras clínicas de pacientes internados y ambulatorios, con diagnóstico presuntivo de micosis sistémicas, el porcentaje de micosis causadas por hongos oportunistas fue de un 13%.

Las muestras procesadas, frecuencia de muestras positivas, agentes etiológicos involucrados y factores predisponentes se detallan en la (Tabla Nº 1).

Los porcentajes de agentes etiológicos identificados sobre el total de muestras positivas se detallan en el gráfico Nº 1.

De los seis casos de criptococosis registrados, cinco fueron de muestras de LCR procedentes de pacientes con SIDA y una muestra de LCR de una paciente del sexo femenino con una severa inmunodepresión no aso-

Tabla1: tipo y número de productos biológicos procesados, frecuencia de muestras positivas, agentes etiológicos involucrados y factores predisponentes asociados.

Muestras	Procesadas	Positivas	Agentes etilógicos	Factores predisponentes
Esputo	22	2	*C. albicans*	SIDA Quimioterapia
Biopsia	1	-	-	-
Hisopado de fauces	2		-	-
Lavado broncoalveolar	3	1	*C. albicans*	Leucemia
Líquido cefalorraquídeo	8	6	*C. neoformans*	SIDA Inmunodepresión no asociada al SIDA
Líquido pleural	3	-	-	-
Sangre para lisis centrifugación	4	-	-	-
Materia fecal	1	1	*C. albicans*	SIDA
Secreción bronquial	1	-	-	-
Sonda + hemocultivo	1	1	*C. krusei*	Herido por arma blanca
Suero	46	1	*A. fumigatus*	Tubercolosis + tabaquismo
Totales	92	12		
% muestras positivas		13 %		

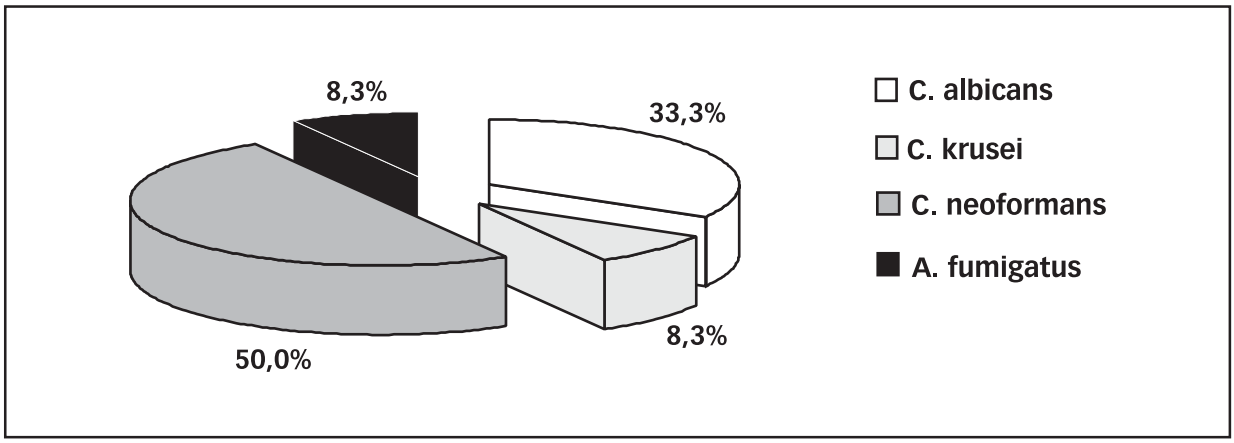

GRÁFICO 1: Porcentaje de agentes etiológicos aislados sobre el total de muestras positivas.

ciada al SIDA, que falleció sin que se determinara el origen de la misma. En tres de las seis muestras se hizo el diagnóstico de laboratorio por aislamiento del agente etiológico y en las restantes mediante la detección del antígeno capsular por aglutinación con partículas de látex. Es un método altamente sensible y específico que permite detectar aproximadamente el 99% de las criptococosis. La criptococosis continúa siendo una de las enfermedades marcadoras más graves de SIDA, y la que determina mayor tasa de mortalidad dentro de las micosis asociadas al HIV (14, 15).

Se detectaron en cinco muestras clínicas, levaduras del género *Candida*, procedentes de pacientes con factores predisponentes para el desarrollo de la enfermedad. La especie aislada con mayor frecuencia fue *C. albicans*, una aislada de lavado broncoalveolar de un paciente con leucemia con un recuento de levaduras mayor a 100.000 UFC/ml; otras dos, de muestras de esputo seriado provenientes de un paciente sometido a quimioterapia a causa de un tumor laríngeo y otra de un paciente con SIDA.

Una *C. krusei* fue recuperada de una sonda vesical y hemocultivo de un herido grave por arma blanca.

Por inmunodifusión doble se diagnosticó un caso de aspergilosis producida por *Aspergillus fumigatus*, en un paciente de 47 años de edad de sexo masculino con antecedentes de tabaquismo y tuberculosis (16, 17, 18, 19).

La incidencia mundial de las micosis sistémicas producidas por hongos oportunistas ha aumentado considerando el mismo un tributo al progreso de la ciencia médica (20). Además, se hace necesaria la identificación del agente etiológico hasta género y especie debido a la frecuente aparición de especies resistentes a los antifúngicos (21).

Es conveniente que los datos aportados por el laboratorio de Micología en el caso de micosis oportunistas, sean sumados a una correlación clínico-patológica y de ser posible a un meticuloso y exhaustivo estudio del material anatomopatológico (22). Esta situación es un desafío para nuestro grupo de investigación, ya que sigue siendo una dificultad la obtención de todos los datos clínicos, no por falta de interés del personal médico sino por el exceso de tareas, dado el incremento de pacientes en los servicios de salud pública. De más está aclarar que el otro gran inconveniente es el económico para realizar estudios complementarios y anatomopatológicos.

CONCLUSIÓN

Es de destacar que el hallazgo de un 13% de micosis sistémicas producidas por agentes oportunistas, representa un problema para la salud pública del que no se poseen datos epidemiológicos. Hay que considerar, que estas patologías se pueden presentar con características clínicas semejantes a otras más frecuentes y podrían ser tratadas erróneamente por no contar con el diagnóstico etiológico de laboratorio. Por lo tanto, es imprescindible una estrecha comunicación entre el médico y el personal del laboratorio de micología para valorar el aislamiento de especies fúngicas oportunistas, y así encaminar un correcto tratamiento. ●

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ponton, J.
Diagnóstico microbiológico de las micosis. Rev. Iberoam. Micol. 19: p. 25-29. 2002.

2. Rippon, J. W.
Micosis Generalizadas. Infecciones por hongos patógenos verdaderos e infecciones por hongos oportunistas. In: RIPPON JW (Eds). Tratado de Micología Médica. Interamericana McGraw-Hill, México. p. 402-410. 1990.

3. Torres Rodríguez, J. M.
Candidosis sistémicas. In: Torres Rodríguez J. M.; Del Palacio Hernanz, A.; Guarro Artigas, J.; Negroni Briz, R.; Periro Miguens M. (Eds). Micología Médica. Masson, Barcelona. p. 167-181. 1993.

4. Torres Rodríguez, J. M.
Criptococosis. In: Torres Rodríguez, J. M.; Del Palacio Hernanz, A; Guarro Artigas, J.; Negroni Briz, R.; Periro Miguens, M. (Eds). Micología Médica. Masson, Barcelona. p. 183-190. 1993.

5. Quindos, G.
Las micosis en el amanecer del Siglo XXI. Rev Iberoam Micol. 19: p. 1-4. 2002.

6. Negroni, P.; Negroni, R.
Aspergilosis. In: Micosis Cutáneas y Viscerales. Negroni P., Negroni R. López Libreros, Buenos Aires. p. 200-202. 1990.

7. Davel, G.; Canteros, C.; Rodero, L.
El laboratorio y el diagnóstico de las micosis sistémicas. Ed. Departamento de Micología. Instituto Nacional de Microbiología. "Dr. Carlos Malbrán". Buenos Aires, 1995.

8. López Martínez, R.; Méndez Tovar, L. J.; Hernández Hernádez, F.; Castañon Olivares, R.
Micología Médica, procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. Trillas, México. 1995.

9. Koneman, E. W.; Roberts G. D.
Micología. Práctica de laboratorio. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires. 1987.

10. Negroni, R.
Lecciones de clínica micológica. Ed. La Agenda, Argentina. 1997.
11. Negroni, R.; Guelfand, L.
Manual de procedimientos para laboratorios de Micología Médica. Ed. Federación Bioquímica de la Pcia. de Buenos Aires. 1.999.
12. Berenguer, J.
Diagnóstico de laboratorio de la criptococosis. Rev Iberoam Micol. 13: p. S82-S83. 1996.
13. Pontón, J.
Diagnóstico inmunológico de las infecciones fúngicas. Rev Iberoam. Micol. p. S8-S12. 1993.
14. Guerrero, A.; Navas E.; Redondo, E.; Hermida, J. M.; Sanchez Souza, A.
Criptococosis. Diagnóstico clínico y experiencia hospitalaria en la era del SIDA. Rev Iberoam Micol. 11: p. 77-80. 1994.
15. Negroni, R.; Arechavala, A.; Robles, A. M.; Bianchi, M.; Bava, A.; Helou, S.
Revisión clínica y evolución terapéutica de pacientes con criptococosis asociada al SIDA. Rev Iberoam Micol. 12: p. 12-15. 1995.
16. Blanco J. M.; Guedeja Marrón J.; Caballero J.; García, M. E.
Aspergilosis: mecanismos de patogenicidad implicados y aproximación al diagnóstico de laboratorio. Rev Iberoam Micol. 15: p. 10-15. 1998.
17. Marticorena, B. R.; Masih D. T.
Aspergillosis Pulmonar, nuestra experiencia. Rev. Arg. Micol. 3: p. 5-8. 1980.
18. Negroni, R.; Bonvehi, P. E.
Aspergillosis semi-invasiva su tratamiento con itraconazol por vía oral. Rev. Arg. Micol. 1: p. 33-38. 1990.
19. Acuaro, R.; Orozco, S.; Reinoso, E. H.
Tratamiento médico de la aspergillosis intracavitaria (API) no quirúrgica. Rev Arg Micol. 2: p. 28-34. 1992.
20. Trick, W. E.; Jarvis W. R., Epidemiology of nosocomial fungal infection in the 1990s. Rev Iberoam Micol. 15: p. 2-6. 1998.
21. Peman, J.; Canton, E.; Orero, A. *Et al.*
Estudio multicéntrico sobre la epidemiología de las candidemias en España. Rev Iberoam Micol. 19: p. 30-35. 2002
22. Puras Gil, A. M.; Montes Díaz, M.; Fernández Seara, P.; López Cousillas, A.
Expresión morfológica de las infecciones fúngicas graves. Participación del patólogo en el diagnóstico. Rev Iberoam Micol. 17: p. 34-40. 2000.

Recibido: 14 de Diciembre de 2003.
Aprobado: 16 de Septiembre de 2004.

Rev. Cienc. Tecnol.
Año 7 / Nº 7a / 2005 / 18-27

CUANTIFICACIÓN DE AMOXICILINA EN FORMAS FARMACÉUTICAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN EN FASE REVERSA

De Battista , G. A.[1] / Valdéz, J. R.[2]
[1]Laboratorio de la Cátedra de Calidad de los Medicamentos, Departamento de Farmacia, F.C.E.Q.y N. UNaM. Avenida Mariano Moreno 1252, gdebattista@fceqyn.unam.edu.ar.
[2]Laboratorio Químico y Toxicológico-Dirección Criminalística de la Policía de la Provincia de Misiones, Posadas, Argentina.

ABSTRACT

DETERMINATION OF AMOXICILLIN IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS BY RP-HPLC.
A method for amoxicillin assay from pharmaceutical preparations by HPLC that offers the advantage of using conventional columns and isocratic system was developed. The chromatographic conditions comprise the use of reverse-phase column C18 (250 x 4 mm x 5 m), pore diameter of 100Å, and without use of pre-column, as mobile phase of phosphates buffer and acetonitrile as modifier, in proportion (39:1) at pH 5,0 (±0,1) with a flow of movile phase of 0,7 ml min-1. The eluate was monitored at 238 nm. The method exhibited high selectivity to quantify amoxicillin in presence of related organic substances allowing its use for studies of stability and pharmaceutical quality.

KEY WORDS: amoxicillin, pharmaceutical preparations, validation, RP-HPLC.

RESUMEN

La Farmacopea Nacional Argentina en ninguna de sus ediciones codifica métodos para valorar amoxicilina en formas farmacéuticas, las Farmacopeas de reconocimiento internacional la determinan por cromatografía líquida de alta performance. Se desarrolló un método que ofrece la ventaja de utilizar columnas cromatográficas convencionales, cuyas condiciones cromatográficas comprenden el uso de una columna en fase reversa C18 (250 x 4mm x 5 mm), diámetro de poro de 100Å, y sin el uso de precolumna; se utilizó como fase móvil buffer de fosfatos y acetonitrilo como modificador, en proporción (39:1) a pH 5,0 (±0,1) con un flujo de fase móvil de 0,7ml/min y monitoreando el eluato a 230 nm. El método exhibió una excelente precisión con dispersión menor al 1%, con un porcentaje de recuperación mayor al 98% y una alta selectividad para cuantificar amoxicilina en presencia de impurezas orgánicas relacionadas permitiendo su utilización para estudios de estabilidad y calidad farmacéutica.

PALABRAS CLAVES: amoxicilina, formas farmacéuticas sólidas, validación, HPLC.

INTRODUCCIÓN

La amoxicilina (AMX) es un antibiótico de la clase de los betalactámicos, que pertenece al grupo de las penicilinas semisintéticas de espectro ampliado. Abarca, además de las bacterias grampositivas, una serie de bacilos gramnegativos, como la *Escherichia coli*, los géneros *Haemophilus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Salmonella* entre otros. [1].

Farmacológicamente actúa inhibiendo la biosíntesis de la pared bacteriana, en la fase de transpeptidación, formación de enlaces peptídicos cruzados, en microorganismos en fase de crecimiento logarítmico con el consecuente efecto bactericida por shock osmótico.

De acuerdo al listado de la Organización Mundial de la Salud (OMS) integra el grupo de los medicamentos esenciales y es ampliamente utilizada tanto en los países desarrollados como en desarrollo. La amoxicilina es un parahidroxiderivado de la ampicilina y tiene la ventaja sobre esta de tener mejor absorción a nivel del tracto digestivo y mayor actividad por vía oral. También presenta ventajas en su administración conjunta con alimentos, pues su absorción no es influida por los mismos [1].

Químicamente es el ácido 6-[D(-)-alfa-amino-p-hydroxifenilacetamido] penicilámico. Es ligeramente soluble en agua, alcohol etílico, alcohol metílico e insoluble en solventes orgánicos no polares como el cloroformo y éter. En soluciones acuosas ácidas se produce la disociación de tres protones; el del ácido carboxílico, del hidroxilo aromático y el del grupo amonio [2].

Esta droga semisintética es producida a partir de dos compuestos, a saber la 4-hidroxifenilglicina (4-HPG) y el ácido 6-amino penicilámico (6-APA). El 6-APA es producido por la ruptura química del núcleo benzilpenicillium. El camino más común de producir benzilpenicillium es por un proceso de fermentación que involucra al hongo *Penicillium chrysogenum* [3].

La humedad y la temperatura por encima de los 30º C tiene efecto adverso sobre su estabilidad. La degradación se puede producir por dimerización o por ruptura hidrolítica del anillo b-lactámico. La dimerización de la amoxicilina se produce a través del ataque nucleofílico del grupo amino de una molécula con el grupo carbonilo del anillo b-lactámico de otra. La degradación por hidrólisis se produce por ataque del ión fenóxido en una molécula de amoxicilina con el anillo b-lactámico de una segunda molécula [2].

Los productos de la mayoría de las rutas de descomposición de la AMX son el ácido penicilloico producido por hidrólisis, el cual pierde inmediatamente CO2 para formar el ácido penilloico y el dímero de la amoxicilina. Otras rutas menores de descomposición son la formación de trímeros o tetrámeros, pero menos significativa que la anterior.

Se presenta en los medicamentos en la forma de amoxicilina trihidrato en cápsulas y en suspensiones orales para reconstituir; y como amoxicilina sódica en soluciones inyectables. Su administración en dosis sub-terapéuticas tiene implicancia directa en los cuidados de la salud de la población, ya que puede contribuir al desarrollo de resistencia bacteriana a la misma.

La Farmacopea Argentina en su VI Edición no incluye la monografía de la AMX como tampoco de las formas farmacéuticas de presentación. En la nueva edición, aún no editada, la monografía de amoxicilina es un documento en revisión.

El método de cuantificación que utiliza la Farmacopea de Estados Unidos (USP) 24a edición para cuantificar amoxicilina en materia prima y en tabletas es por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). La columna que utiliza para la cuantificación de amoxicilina es una de fase reversa ligada a octadecilsilanos (ODS) de 3,9 x 30 cm, y como precolumna una de 2x2cm, también de ODS [4].

En trabajos de otros autores se validan métodos para cuantificar amoxicilina por HPLC teniendo en cuenta los productos de degradación y las sustancias relacionadas a su proceso de producción. No obstante algunos protocolos presentan desventajas, como los largos tiempos de análisis o deriva de línea de base al usar sistemas de elución de gradiente ternarios [5, 6, 7, 8, 9].

Shakoor y colaboradores en 1978 desarrollan un método por HPLC que utiliza un sistema de fase móvil isocrático, que permite cuantificar amoxicilina en presencia de sus sustancias relacionadas en cortos tiempos de análisis, resultando ventajoso para controles de calidad de medicamentos que contienen esta droga. Dicho método utiliza una columna ODS de 100 x 2 mm, y también ha sido validado para cápsulas y suspensiones [3].

El objetivo del presente trabajo es validar un método alternativo de análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa, que permita cuantificar amoxicilina en presencia de sus potenciales productos de degradación usando columnas convencionales de base de sílica ligada a octadecilsilanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

La amoxicilina sustancia de referencia (AMX-SR) para ensayos físico-químicos fue adquirida en el Instituto Nacional de Medicamento (ANMAT-INaMe). La pureza declarada sobre sustancia anhidra (HPLC) fué del 98,6%

con un DSR de 0,09%; y la humedad declarada del 13,96%.

La identidad de la sustancia de referencia ANMAT-INaMe fue determinada mediante barridos espectrales entre 190 y 450 nm, usando un espectrofotómetro de arreglo de fotodiodos modelo Hewlett Packard 8453.

Se utilizaron comprimidos que se adquirieron en el mercado para los ensayos de validación correspondiendo a productos de distintas marcas comercializadas en el país representativos de la diferente composición en excipientes para las formulaciones de estos medicamentos.

Preparación de la Muestra

De la muestra constituida por 20 unidades (comprimidos) se seleccionaron 5 aleatoriamente para ser procesadas. Se trituraron hasta grado de polvo, tomando una cantidad equivalente correspondiente a 250 mg de AMX que se llevó a un volumen de 200 mL con buffer fosfato Salino al 068 % y pH = 5,0. Se procedía a sonicar en baño de ultrasonido a 42 KHz (±6%) durante 5 minutos a temperatura ambiente, enrasando posteriormente con el mismo buffer a 250 ml. Se agitó esta solución por 30 minutos. Para su análisis se tomaba una porción, se la centrífugaba por 10 minutos a 3300 r.p.m. y filtraba (membranas de nylon) para su posterior inyección en el cromatógrafo.

Se evaluaba el comportamiento espectral de la muestra entre 200 y 400 nm a fin de determinar la presencia de máximos de absorción semejantes a los de amoxicilina.

Se procesaron muestras de tres laboratorios con distintas fecha de vencimiento, correspondiendo a comprimidos de amoxicilina de 500 mg con y sin cobertura, y polvo para reconstituir, suspensiones extemporáneas.

Selección y optimización de la Condiciones Cromatográficas

El sistema cromatográfico utilizado fue un cromatógrafo modular Hewlett Packard modelo HP 1100, integrado por un sistema de bomba cuaternaria, módulo de desgasificación por vacío, sistema autoinyector, módulo de termostastización de columna y detector de arreglo de fotodiodos y fluorescencia. Para el desarrollo experimental se utilizaron reactivos de calidad analítica y los solventes del sistema cromatográfico fueron de grado HPLC y filtrados para su utilización.

Se disponían de dos columnas cromatográficas de dimensiones y características semejantes a las utilizadas en los trabajos de Shakoor y col; y por la USP 24° Ed.

Para comparar la respuestas en la separación de AMX se utilizó una columna Hypersil ODS-5 de 125 x 4mm x 5 um, con diámetro de poro de 120 Å en condiciones similares a las propuestas por Shakoor et al [3]. Como fase móvil se utilizó una mezcla de solución reguladora de Fosfatos a pH=7,0 (±0,1) y metanol como modificador orgánico en proporción (97:3); a un caudal de 0,4 ml/min y sin control de temperatura. El volumen de AMX-SR inyectado fue de 10ml (100 mg), monitoreando la elución de los picos a 229 nm y 273 (ancho de banda de 8nm) con referencia a 400nm (ancho de banda 100nm) y complementando la evaluación de la respuesta en todo el espectro UV-Vis (200 - 600nm).

Para comparar las metodologías en condiciones isocráticas se modificó la composición de la fase móvil de las condiciones propuestas por Shakoor y col, de manera de ajustar y mejorar la elución de la AMX y poder compararla con las condiciones definidas en la USP 24° Ed.

Considerando la metodología codificada por la USP utilizando la Lichorospher RP 100 18 e, de dimensiones 250 x 4mm x 5 mm, diámetro de poro de 100Å, y sin el uso de precolumna; se utilizó como fase móvil buffer de fosfatos y acetonitrilo al 2,5% como modificador. El pH de la fase móvil en este caso fue ajustado a 5,0 (±0,1). Se usó la misma cantidad de masa para la inyección al cromatógrafo y el monitoreo de los picos fue realizado en las mismas longitudes de onda.

La selección de las condiciones cromatográficas preliminares fue determinada mediante comparación de los valores factor de capacidad, eficiencia, pureza y simetría de pico, entre las metodologías analizadas, tras inyección de la AMX-SR.

Se optimizaron las condiciones cromatográficas realizando modificaciones del flujo de la fase móvil. El diámetro de poro de membranas de filtración para la muestra y solventes que se probaron fueron de 0,22 y 0,45mm.

En la selección de la longitud de onda de detección se procedió a comparar la respuesta espectral de la AMX en los diferentes protocolos, analizándolo entre los 200 y 600nm mediante gráficos de isoabsorbancia y tridimensionales.

Validación del Método

El método optimizado fue validado evaluando la exactitud, precisión, comportamiento lineal, sensibilidad y especificidad tras la inyección de AMX SR en las condiciones propuestas en este trabajo.

La exactitud del método se determinó por adición de AMX SR a las muestras de los comprimidos de una marca líder del mercado nacional. Las experiencias se realizaron por triplicado, analizando las respuestas en mg de AMX tras la separación de las muestras con y sin agre-

gado de la sustancia de referencia. La cantidad total de masa inyectada fue seleccionada considerando la región de mayor precisión en áreas de la curva de calibración.

La precisión del método se evaluó mediante un estudio de repetibilidad de 10 inyecciones (de 10 ml) procesadas en el mismo día, usando una muestra de AMX SR de concentración de 1,75 µg/µl. La precisión del sistema fue determinada mediante inyecciones a los 8 y 16 días para la misma cantidad de muestra. A su vez se determinó el perfil de precisión para diferentes cantidades de masa inyectada en la curva de calibración.

Para definir la linealidad se prepararon por cuatriplicado cinco niveles de calibración de soluciones acuosas del estándar de AMX comprendidas del 50% al 150% del valor esperado de potencia del medicamento. Se integraron las áreas, determinando la curva de regresión por el método de los cuadrados mínimos y el grado de significación mediante análisis de varianza usando software de estadística (STAT Graphics plus 7.1).

En el estudio de la sensibilidad del método se estimaron los límites de detección operativos y de cuantificación, considerando puntos de masas en la región inferior de la curva de regresión obtenida en el ensayo de linealidad. A tal fin se seleccionaron masas comprendidas entre 0,04 µg y 1,7 µg, ensayando las muestras por duplicado.

Para definir la especificidad del pico eluído se sometió a la AMX SR a condiciones de estres para producir la degradación acelerada de la AMX en polvo y determinar la incidencia de los compuestos de degradación en la cuantificación. Los factores analizados fueron: a) Temperatura, en los niveles temperatura ambiente 25°C y 100°C (controlado en estufa de circulación); y b) Radiación no ionizante, en los niveles de exposición a la luz ultravioleta de 360 y 254 nm. También se evaluó la respuesta en condiciones de estres de soluciones de AMX, mediante la exposición en condiciones ambientales de 25°C y exposición a radiación solar en solución reguladora a pH 5,0 luego de 7 días de su preparación. Los espectros de los picos de degradación fueron comparados mediante espectrofotometría UV VIS con el de la de la AMX SR, a través de gráficos de isoabsorbancia y tridimensionales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al estudiar el comportamiento espectral de la AMX SR se obtuvo máximos de absorción a los 198, 230, 259 y 271nm (Figura N°1). El valor de 230 nm se seleccionó para la cuantificación y con una absorbancia de referencia a los 400nm, datos que concuerdan con los obtenidos del material bibliográfico.[4, 11].

Al comparar el método de Shakoor *et al.* (método 1) y método 1 modificado, con el método propuesto por la USP edic. XXIV, tabla N°1, se observa que al modificar la composición de la fase móvil se disminuye el tiempo de retención a 6,9 min.

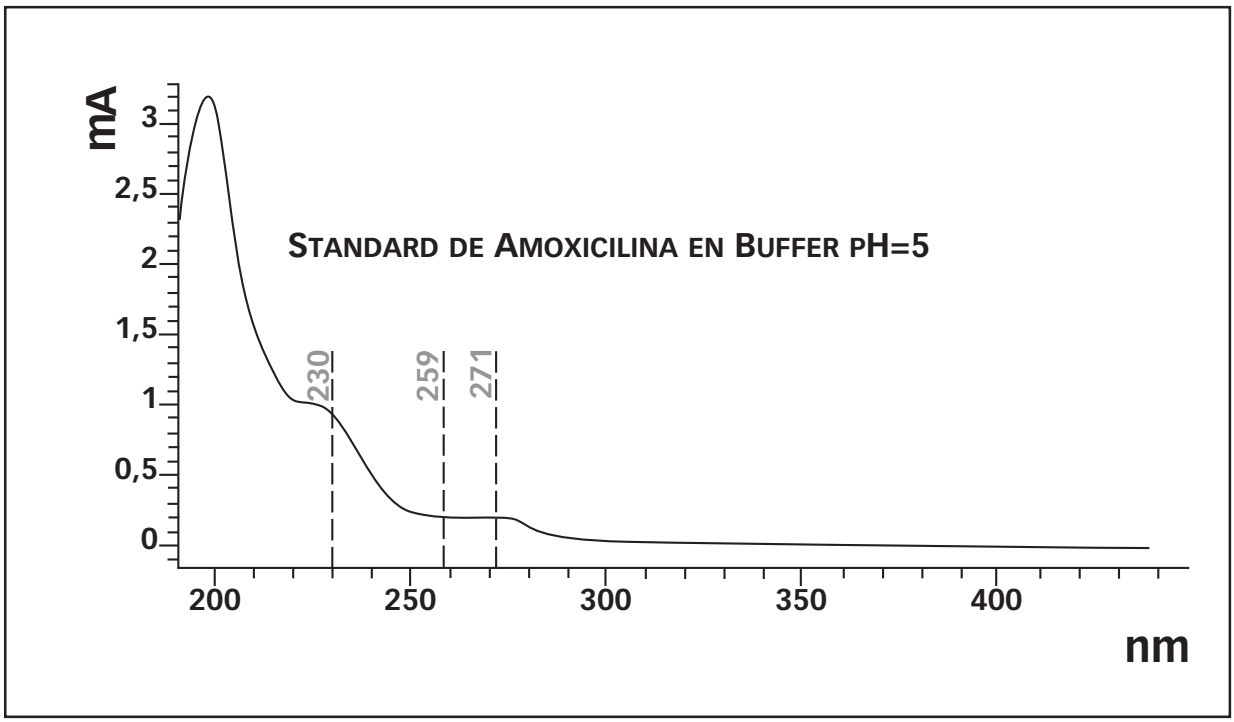

FIGURA 1: Espectro de absorción ultravioleta. Concentración 0,1%.

Si bien se logra mejorar los tiempos, no ocurre lo mismo con la difusión y la simetría de los picos, resultando inaceptable para la cuantificación de AMX en presencia de sus impurezas orgánicas relacionadas.

Con el Metodo USP (método 2), se logró eficiencia semejante a la obtenida por el método1 logrando alturas de plato téorico comprendidas entre 4500 y 6800. El factor de capacidad y la resolución obtenida con la columna de fase reversa de C18 se encuentran dentro de los valores requeridos por la USP en relación a la aptitud del sistema, ver Tabla N°2.

La filtración de las muestras y solventes tanto como el control del pH del buffer constituyen pasos importantes en la separación y en particular en el presente trabajo, uno de los puntos críticos se relaciona con el diámetro de poro de la membrana filtrante, pues se observó un aumento de la presión del sistema y hasta la obstrucción de capilares con membranas de diámetro mayores a los de 0,22 um.

El pH de la fase móvil también mostró diferencias importantes entre los diferentes métodos, así en el caso del buffer de pH=7 se observó un fuerte coleo con la consiguiente deficiencia en la asimetría de pico. Este efecto no fue observado para el buffer a pH=5. Esto podría explicarse por la coexistencia de distintas especies de amoxicilina presentes en el buffer a pH=7 mientras que a pH=5 las mismas se desplazan hacia una forma preponderante mejorando la calidad del eluido. Además a pH=5 se mejora la estabilidad del fármaco permitiendo realizar la separación en un mayor período de tiempo luego de haber preparado la muestra.

Validación Interna del Método

Exactitud

En la experiencia de recuperación se inyectó una masa de AMX entre los 10 y 25 µg, correspondiente a la zona de máxima precisión en áreas para el método propuesto en este trabajo.

Tabla 1: Comparación de métodos. Método 1: propuesto por Shakoor *et al.* Método 2: USP 24 edic.

Variables Cromatográficas	Método 1 (3% Metanol)	Método 1 (13% Metanol) modificado	Método 2	Requisitos según USP 24 Ed
Factor de Capacidad	4,22	1,01	1,14	1,1 - 2,8
Eficiencia	3131	5312	5279	May 1750
Simetría de pico	0,29	0,48	2,50	*mayor 2,5

Tabla 2: Optimización de las condiciones cromatográficas; Columna en fase reversa de C18, modificación del flujo de la fase móvil.

Variables cromatográficas	Flujo ml/min		
	0.4	0.7	1.5
Factor de capacidad	4.22	1.15	-
Eficiencia	3131	5217	4468
Resolución	16.96	3.64	0.62

Tabla 3: Experiencia de Recuperación

% Agregadode AMX-SR	% Recuperado		
50%	103,00	100,15	98,43
100%	97,32	97,26	98,30
150%	97,94	97,40	99,15
		n=9	98,77%
		S=	1,85
		DSR=	1,87

Referencias: del análisis estadístico (t experimental de 1,97; t para γ :8 y a:0,05 fué de 2,306) surge que no existe diferencias significativas entre la recuperación obtenida en las experiencias (98,77%) y el 100% de recuperación esperado.

Los resultados obtenidos para los diferentes porcentajes de estándar agregados se analizaron según el trabajo de Hoffman F- La Riche [11], como se expresan en la tabla N° 3, lográndose una recuperación superior al 98%.

Precisión

Del análisis de los resultados se obtuvo un desvío estándar relativo porcentual (DSR%) de 0,74 para el tiempo de retención y de 0,91% para una masa inyectada de AMX SR de 17,5ug. En referencia a la precisión del sistema, para una inyección de AMX SR de 17,5ug, el desvío estándar relativo para el tiempo de retención fue de 0,24 % y de 1,74 % en función de masa analizada. El perfil de precisión (Figura N° 2), muestra la dispersión porcentual del DSR para los diferentes niveles de calibración analizados.

Los resultados obtenidos indican un nivel satisfactorio de precisión del método en la región de masa inyectada de 10 y 25 ug con un mínimo de dispersión en los 16ug, correspondiente a la cantidad de AMX sugerida a inyectar en las condiciones propuestas en este trabajo. Los resultados concuerdan con los fenómenos de ensanchamiento de banda, y consecuente incremento en la dispersión de las áreas de picos eluidos para volúmenes extremos en los niveles de calibración, el máximo volumen de inyección permisible dependerá a su vez de la eficiencia de la columna, su radio y longitud, no recomendándose inyectar volúmenes que superen los 17ul en columnas convencionales. No obstante en el presente trabajo es factible hasta un incremento cercano al 120% de la masa inyectada con DSR menor a 0,2%, lo que es explicado por la menor dispersión de banda que ocurre al solubilizar los componentes en un solvente débil como

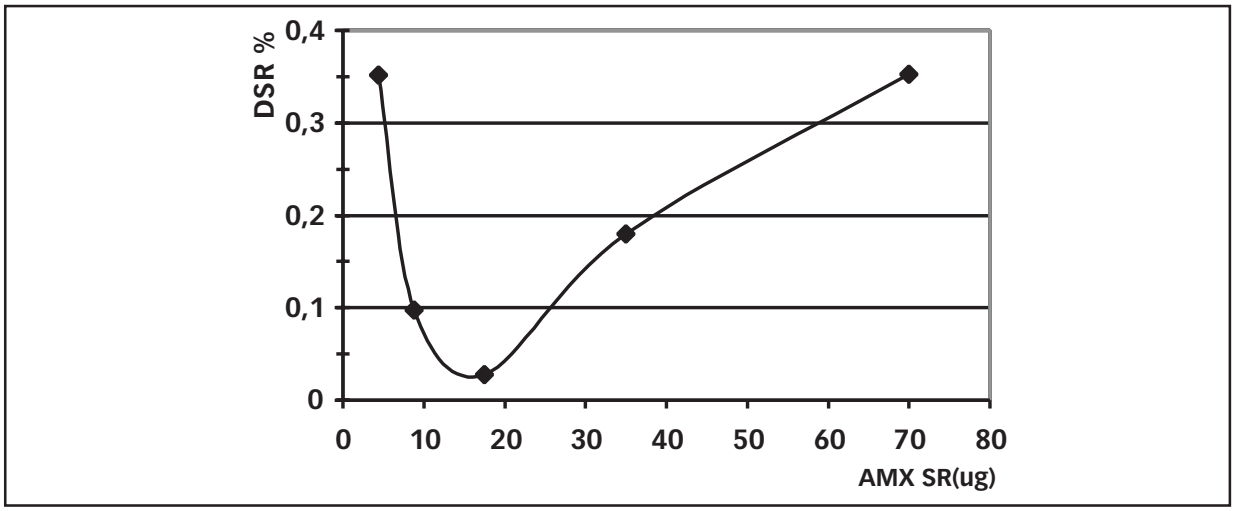

FIGURA 2: Perfil de Precisión. Referencias: se observa una máxima precisión (% DSR menor a 0,05%) para inyecciones entre 14 y 16 µg de AMX SR (n=4).

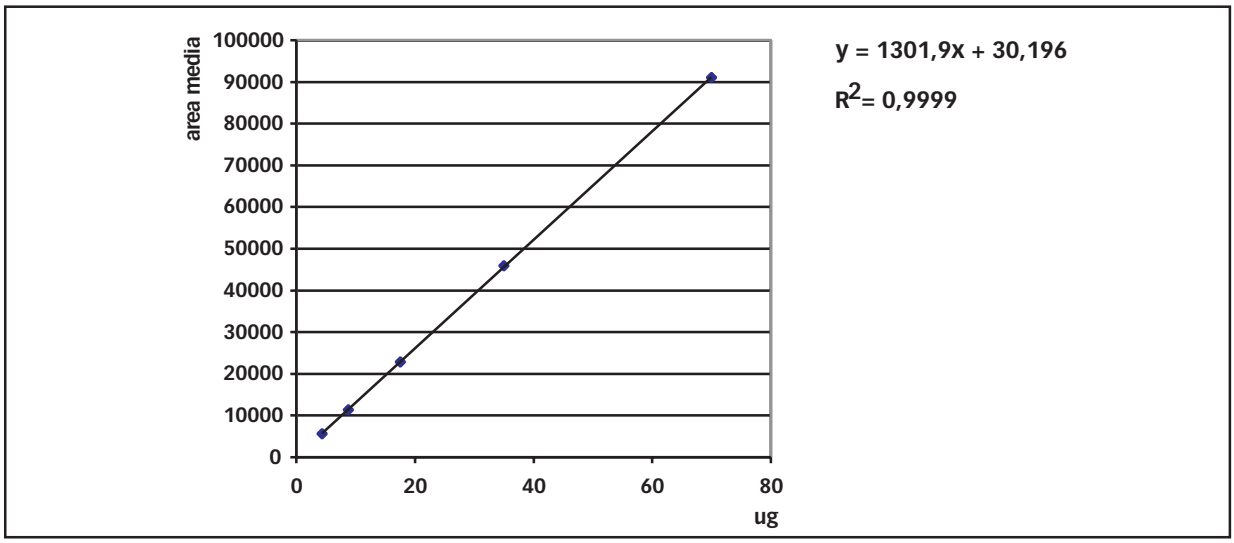

FIGURA 3: Curva estándar media de calibración de amoxicilina. Referencias: sustancia de referencia (n=4). Columna Lichorospher RP 100 18 e. Fase móvil: 0,68% buffer fosfato a pH5, modificador acetonitrilo al 2,5%. Flujo : 0,7 ml/min a 230 nm.

agua o buffer, pues determina su concentración en la cabeza de columna previa a la elución con la fase móvil [11], que, sumado a la eliminación de la imprecisión debida al operador por el uso del sistema autoinyector, resulta en una elevada repetibilidad y reproducibilidad del sistema de análisis [13].

Linealidad

Al estudiar los cinco niveles de calibración, por cuadruplicado, se observó un muy buen ajuste lineal (p=0,0001), y un r=0,9999, figura N° 3. La ecuación ajustada por el método de los mínimos cuadrados fue y=1301,900 x + 30,196, con un CV% de 0,3969% para el valor de pendiente y un DS de 64 unidades de área para la ordenada al origen.

El método mostró un excelente comportamiento lineal en el rango de masas de 4,4 a 70 mg de AMX, permitiendo cuantificar con gran precisión en las formas farmacéuticas estudiadas, ajustadas a las concentraciones definidas en la preparación de muestras.

Sensibilidad

Los límites de detección operativo y de cuantificación se estimaron considerando la curva de regresión obtenida del ensayo de linealidad y=1301,9 x + 30.196. Se tomaron tres masas comprendidas entre 0,04 mg y 1,7 mg y se ensayaron por duplicado. La respuesta a concentración cero fue ybl=32,409. Para determinar el desvío estándar a concentración cero se determinó la curva de regresión de la concentración versus el desvío

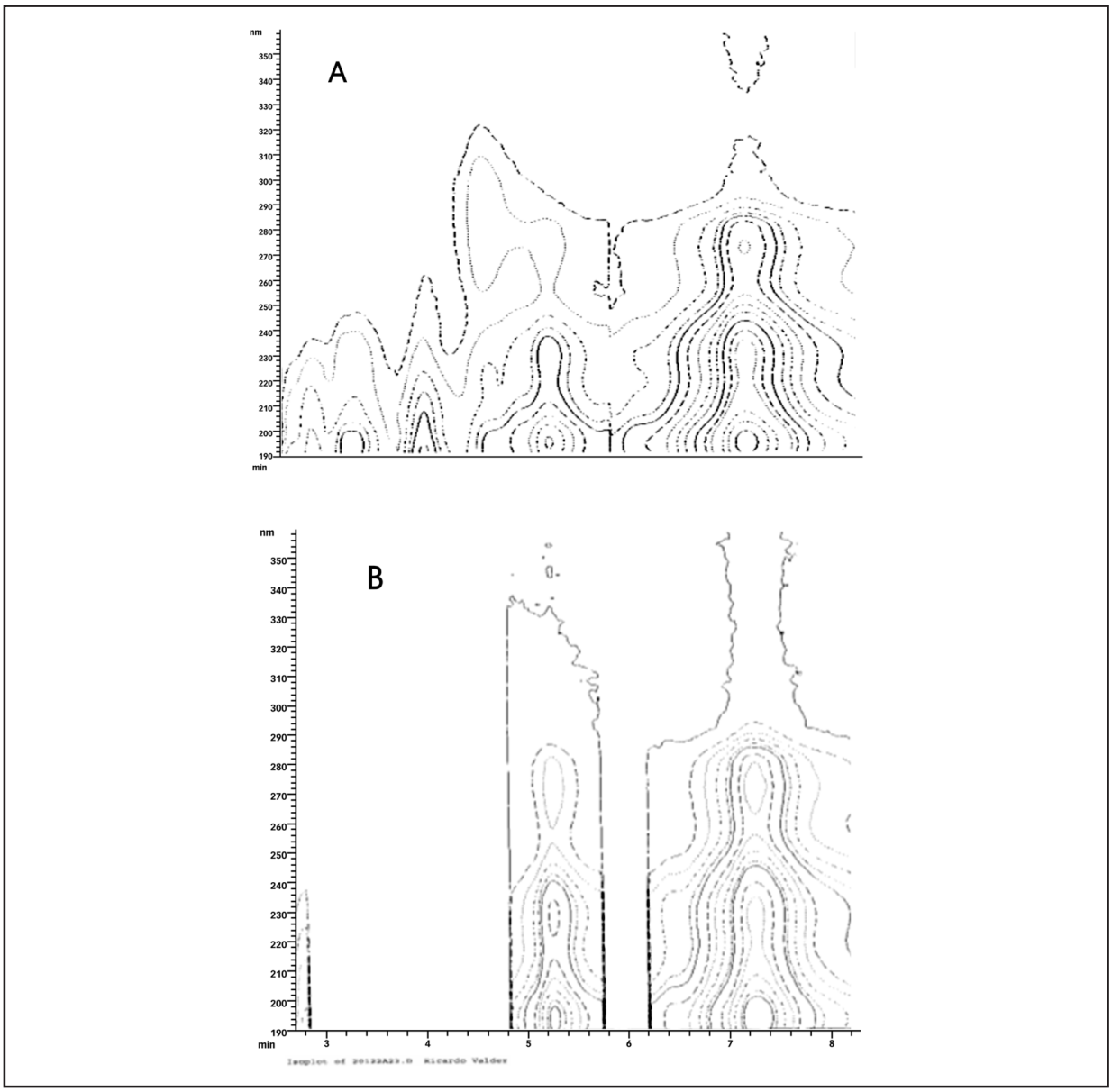

FIGURA 4: AMX SR. Referencias: topogramas de isoabsorción: A: 100°C durante 5 horas B: 3 tres días a temperatura ambiente.

estándar de cada una de las masas. La recta calculada fue y=-19,727x + 28,337. El desvío del estándar del blanco, Sb=28,337.

De los datos obtenidos se determinó el límite de detección operativo correspondiendo a un valor de 0,33 µg y el límite de cuantificación de 1 µg. La sensibilidad de calibración del método fue de 1302 unid área/ug de AMX, y la sensibilidad analítica de 251 unidades de área.

Especificidad

La AMX sometida a estres térmico mostró resultados significativos, con una mayor degradación del pico de interés, y con el consecuente aumento de los productos de degradación a elevadas temperaturas (100°C), mientras que a temperatura ambiente no se observó diferencias de alteración durante el período de tiempo estudiado y en ausencia de radiación, ver Figura N°4.

La acción deletérea de la radiación ultravioleta fue puesta de manifiesto por la aparición de numerosos picos de degradación de AMX tras su incubación a 254nm, y con una alteración ligeramente menor a 360nm después de incubar la AMX SR durante 5 horas a temperatura ambiente, ver Figura N°5.

En todos los picos se observó un comportamiento espectral semejante, con máximos a 230, 259,y 271 nm, comparables con los indicados en el protocolo de la sus-

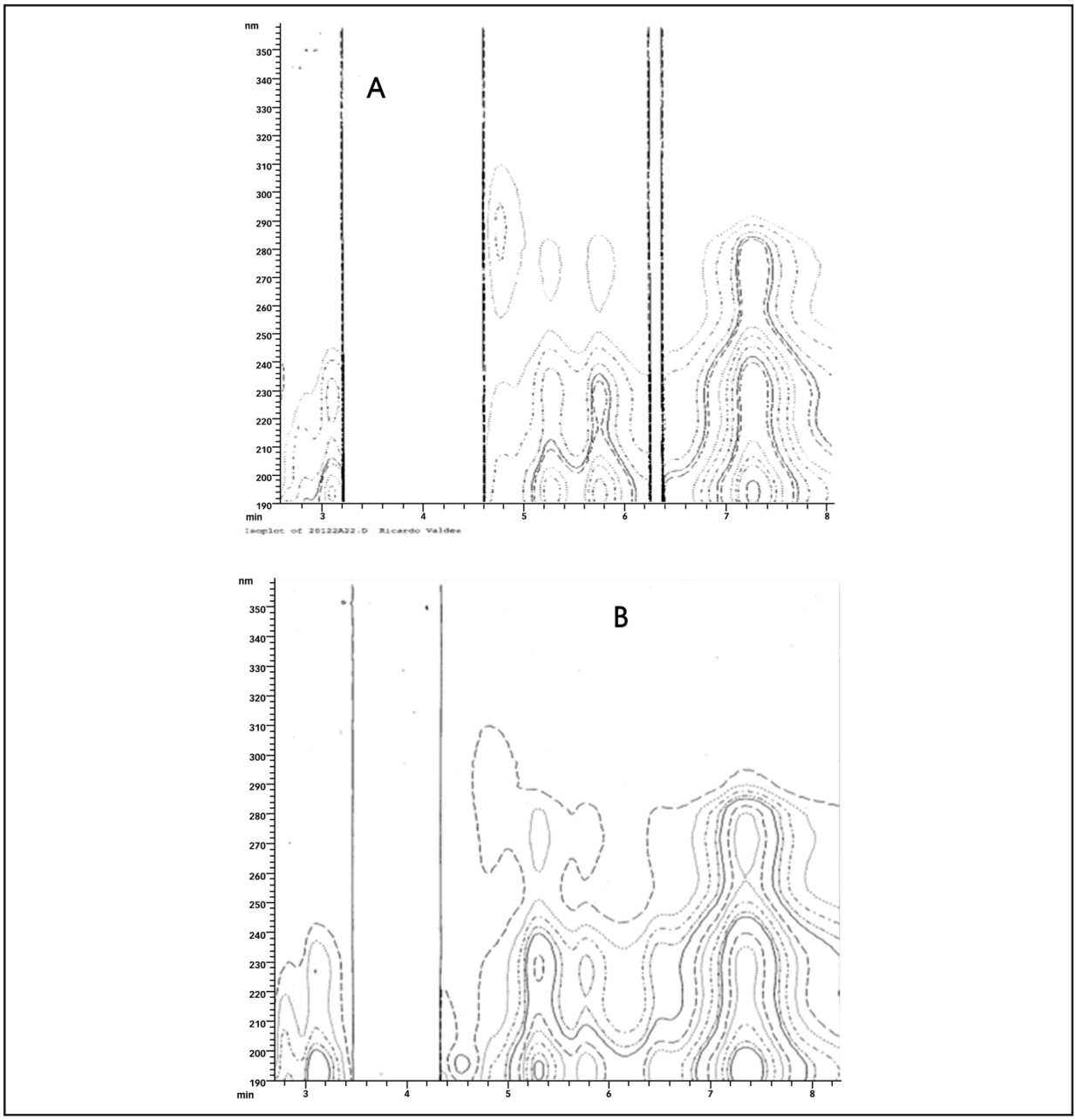

FIGURA 5: Topogramas de isoabsorción. Referencias: A: degradación a 360 nm durante 5 horas, B: degradación a 254 nm.

tancia de referencia nacional (INaMe) para la amoxicilina estándar, la semejanza espectral es explicada por las pequeñas diferencias estructurales entre los derivados químicos de la AMX, que sin embargo son eficientemente resueltos por el sistema cromatográfico. La pureza de pico se determinó usando detección PDA por comparación de los espectros eluidos. La amoxicilina estándar y la amoxicilina luego de la degradación dieron una pureza de 1.

En las condiciones del método optimizado se observó la elución de los componentes de degradación en los diferentes factores y niveles evaluados en el estudio de especificidad a valores de k' menores que la AMX, según se observa en la Figura N°6, y en concordancia con los resultados obtenidos por otros autores [3, 11].

Se procesaron muestras de diferentes laboratorios y con distintas fecha de vencimiento, cumpliendo las mismas con los requisitos de valoración. Los análisis efectuados a la primer muestra, Tabla N° 4, indican que la cantidad de amoxicilina se encuentra en el límite inferior de las especificaciones farmacopeicas, faltando 3 meses aún para la fecha de vencimiento.

CONCLUSIÓN

La nueva edición de la Farmacopea Argentina (año 2000) ha publicado su primer volumen que comprende ensayos generales. La ediciones anteriores no contemplan monografías para el control de calidad de formas farmacéuticas. Las farmacopeas de referencia internacional codifican para el control de calidad de amoxicilina en formas farmacéuticas métodos por cromatografía líquida de alta performance.

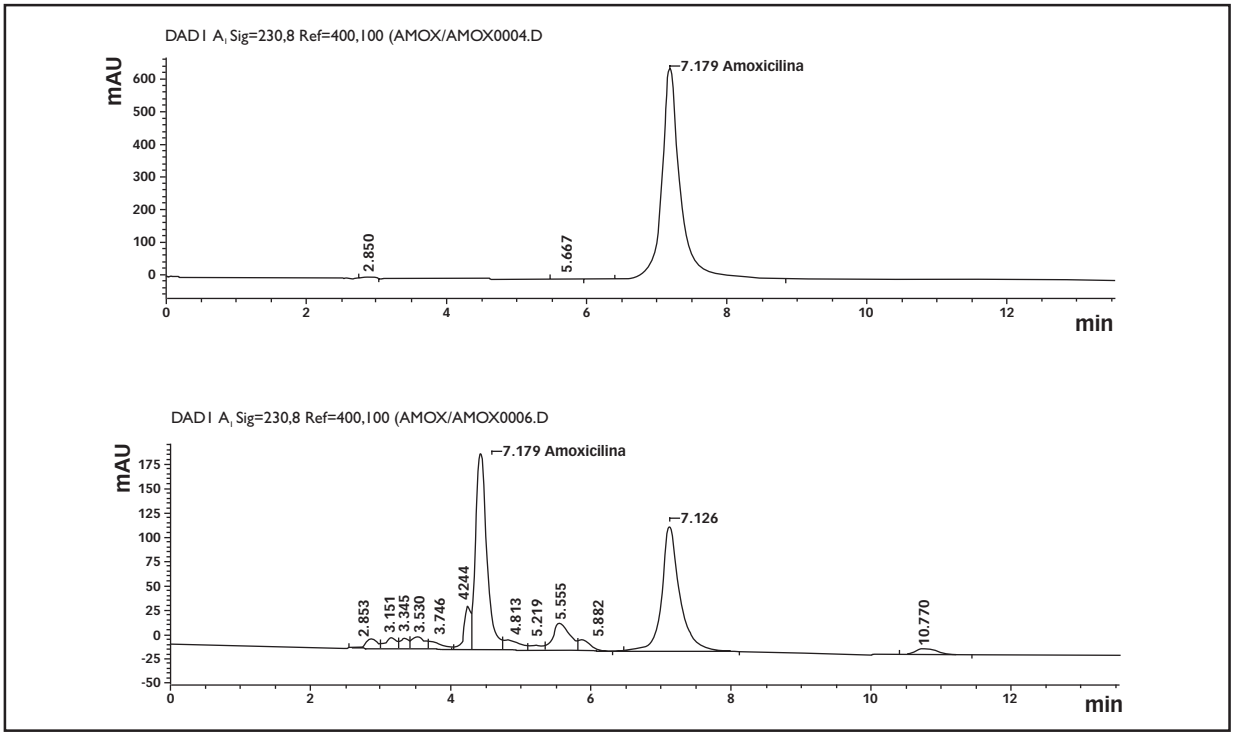

FIGURA 6: Separación de AMX - SR por el Método Optimizado. Referencias: en el cromatograma (A) se observa la separación de AMX SR Lichrosper RP100, con Buffer Fosfatos pH=5,0. En (B) la separación de AMX SR sometida a 100°C durante 300 min.

Tabla 4: Análisis de comprimidos del mercado

Producto	Fecha de análisis Fecha de vencimiento	Muestras Ensayadas	Porcentaje con respecto a la dosis declarada
Laboratorio A-comprimidos AMX 500mg	Enero 02 Abril 03	5	90.0%
Laboratorio B -comprimidos con cobertura AMX 500mg	Diciembre 02 Julio 03	5	96.0%

Referencias: Requerimientos de la Farmacopea de Estados Unidos indican que debe contener no menos del 90 y no más del 120 % de la cantidad declarada.

En nuestro país la grave situación socioeconómica hace que sea difícil contar con la totalidad de los insumos requeridos en los métodos codificados en Farmacopeas, pero la necesidad de disponer de medicamentos que cumplan los requisitos de calidad, hace imprescindible la adaptación de métodos con la consecuente validación.

La situación geográfica de la Provincia de Misiones en relación a la peculiaridad de las condiciones climáticas y considerando las características de estabilidad de la amoxicilina, hace necesario evaluar su comportamiento durante el período de postcomercialización a los efectos de evitar efectos negativos en la salud de la población ante la posibilidad de dosis subterapéuticas.

El método desarrollado permite cuantificar amoxicilina en formas farmacéuticas sólidas orales en presencia impurezas orgánicas relacionadas y ofrece la alternativa de utilizar una columna convencional, mediante condiciones isocráticas.

Agradecimiento: al Director de la Dirección Criminalísitica de la Policía de la Provincia de Misiones Comisario General Carlos Soarez, por haber permitido la utilización del equipamiento para la realización del trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Litter, M.
Farmacología Experimental y Clínica. El Ateneo. Séptima edición, p. 1460-1471, 1988.

2. Connors, K. A.
Chemical stability of pharmaceuticals. Segunda edición, p.: 182:192, 1986.

3. Shakoor, O.; Taylor, R. B.; Moody, R. R.
Analysis of amoxycillin in capsules and oral suspensions by high-performance liquid chromatography. Analyst, 120 [8), 2191-4 (English) 1995.

4. United States Pharmacopeial Convention USP XXIV: United States Pharmacopeia. 24a. ed. 2000.

5. Hossain, M. G.; Rafiquzzaman,M. D.; Hoque, M. M.
Quality and stability studies of marketed antibiotic dry syrups In Bangladesh-amoxicillin: a case study Indian Drugs, 36(8), 529-530 (English) 1999.

6. Zarapkar, S. S.; Halkar, U. P.; Rane, S. H.
Reverse phase high-performance liquid chromatographic determination of amoxycillin, probenecid and tinidazole in tablets.Indian Drugs, 36(3), 181-184, (English) 1999.

7. El-Shanawani, A. A.
HPLC analysis of clavulanic acid, amoxicillin, ticarcillin and their related substances in vials, tablets and suspensions. Acta Pol. Pharm., 55 [1), 15-19. 1998.

8. Valvo, L.; Ciranni, E.; Alimenti, R.; Alimonti, S.; Draisci, R.; Giannetti, L.; Lucentini, L.
Development of a simple liquid chromatographic method with UV and mass spectrometric detection for the separation of substances related to amoxicillin sodium. J. Chromatogr., A, 797(1 + 2), 311-316 (English) 1998.

9. Zarapkar, S. S.; Kolte, S. S.; Bhandari, N. P.
High performance liquid chromatographic determination of amoxycillin trihydrate and probenecid simultaneously from pharmaceutical preparation. Indian Drugs, 35(2), 107-109 (English) 1998.

10. *Statistical validation: Quantitative determination (General Explanations).*
Basle: Hoffman F. La Roche,1-9.1987.

11. *Protocolo de Sustancia de Referencia para Ensayos Físico- Químico. Amoxicilina.* INAME. Argentina.

12. Castillo Aguilar, B.; Gonzalez Hernández, R.
Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. Rev Cubana Farm: 30(1). 1997.

13. Quattrochi O. A; De Andrizzi, S. A.; Laba, L. F.
Introducción a la HPLC: aplicación y práctica. Buenos Aires, Artes Gráficas Farro, 39-63. 1992.

Recibido: 19 de Febrero de 2004.
Aprobado: 06 de Septiembre de 2004.

Rev. Cienc. Tecnol.
Año 7 / Nº 7a / 2005 / 28-36

ESCHERICHIA COLI ENTEROPATÓGENA: INFLUENCIA DE CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE CIPROFLOXACINA SOBRE FACTORES ASOCIADOS A LA VIRULENCIA

Quiroga M.[1] / Oviedo, P.[1] / Pegels, E.[1] / Husulak, E.[1] / Jordá G.[1] / Ortíz, A.[2] / Ruttler, M.E.[2] / Vergara, M.[1]
[1]F.C.E.Q.y N. Universidad Nacional de Misiones. Av. M. Moreno 1375. (3300). Posadas, Mnes., Argentina.
[2]Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Av. Libertador 80. (5500) Mendoza, Arg.

ABSTRACT

ENTEROPATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI*: INFLUENCE OF SUBINHIBITORY CONCENTRATIONS OF CIPROFLOXACIN ON ASSOCIATED-VIRULENCE FACTORS

It has been reported that subinhibitory concentrations (sub-MIC) of some antimicrobial agents can regulate the expression of some genes associated to virulence. The fluorquinolones affects the DNA by inhibition of DNA gyrase, altering the synthesis of proteins and their phenotypic expression, so it could be possible to reduce some factors associated to virulence.

In this study, we investigated the influence of various subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) virulence factors as motility, adherence, hemolysin production and the interaction with some mechanisms of defenses (phagocytosis) of the host.

Strains of EPEC (identified by molecular probes) with a pattern of localized adherence on HEp-2 were selected.

In our experience, a reduction on motility was observed with 1/2 MIC but not with statistical significance. Phagocytosis did not show the expected reduction on any of the studied strains.

Adherence was investigated on *bfp* gene. The detection of *bfp* was reduced on 2 of 9 of the strains with 1/2 and 1/8 MIC (22%), and on 1 of 9 with 1/4 and 1/16 MIC (11%), The reduction was not so important to allow us to speculate about the alteration of this important virulence factor involved in adherence.

When analyzing our results and applying statistic analysis we did not observe relevant differences in the hemolysin production of the studied strains.

In view of these results, where we did not observe relevant differences between the influence of sub-inhibitory concentrations and virulence factors of the studied model, it could be important to continue with this kind of studies with more strains and other antimicrobial agents, in order to optimize simple therapeutic schemes for the treatment of uncomplicated infections, reducing the adverse reactions of some drugs on the host.

KEY WORDS: *Escherichia coli*, ciprofloxacin, virulence, diarrhea.

RESUMEN

Ya ha sido reportado que concentraciones sub-inhibitorias de diversos antimicrobianos pueden modular la expresión de algunos genes asociados a la virulencia. Las fluorquinolonas afectan el ADN, por inhibición de la ADN-girasa, alterando la síntesis de proteínas y su expresión fenotípica, lo que conduciría a la reducción de algunos factores asociados a la virulencia.

En este estudio investigamos la influencia de diversas concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacina sobre factores de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógeno como la movilidad, la adherencia, la producción de hemolisinas y la interacción con algunos mecanismos de defensa del huésped (fagocitosis).
Se seleccionaron cepas de (identificadas por sondas moleculares) que presentaban un patrón de adherencia localizada en células HEp-2.
En nuestra experiencia, observamos una disminución de la movilidad con 1/2 de CIM pero sin significancia estadística. La fagocitosis no mostró la reducción esperada en ninguna de las cepas ensayadas.
La adherencia se investigó sobre el gen *bfp.* La detección de *bfp* disminuyó en 2 de 9 de las cepas con 1/2 y 1/8 de CIM (22%), y en 1 de 9 cepas con 1/4 y 1/16 de CIM (11%). La disminución no fue de magnitud tal que nos posibilite especular sobre la alteración de este importante factor de virulencia involucrado en la adhesión.
Al analizar los resultados obtenidos y aplicar tratamiento estadístico no observamos diferencias significativas en la producción de hemolisinas de las cepas ensayadas.
Dados estos resultados, donde no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre la acción de concentraciones sub-inhibitorias y los factores de virulencia en el modelo estudiado, sería importante continuar con este tipo de estudios aumentando el número de cepas y ensayando otros antimicrobianos, a fin de optimizar esquemas terapéuticos simples para el tratamiento en las infecciones no complicadas, disminuyendo las reacciones adversas que puedan algunas drogas ocasionar en el huésped.

PALABRAS CLAVES: *Escherichia coli*, ciprofloxacina, virulencia, diarrea

INTRODUCCIÓN

La virulencia bacteriana refleja la habilidad de los microorganismos, cuando estos son infectivos, para producir efectos patológicos cuando invaden un huésped susceptible.

De hecho que la severidad y la extensión de dichos efectos dependerá del inóculo bacteriano, de la habilidad para adherir y desarrollar sus mecanismos de virulencia, sean estos de invasión, toxicidad u otros y de su capacidad para enfrentar las variadas estrategias del huésped puestas en juego para la defensa frente a la agresión.

La producción de adhesinas, hemolisinas, enzimas y toxinas entre otros, son importantes factores de virulencia en la patogénesis de las enfermedades infecciosas. Dichos factores pueden tener codificación plasmídica, cromosómica o por tansposones y aún mediante bacteriófagos [1] [2].

Entre las bacterias involucradas en la diarrea aguda infantil, en el mundo en desarrollo, *Escherichia coli* enteropatógeno (ECEP) ocupa un lugar importante. Este microorganismo posee una serie de factores de virulencia codificados plasmídica y cromosómicamente que posibilitan una amplia gama de interacciones con el huésped y que actúan coordinadamente para facilitar la colonización del intestino, conduciendo a la alteración de la integridad de la membrana y otros efectos indeseables [3].

ECEP se caracteriza fenotípicamente por su habilidad de adherirse a monocapas de células en cultivo con un patrón de adherencia localizada, asociada con una fimbria llamada BFP (bundle-forming pili), codificada por el gen *bfp* [4].

Algunos antimicrobianos en concentraciones subinhibitorias son capaces de modular la expresión de genes asociados a la virulencia, interfiriendo en los procesos de interacciones entre el huésped y los microorganismos, tales como en la adherencia, la producción de toxinas, hemolisinas, el mejoramiento de la fagocitosis, etc. [5].

Entre esas interferencias están descriptas la capacidad de actuar de anti-adhesinas al afectar la síntesis y expresión de las adhesinas bacterianas, por formación de adhesinas aberrantes o pérdida de su función específica o bien eliminar plásmidos que codifican virulencia o resistencia, como es el caso de ciprofloxacina [6]. También pueden alterar el ADN cromosómico inhibiendo la transcripción del mensaje genético necesario para la expresión de los factores anteriormente mencionados. Estos mecanismos fueron investigados con concentraciones subinhibitorias del antimicrobiano, de tal modo que la bacteria, aunque viable, perdería los mecanismos que le permiten desarrollar efectos indeseables en el huésped.

La mayor parte de los trabajos se desarrollaron con *Staphylococcus* coagulasa negativa, *Pseudomonas* spp

y otras bacterias gram negativas, como *Klebsiella* spp y *Escherichia coli* [7] [8] [9] [10] [11].

El trabajo se realizó con el objeto de investigar la acción de concentraciones subinhibitorias de ciprofloxacina sobre algunos factores asociados a la virulencia, como adherencia, movilidad, hemolisinas y fagocitosis en cepas de *Escherichia coli* enteropatógeno (ECEP).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas estudiadas

Se seleccionaron cepas de ECEP (identificadas por sondas moleculares) que presentaban un patrón de adherencia localizada en células HEp-2.

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Se determinó la CIM a ciprofloxacina (CIP), (Bayer, Argentina) por el método de dilución en medio sólido según normas e interpretación de resultados del NCCLS [12].

Como controles se utilizaron cepas patrones: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 para control de timidina del medio de cultivo Mueller -Hinton.

Exposición de las cepas a concentraciones subinhibitorias (sub- CIM) de CIP

La exposición de las cepas seleccionadas de ECEP a las concentraciones subinhibitorias de CIP se realizó en medio Caldo Mueller-Hinton (CMH). Conocida la CIM a CIP que presentaban las cepas, los caldos se prepararon a fin de lograr en los mismos las concentraciones subinhibitorias de la droga. Una ansada de cada una de las cepas fue inoculada en dichos caldos, los que se incubaron a 35ºC sin agitación durante 24 hs. Las concentraciones sub-CIM utilizadas fueron las correspondientes a 1/2, 1/4, 1/8 y/o 1/16 de CIM.

Prueba de viabilidad

De cada tubo se transfirió (previa agitación) una ansada a agar tripteína soya (ATS). Las placas se incubaron a 35ºC durante 24 hs.

Ensayo de inhibición de la movilidad

Para evaluar la acción de concentraciones sub-CIM de CIP sobre la movilidad se utilizó la metodología propuesta por Braga y col. [13] y una modificación de la misma, realizada por el grupo de trabajo.

Se trabajó con siete de las cepas ECEP seleccionadas previamente. Como controles se incluyeron: *Escherichia coli* ATCC 25922 (movilidad positiva) y un aislamiento clínico de *Shigella flexneri* (movilidad negativa).

Previamente, y a fin de estimular la movilidad de las cepas a estudiar, se decidió utilizar la metodología propuesta por Craigie [14]: todas las cepas se sembraron con ansa aguja en un tubo contenido dentro de otro con medio de Craigie (caldo nutritivo 8 gr, extracto de levadura 2 gr, cloruro de sodio 5 gr, nitrato de potasio 1 gr, agar-agar 3 gr, agua destilada 1000 ml, pH 7,6). Los tubos se incubaron 24 hs a 35ºC. Luego se realizó un primer pasaje que consistió en transferir la cepa que había desarrollado a los lados externos del tubo central a un nuevo tubo con medio de Craigie. Dicho proceso se llevó a cabo durante siete días.

Una vez estimuladas las cepas de ECEP, 10 µl de un inóculo de trabajo, de cada una de las cepas, conteniendo aproximadamente 30 x 10^8 UFC/ml, seleccionado previos ensayos con suspensiones de diferentes concentraciones, fue inoculado en CMH durante toda la noche a 37ºC. Luego, 5 µl de cada una de estas suspensiones fue sembrado en el centro de una placa de Petri conteniendo 10 ml de agar movilidad (tripteína 1%, NaCl 0.5%, agar-agar 0.25% en agua destilada pH 7.1), a las que se adicionó CIP a fin de lograr en las mismas las concentraciones sub-CIM de 1/2 y 1/4 CIM. Se incluyeron siembras de cepas sin antimicrobiano.

Las placas se ubicaron en un recipiente preparado para mantener una atmósfera húmeda que se incubó a 35ºC. Las lecturas de las zonas de movilidad se realizaron cada hora con un calibre y luz oblicua.

Paralelamente, con igual lote de medio de movilidad, lote de CIP e inóculo, se procedió a realizar una ligera variación de la técnica tomada como referencia. Las modificaciones se realizaron con la finalidad de evaluar, en caso de observarse inhibición de la movilidad, si esta era reversible o irreversible, o sea, si dependía o no de la presencia de antimicrobiano en el medio.

Las cepas desarrolladas en CMH con y sin concentraciones sub-CIM de CIP, fueron lavadas tres veces con buffer PBS (pH 7,2) antes de proceder al ajuste del inóculo y la siembra en el medio de movilidad. Las suspensiones obtenidas fueron sembradas en agar movilidad sin el agregado del antimicrobiano.

Cada test fue realizado entre 6 y 9 veces para cada cepa y para cada concentración sub-CIM y control. Los valores están expresados como la media de todos los datos +/- el error estándar de las medias. Las diferencias significativas fueron calculadas usando el test de Student. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el test presentó un valor menor o igual a 0,05.

Ensayo de fagocitosis

A fin de evaluar la fagocitosis de ECEP sometidas a concentraciones sub-CIM de CIP, se trabajó de acuerdo a Braga y col. [13]. En este ensayo se incluyeron seis de las cepas ECEP seleccionadas.

Se procedió a la extracción de sangre humana sin anticoagulante. La sangre entera (2 ml) se colocó sobre portaobjetos, con bordes previamente sellados para evitar el desborde. Los portaobjetos se incubaron a 35ºC, durante 2 horas, en cámara húmeda a fin de lograr la formación de coágulo de fibrina y adhesión de polimorfonucleares (PMN). El coágulo fue retirado cuidadosamente con una aguja y los portaobjetos fueron lavados con Solución de Hanks (NaCl 8 gr, KCl 400 gr, PO_4HNa_2 60gr, PO_4H_2K 60 gr, $SO_4Mg.7H_2O$ 100 gr, Cl_2Ca 140 gr, Cl_2Mg 100 gr, Glucosa 1gr, $C0_3HNa$ 350 gr, rojo fenol 2.5 gr, H_2O bidestilada csp. 1000 ml).

Las cepas ECEP, cultivo fresco de 24 hs., en agar tripticasa soya (ATS), fueron suspendidas en solución fisiológica (SF) hasta alcanzar una turbidez equivalente al 0,5 de Mc Farland.

Las suspensiones bacterianas se enfrentaron a los PMN adheridos a los portaobjetos durante 30 min., a una temperatura de incubación de 35ºC.

Cumplido este paso, los portaobjetos fueron fijados y coloreados con Naranja de Acridina según se describe en [15]. La observación se realizó utilizando un microscopio de fluorescencia y se procedió al recuento de las bacterias fagocitadas por los PMN.

Ensayo de inhibición de la adherencia

Se trabajó con 9 de las cepas ECEP seleccionadas y con la finalidad de evaluar la acción de CIP en concentraciones sub-CIM sobre el gen *bfp*. En cada ensayo se usó un control positivo: *Escherichia coli* 2348/69 y un control negativo: *Escherichia coli* HS.

La investigación de la presencia del *bfp* se realizó por la técnica de PCR [16] utilizando un set de "primers" (cebadores) que amplifican una región de 324 pares de bases del gen *bfp*:

START 5'CAATGGTGCTTGCGCTTGCT3'
STOP 5'GCCGCTTTATCCAACCTGGT3'

Las cepas sometidas a las concentraciones sub-CIM deseadas (1/2, 1/4, 1/8 y 1/16) se lavaron 3 veces con PBS pH 7,2. Los sedimentos obtenidos se re-suspendieron en PBS pH 7,2 hasta alcanzar una concentración final equivalente al 4 de Mc Farland.

Para la preparación del templado, a 100 µl de cada uno de los sedimentos se agregó 150 ml de Tritón 1% y se los sometió a Baño María hirviente (100°C) durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido, luego de centrifugarlos a 10000 r.p.m. durante 10 minutos, fue el que se utilizó como templado.

El esquema de ciclado consistió en: un primer ciclo de desnaturalización de 2 min. a 94ºC, 30 ciclos de 1 in a 94ºC, 2 in a 56ºC y 1 in a 72ºC, y un ciclo de extensión final de 3 in a 72ºC.

Los fragmentos de amplificación fueron separados mediante corrida electroforética sobre gel de agarosa al 2% (p/v), visualizados por transiluminación UV previa coloración con bromuro de etidio y fotografiados con cámara Polaroid. En cada corrida se utilizó un marcador de peso molecular (100 bp Ladder, Promega, USA) para identificar los fragmentos de 324 pares de bases correspondientes a la región del gen *bfp* amplificado.

Ensayo de inhibición de hemolisinas

Para dicho ensayo se trabajó con tres cepas de ECEP seleccionadas por producir a-hemolisinas según metodología descripta por Gyles y col. [17], quienes proponen que si se observa la presencia de hemólisis en agar sangre oveja, preparado tanto con eritrocitos lavados como sin lavar a las 3 hs. de incubación estamos en presencia de un fenotipo alfa-hemolítico. Se incluyeron como controles *Escherichia coli* ATCC 25922 (no productora de hemolisinas) y *Escherichia coli 32511* E-Hly+ (cepa productora de hemolisinas) provista gentilmente por la Dra. Marta Rivas del ANLIS-Malbrán.

Las cepas (estrías de 24 hs.) se sembraron en CMH sin antibiótico y con concentraciones de CIP equivalentes a 1/2, 1/4 y 1/8 de la CIM de las cepas. Los caldos se incubaron en estufa sin agitación a 35ºC, durante toda la noche. Al día siguiente se realizó, de cada uno de ellos, una dilución 1/100 en CMH fresco luego de ajustar previamente el inóculo a una concentración equivalente al 2 de Mc Farland. Los nuevos cultivos se incubaron con agitación en Shaker (120 r.p.m.) a 35ºC durante 6 horas.

Finalizado este período, una alícuota se transfirió a placas de ATS con ansa calibrada a fin de comprobar si la concentración de gérmenes presentes era equivalente en todos los tubos con y sin el agregado de CIP así como la pureza de los cultivos, y se evaluó la producción de hemolisinas según la metodología propuesta por May y col. [18] trabajando con eritrocitos ovinos. La lectura se realizó en espectrofotómetro a una absorbancia de 543 nm y como blancos de reacción se utilizaron: 400 µl de agua + 400 µl de eritrocitos (100% de hemólisis) y 400 µl de SF + 400 µl de eritrocitos (0% de hemólisis).

Cada test fue realizado 6 veces para cada cepa y para cada concentración sub-CIM y control. A los resultados

de absorbancia obtenidos se les restó el valor de correspondiente al blanco de reacción (0% de hemólisis). Los valores están expresados como la media de todos los datos +/- el error estándar de las medias. Las diferencias significativas fueron calculadas usando el test de Student. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el test presentó un valor menor o igual a 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existen numerosas evidencias de la acción de algunos antimicrobianos en concentraciones sub-inhibitorias sobre diversos factores asociados a la virulencia, como la movilidad, la adherencia, la capacidad de producir toxinas y también sobre las interacciones con las defensas del huésped, como la fagocitosis [19].

Ensayo de inhibición de la movilidad

Dada la posibilidad de que al disminuir la movilidad se disminuye la diseminación de la infección, es la movilidad un importante factor asociado a la virulencia.

Son muy escasas las referencias a la alteración de la movilidad en *Escherichia coli* sometidas a concentraciones sub-inhibitorias de CIP.

La acción de algunas quinolonas sobre la movilidad fue estudiada por Braga y col. [13]. Estos autores demuestran una significativa reducción de la movilidad luego de que las cepas fueran tratadas con diluciones de CIM desde 1/2 a 1/16.

En nuestra experiencia, si bien se observa en valores absolutos (Tabla 1), una disminución en el diámetro de la zona de *"swarming"* (o movilidad) en las cepas sometidas a concentraciones sub-inhibitorias, al aplicar tratamiento estadístico dichas disminuciones no fueron significativas. A partir de las 3 horas de incubación, la disminución fue mayor con el método propuesto por Braga [13], en especial al someter las cepas a concentraciones sub-inhibitorias de ½ CIM.

En la modificación realizada por la Cátedra (Tabla 2), observamos que la disminución se produjo a partir de las 4 horas, siendo menos marcada que la ocurrida siguiendo el método de Braga [13]. También se observó que las cepas previamente sometidas a ¼ CIM al eliminar la acción del antimicrobiano, no veían afectada su capacidad de movilidad.

Ensayo de fagocitosis

Existen evidencias acerca de los cambios bioquímicos y morfológicos que ocurren en las bacterias cuando son tratadas con concentraciones sub-letales de algunos antimicrobianos, lo que conduciría a hacerlas más susceptibles a la fagocitosis y a la muerte celular.

La mayoría de las publicaciones en el tema están referidas a estos cambios en bacterias gram positivas, siendo muy escasas las referidas a *Escherichia coli*, como las de Braga y col. [13], quienes trabajando con fleroxacina y ciprofloxacina en concentraciones 1/2 de la CIM observaron un aumento de la fagocitosis en cepas capsuladas del germen, no así cuando la quinolona ensayada fue rufloxacina. Para esta quinolona, solo obtuvieron un incremento significativo de la muerte celular hasta una dilución de 1/8 de la CIM.

En nuestra experiencia, cuando investigamos la fagocitosis de las cepas de ECEP tratadas con diferentes concentraciones sub-letales de CIP (Tabla 3) ninguna de las seis cepas estudiadas mostró modificación estadísticamente significativa de la misma.

Tabla 1: Diámetro de la zona de *"swarming"* de cepas de ECEP sometidas a concentraciones sub-inhibitorias de ciprofloxacina a diferentes horas según método de Braga y col. [13]

	Control	Promedio ± DS Concentraciones sub-inhibitorias	
		¼ CIM	½ CIM
T0	4,21 ± 0,20	4,40 ± 0,27	4,03 ± 0,21
T1	4,21 ± 0,20	4,40 ±0,27	4,03 ± 0,21
T2	4,20 ± 0,22	4,38 ± 0,27	4,05 ± 0,22
T3	6,86 ± 1,84	6,33 ± 0,79	5,93 ±0,90
T4	11,76 ± 1,67	11,09 ± 2,75	8,45 ± 1,55
T5	20,63 ± 2,65	15,92 ± 3,87	11,62± 2,75
T6	27,65 ± 4,08	21,82 ± 5,64	15,14± 4,73

T: tiempo. DS: Desvío Standard. CIM: concentración inhibitoria mínima.
La lectura de los radios de la zona de *"swarming"*, a diferentes tiempos, representan la medida de la movilidad de las cepas.

Ensayo de inhibición de la adherencia

La acción de antibióticos a concentraciones sub-inhibitorias sobre fimbrias, ha sido relatada por diversos autores. Entre ellos, Abalia y col. [20] trabajando con CIP y *Escherichia coli* uropatógena, no encontraron diferencias cualitativas en las proteínas fimbriales, de las cepas sometidas a concentraciones sub-inhibitorias del antimicrobiano, aunque sí una significativa disminución en el porcentaje de fimbriación que condujo a un importante riesgo de la formación de células sin fimbrias. Estos autores le atribuyen a CIP, la capacidad, a dosis subinhibitorias, de inhibir la síntesis proteica fimbrial, mediante la represión de la transcripción de los genes de las fimbrias sin producir modificaciones cualitativas en las mismas, proceso que ocurriría *a posteriori* de la reacomodación, reparación, de la bacteria al ambiente con la droga.

Aprovechando la capacidad de afectar la pérdida de fimbrias de quinolonas, ya observada por nosotros [1], investigamos la acción de concentraciones subinhibitorias de CIP sobre la alteración, borramiento o aparición de adhesinas aberrantes en cepas de ECEP.

Cuando investigamos la acción de CIP en diferentes concentraciones sub-CIM sobre el gen *bfp,* que codifica la fimbria BFP (asociada al patrón de adherencia localizada) en las nueve cepas de ECEP seleccionadas, encontramos que en concentración de 1/2 de CIM disminuye la detección de *bfp* en un 22% (2/9), a 1/4 de CIM el 11% (1/9), a 1/8 de CIM el 22% (2/9) y a 1/16 el 11% (1/9). (Tabla 4).

Estos hallazgos nos permiten afirmar que, en las condiciones de nuestro estudio, la disminución en la detección del gen *bfp*, no fue de magnitud tal que nos posibilite especular sobre la alteración de este importante factor de virulencia involucrado en la adhesión.

Autores como Kovarik, Hoepelman y Verhoef en 1989 [21] no encontraron una significativa inhibición de la adhesión de *Escherichia coli* por CIP. Mientras que Loubeyre y col. [2] trabajando con pefloxacina refieren el requisito del magnesio para que la pefloxacina alcance el LPS (lipopolisacárido) de la bacteria y ejerza la acción de

Tabla 2: Diámetro de la zona de *"swarming"* de cepas de ECEP sometidas a concentraciones sub-inhibitorias de ciprofloxacina a diferentes horas según modificación de la Cátedra.

Tiempo	Control	Promedio ± DS Concentraciones sub-inhibitorias	
		¼ CIM	½ CIM
T0	3,84 ± 0,20	4,07 ± 0,35	4,20 ± 0,54
T1	3,84 ± 0,20	4,07 ±0,35	4,20 ± 0,54
T2	3,83 ± 0,22	4,17 ± 0,41	4,15 ± 0,54
T3	6,36 ± 1,77	6,53 ± 1,23	6,33 ± 1,32
T4	11,09 ± 1,95	12,34 ± 1,72	10,57± 1,56
T5	19,66 ± 2,84	19,49 ± 2,87	16,75± 3,87
T6	26,71 ± 4,45	27,45 ± 4,80	19,75± 5,20

T: tiempo. DS: desvío Standard. CIM: concentración inhibitoria mínima.
La lectura de los radios de la zona de "swarming" a diferentes tiempos, representan la medida de la movilidad de las cepas.

Tabla 3: Fagocitosis de polimorfonucleares de cepas ECEP sometidas a concentraciones sub-inhibitorias de ciprofloxacina

Cepa Nº	sin ATB	con ATB	
		¼ CIM	½ CIM
2	9*	8	5
3	16	19	18
4	15	6	6
5	5	3	3
7	13	14	11
8	28	13	11

* Número de bacterias cada 100 PMN observados.

antiadhesión, ya que la asociación magnesio-LPS induciría a la desorganización de la membrana externa, con la consecuente pérdida de fimbrias. Otras posibles variables, como la concentración de magnesio usada, deben ser nuevamente estudiada, dada la importancia de este catión en el mecanismo de antiadhesión de antimicrobianos en concentraciones subinhibitorias como quinolonas particularmente.

Ensayo de inhibición de hemolisinas

Nosotros hemos realizado un trabajo [22] en el que evaluamos la actividad subinhibitoria de rifampicina sobre la capacidad hemolítica de especies de *Aeromonas* spp. provenientes de niños con y sin diarrea, donde se logró la reducción de la capacidad hemolítica (posiblemente ligada a la enterotoxicidad) en por lo menos el 75% de las cepas

Si bien rifampicina no es un antibiótico usado en la terapéutica de infecciones ocasionadas por *Escherichia coli* diarrogénico, este ensayo lo tomamos como un buen modelo para aplicar a otros agentes antimicrobianos de uso en dichas infecciones, por lo que decidimos ampliar las experiencias a otros microorganismos involucrados en la diarrea bacteriana, que se aislan frecuentemente en nuestro medio, como ECEP e investigar la acción de CIP sobre las hemolisinas.

En todos los casos (cepas no sometidas y sometidas a concentraciones subinhibitorias de CIP) el número de células presentes permaneció superior a 10^5 UFC/ml (estimado por recuento).

Al analizar los resultados obtenidos y aplicar tratamiento estadístico no se observaron diferencias significativas en la producción de hemolisinas de las cepas sometidas a concentraciones subinhibitorias de CIP (Tabla 5).

Tabla 4: Detección del gen bfp en las cepas tratadas con diferentes concentraciones sub-inhibitorias de ciprofloxacina.

Cepa Nº	Concentraciones de ciprofloxacina			
	1/2 CIM	1/4 CIM	1/8 CIM	1/16 CIM
1	+	-	-	+
2	+	+	-	+
3	+	+	+	-
4	-	+	+	+
5	+	+	+	+
6	-	+	+	+
7	+	+	+	+
8	+	+	+	+
9	+	+	+	+

(+)= Ensayos en los que se detectó el gen *bfp*. (-)= Ensayos en los que no se detectó el gen *bfp*. CIM: concentración inhibitoria mínima.

Tabla 5: Acción de concentraciones sub-inhibitorias de ciprofloxacina sobre la producción de hemolisinas de cepas ECEP.

Cepa Nº:	sin antibiótico	Concentración de ciprofloxacina		
		1/2 CIM	1/4 CIM	1/8 CIM
4	0.665	0.656	0.726	0.654
5	0.687	0.656	0.695	0.646
8	0.670	0.676	0.700	0.645
Promedio	0.67	0.66	0.71	0.65
Desviación estándar	0.01	0.01	0.02	0.005
Control (+)	0.725	ND	ND	ND
100% Hemólisis	0.760	ND	ND	ND
0% Hemólisis	0.075	ND	ND	ND

CIM: concentración inhibitoria mínima. ND: no determinada.

Aunque ha sido planteado el riesgo de alcanzar concentraciones subinhibitorias en la sangre y tejidos, cual sería el de la emergencia de resistencia bacteriana, diversos estudios demostraron que la resistencia adquirida por la exposición de bacterias a concentraciones sub-letales de antimicrobianos, es reversible, al ser removido el antimicrobiano, y que dichas cepas, con resistencia adquirida por este tipo de exposición a drogas sub-letales, tienen una virulencia disminuida, manifestada por su curva de crecimiento disminuido y una reducción en la expresión de sus enzimas [21].

Si bien el soporte científico del uso de agentes antimicrobianos, en el tratamiento de enfermedades infecciosas, está dado por la certeza de la eliminación de la virulencia por la muerte del microorganismo, una vez alcanzada la mínima concentración de la droga (CIM) en el sitio de la infección, ya enumeramos numerosas evidencias que soportan el hecho de la reducción de la virulencia, sin muerte del microorganismo, mediante el uso de concentraciones inferiores a la concentración inhibitoria mínima convencional (CIM) sugiriendo que dichas concentraciones, pueden ser eficaces al alterar funciones o estructuras involucradas en el desarrollo de la misma.

Dados algunos resultados aportados en este trabajo, apostamos a esta última propuesta y creemos que se hace evidente la necesidad de continuar con estos estudios, dada la complejidad de bacterias como ECEP, que ya no constituyen un grupo homogéneo de microorganismos, desde que fueran identificadas cepas típicas y atípicas que difieren en características genéticas, serotipos y factores de virulencia [23].

El continuar con estos estudios ampliando el número de cepas y ensayando otros agentes antimicrobianos de uso en clínica, nos posibilitaría establecer su interacción, en concentraciones sub-letales, sobre algunos factores de virulencia y relacionarla con la farmacocinética de las drogas a fin de optimizar esquemas terapéuticos simples para el tratamiento en las infecciones no complicadas, disminuyendo las reacciones adversas que puedan algunas drogas ocasionar en el huésped. Aquellos agentes que interfieran o alteren estos factores, podrían tener efectos beneficiosos en la profilaxis o en la terapéutica de estas enfermedades.

La importancia de estudiar este efecto radica en la utilidad de poder abordar la enfermedad diarreica con antimicrobianos en concentraciones subinhibitorias, los que, al alterar factores de virulencia, (que son los que producen los efectos no deseados en el huésped) sin necesidad de eliminar la bacteria, (lo que sí requeriría concentraciones inhibitorias), sería beneficioso.

Este hecho podría tener implicancia en la terapéutica anti-infecciosa con otros antimicrobianos a ensayar, los que podrían ser administrados en concentraciones subinhibitorias, disminuyendo el riesgo de su uso, a dosis terapéuticas. ●

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oviedo, P.; Quiroga, M.; Pegels.; Husulak, E.; Vergara, M.
Effects of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on enterotoxigenic Escherichia coli virulence factors. J. Chemother. 12(6): 487-490. 2000.

2. Loubeyre, C.; Desnottes, J.; Moreau, N.
Influence of sub-inhibitory concentrations of antibacterial on the surface properties and adhesion of Escherichia coli. J. Antimicrob. Chemother. 31:37-45. 1993.

3. Parissi-Crivelli, A.; Parissi-Crivelli, J.; Girón, J.
Recognition of enteropathogenic Escherichia coli virulence determinants by human colostrum and serum antibodies. J. Clin. Microbiol. 38(7): 2696-2700. 2000.

4. Nataro, J.; Kaper, J.
Diarrheagenic Escherichia coli. Clin. Microbiol. Rev. 11(1):142-201.1998.

5. Ohlsen, K.; Ziebuhr, W.; Koller, K-P.; Hell, W.; Wichelhaus, T.A.; Hacker, J.
Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (hla) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 42(11):2817-2823. 1998.

6. Sonstein, S.; Burnham, J.
Effect of low concentrations of quinolone antibiotics on bacterial virulence mechanisms. Diag. Microbiol. Infect. Dis. 16(4):277-289. 1993.

7. Hacker, J.; Ott, M.
Effects of low subinhibitory concentrations of antibiotics on expression of virulence gene cluster of pathogenic Escherichia coli by using a wild-type gene fusion. Int. J. Antimicrob. Agents. 2:263-270. 1993.

8. Khardouri, N.; Wong, E.; Nguyen, H.; Jeffery-Wiseman, C.; Wallin, E.; Tewari, R.; Bodey, G.
Effect of subinhibitory concentrations of clindamycin and trospectomycin on the adherence of Staphylococcus epidermidis an in vitro model of vascular catheter colonization. J. Infect. Dis. 164:108-113. 1991.

9. Hatano, K.; Nishino, T.
Morphological alterations of Staphylococcus aureus and Streptococcus pyogenes exposed to cefdinir a new oral broad spectrum cephalosporin. Chemotherapy (Tokyo). 40:73-79. 1994.

10. Hammami, A.; Agueda, L.; Archambaud, M.; Matry, N.; Lapchine, L.; Chabanon, G.
In vitro study of the effects of oxolinic acid at subinhibitory concentration on activity of hemagglutinins and adhesion to uroepithelial cells by Escherichia coli. Pathol. Biol. (Paris). 35:545-550. 1987.

11. Reid, G.; Sharma, S.; Advikolanu, K.; Tieszer, C.; Martin, R.; Bruce, A.
Effects of ciprofloxacin, norfloxacin and ofloxacin on in vitro adhesion and survival of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother. 38(7): 1490-1495. 1994.

12. National Committee for Clinical Laboratory Standards.
Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S12. Vol 22 Nº 1 January 2002.

13. Braga, P.; Sala, M.; Dal Sasso, M.
Pharmacodynamic effects of subinhibitory concentrations of rufloxacin on bacterial virulence factors. Antimicrob. Agents Chemother. 43:1013-1019. 1999.

14. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas "Dr. Carlos Malbrán".
Diagnóstico de Escherichia coli productor de Tox Shiga. Manual de Procedimientos. 2000.

15. Koneman, E.; Stephen, D.; Dowell, V.R.; Janda, W.; Sommers, H.; Winn, W.
Diagnóstico Microbiológico. 3º edición. Editorial Panamericana.

16. Gunzburg, S.; Tornieporth, T.; Riley Lee, W.
Identification of enteropathogenic Escherichia coli for PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. J. Clin. Microbiol. 33:1375-1377. 1995.

17. Gyles, C.; Johnson, R.; Gao, A.; Ziebell, K.; Pierard, D.; Aleksic, S.; Boerlin, P.
Association of enterohemorrhagic Escherichia coli hemolysin with serotypes of shiga-like-toxin-producing Escherichia coli of human and bovine origins. Appl. Environ. Microbiol. 64(11):4134-4141. 1998.

18. May, A.; Gleason, T.; Sawyer, R.; Pruett, T.
Contribution of Escherichia coli alpha-hemolysin to bacterial virulence and to intraperitoneal alterations in peritonitis. Infect. Immun. 68(1):176-183. 2000.

19. Braga, P.C.; Dal Sasso, M.; Maci, S.; Reggio, S.; Piatti, G.
Influence of subinhibitory concentrations of brodimoprim and trimethoprim on the adhesiveness, hydrophobicity, hemoagglutination and motility of Escherichia coli. Chemotherapy. 41:50-58. 1995.

20. Abalia, I.; Rodríguez, E.; Umaran, A.; Lacalle, J.; Sarasua, A.; Huarte, M.; Bilbao, J.R.
Modulación de la fimbriación P por ciprofloxacina en Escherichia coli uropatógena. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 15:255-259. 1997.

21. Kovarik, J.M.; Hoepelman, I.M.; Verhoef, J.
Influence of fluoroquinolones on expression and function of P fimbria in uropathogenic Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 684-688. 1989.

22. Quiroga, M.; Farinati, A.; Pegels, E.; Lubaczewski, L.; Vergara, M.
Rifampicin sub-inhibitory concentrations reduce the expression of haemolysin in Aeromonas spp. Int. J. Antimicrob. Agents. 15:243-244. 2000.

23. Trabulsi, L.; Keller, R.; Tardelli Gomes, T.
Typical and atypical enteropathogenic Escherichia coli. Emerging Infect. Dis. 8:508-513. 2002.

Recibido: 08 de Octubre de 2003.
Aprobado: 19 de Mayo de 2004.

Rev. Cienc. Tecnol.
Año 7 / Nº 7a / 2005 / 37-44

HOMEOSTASIS DE LOS ELECTROLITOS SODIO Y POTASIO EN POBLACIÓN NORMOTENSA DE LA CIUDAD DE POSADAS

Maskin de Jensen, A. / López, M. / Jiménez de Aragón, S. / Mir, C. / Fernández, V.
Facultad de Cs. Ex., Qcas. y Nat. - Cátedras de Fisiología Humana y Nutrición - U.Na.M.
Mariano Moreno 1375 – (3300) Posadas – Misiones- E-mail: jensen@fceqyn.unam.edu.ar

ABSTRACT

SODIUM AND POTASSIUM ELECTROLYTES HOMEOSTASIS IN NORMOTENSIVE POPULATION OF THE POSADAS CITY

Evidence demonstrates a positive association among the high intake of sodium together with the lower intake of potassium with the high levels of blood pressure.

121 adults individuals clinically healthy were studied. They were individuals of both sexes, between 19 and 59 years old, taken at random in different areas of the city of Posadas, from whom the sodium and potassium electrolytes homeostasis was evaluated through the intake and the urinary excretion.

The population consumes 7 to 15 daily grams of salt (184 +/- 68 mMol/day), 1,1 to 2,4 grams of potassium (45 +/- 16 mMol/day) with 4.2 ± 1.4 of Na/K urinary ratio.

Our data indicate that the population studied presents a high intake of salt and low intake of potassium, with a high Na/K urinary ratio, constituting a critical environmental factor that contributes to a higher prevalence of hypertension.

This has motivated the implementation of approaches at world level which recommend to relationship between Na/K urinary ratio nearing 1, corresponding mainly to a moderate entrance of 100 mMol/day of sodium and an appropriate intake of 90 mMol/day of potassium in hypertensive patients which could be beneficial for all population.

KEY WORDS: salt, potassium Na/K urinary ratio, diet, Posadas, Argentina.

RESUMEN

Desde las últimas décadas, las evidencias demuestran una asociación positiva entre la ingesta elevada de sodio y baja en potasio con los niveles altos de presión arterial. Se estudiaron 121 individuos adultos clínicamente sanos, de ambos sexos, entre 19 y 59 años, tomados al azar en distintas zonas de la ciudad de Posadas, a los cuales se les evaluó la homeostasis de los electrolitos sodio y potasio a través de la ingesta y de la excreción urinaria. La población consume diariamente 7 a 15 gramos de sal (184 +/- 68 mMol/día) , 1,1 a 2,4 gramos de potasio (45 +/- 16 mMol/día) y posee un cociente Na/K urinario de 4.2±1.4.

Nuestros datos indican que la población estudiada presenta una ingesta habitual elevada de sal y baja de potasio, con un cociente Na/K urinario alto constituyendo un factor ambiental crítico que contribuye a una mayor prevalencia de hipertensión arterial.

Esto ha motivado la implementación, a nivel mundial, de criterios que recomiendan una relación sodio/potasio urinarios cercana a 1 que corresponde a un ingreso moderado de 100 mMol/día de sodio y una ingesta adecuada de 90 mMol/día de potasio, principalmente en pacientes hipertensos, que podría ser beneficioso para la población en general.

PALABRAS CLAVES: sal, potasio, relación Na/K urinario, dieta. Posadas, Argentina.

INTRODUCCIÓN

Evidencias epidemiológicas [1-5] demuestran una asociación positiva entre el ingreso de NaCl (cloruro de sodio contenido en los alimentos más sal de mesa) y los niveles de presión arterial [6-11]. Posteriormente, el estudio DASH [12] ha comprobado que los factores dietarios son fundamentales en la prevención y control de la presión arterial.

La respuesta individual de la presión arterial a la variación en el ingreso de cloruro de sodio difiere ampliamente en los distintos grupos "sensibles o resistentes a la sal" [13]. Las dietas bajas en sodio son particularmente efectivas en sujetos con alto riesgo como sobrepeso, hipertensión arterial borderline o ancianos [14].

Cuando la ingesta diaria de sodio en la dieta es inferior a 60 mMoles, como ocurre en poblaciones muy primitivas, la prevalencia de hipertensión es prácticamente nula. Por el contrario cuando la ingesta diaria en las poblaciones supera los 400 mMoles, la prevalencia de hipertensión es del 40% [15].

Estudios arqueológicos sobre el hombre paleolítico sugieren que este consumía una dieta hiposódica: 30 mMol Na/día (aproximadamente 2 g de sal/día) con aumento relativo del contenido de potasio: 500-700 mMol K/día (20-27 g K/día) [13, 15-17]. En cambio la dieta urbana moderna contiene 120 a 300 mMol Na/día (aproximadamente 7 a 18 g sal/día) y solo 65 mMol K/día (2,5 g K/día). Así, la especie humana enfrenta, debido a los procesos en la industrialización de los alimentos, una carga diaria de sodio mucho más elevada que aquella a la cual se adaptó hace dos millones de años.

En circunstancias normales ante un exceso de cloruro de sodio en la dieta, mecanismos renales y humorales, favorecidos por la elevada ingesta de potasio, elevan la excreción urinaria de sodio, pero en un segmento de la población este mecanismo natriurético está deteriorado y las dietas hipersódicas inducen hipertensión [13, 16, 18, 19].

Para la población adulta se recomienda que el promedio diario de consumo de sodio no exceda 100 mMol/día (aproximadamente 6 g de sal/día o 2,4 g de Na/día) [6, 7, 11, 12, 14, 20, 21] y que el de potasio sea aproximadamente 90 mMol K/día (3,5 g K/día) o una relación Na/K cercana a 1 [6, 7, 11, 22]

El objetivo de este trabajo fue conocer la homeostasis de los electrolitos sodio y potasio través de una evaluación de la ingesta y de la excreción urinaria, en población normotensa de la ciudad de Posadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población

Se estudiaron 121 individuos adultos de ambos sexos, entre 19 y 59 años, cuyas muestras fueron obtenidas en forma aleatoria en distintas zonas de la ciudad de Posadas (Figura1), los cuales dieron su consentimiento informado acerca de la confidencialidad, objetivos, métodos e importancia del estudio (declaración de Helsinki-art. 22, ANMAT-disposición 5330/97).

Se incluyeron individuos clínicamente sanos, normotensos (PAS ≤ 139 mmHg, PAD ≤ 89 mmHg) [6, 23], sin restricción dietética.

Fueron excluidos los individuos obesos (BMI ³ 30) [24, 25], mujeres embarazadas, diabéticos [26, 27] y aquellos con tratamiento farmacológico o patología asociada a la excreción de electrolitos.

La población se evaluó clínicamente a través de la realización de una historia clínica y un examen físico.

Evaluación de la Ingesta de Sal y Potasio

Se realizó un recordatorio de 24 h de la alimentación (desayuno, almuerzo, merienda y cena) haciendo hincapié en los alimentos ricos en Na y K, en su procesamiento y en el agregado de sal de mesa.

Se utilizaron tablas de composición química de los alimentos para la evaluación del consumo de dichos iones [28].

Los datos obtenidos en el recordatorio se compararon con la excreción urinaria de sodio y potasio (Nao y Ko) [29].

Metodología Empleada

La medición de la presión arterial fue realizada con esfigmomanómetro aneroide con el paciente estandarizado según las normas del JNC VI [7]

El IMC (índice de masa corporal) se calculó como peso (Kg)/talla $(m)^2$; peso: paciente de pie, con ropa interior y descalzo; se utilizó báscula de pie con resolución de 0,100 Kg; talla: paciente de pie y descalzo; se utilizó cinta métrica adosada a la pared [30].

Se realizaron las siguientes determinaciones en suero (ayuno de 8-12 h) y orina de 24 h:

- Glicemia, método enzimático (GOD/POD) con colorimetría final según Trinder (Wiener); Creatinina en suero y orina, método colorimétrico- cinético (Boheringer). Las lecturas fueron realizadas con espectrofotómetro Metrolab 1500.

- Ionograma sérico y urinario (Nao y Ko), electrodo ión selectivo (ISE), Easy Lyte Plus-Medica.

El clearance de creatinina fue calculado como [31]:

DCE= Creat. Orina x Diuresis 24 hs x 1,73/ Creat. Suero x Superficie corporal

Se procesaron 2 tipos de controles: interno: Precinorm U-Boheringer; y externo: a través de la suscripción al Programa de Control de Calidad Externo en Química Clínica de la Fac. de Farmacia y Bioquímica-U.B.A.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el uso de los programas Statgraphic 3.0 y Excel. Se realizó el análisis de varianza y el test de Student a un nivel de significación del 95 % ($p < 0.05$).

En los casos que fue necesario se evaluó la normalidad mediante la ejecución del test estadístico de Shapiro-Wilks.

La presentación gráfica de los resultados hallados se procesó mediante el programa antes mencionado [32, 33].

RESULTADOS

En la Figura 1 se observa que el muestreo fue obtenido en el microcentro, zonas aledañas y chacras periféricas de la ciudad de Posadas.

Las características basales de los participantes se presentan en la Tabla 1. La población incluye profesionales, técnicos, administrativos, estudiantes, obreros, domésticas, vendedores ambulantes, desocupados.

En la Tabla 2 se presentan los valores promedio y DS de consumo de sal, sodio sérico y excreción de sodio para dicha población, esta última discriminada por sexos.

En la Figura 2 se muestran los valores promedio y desvíos estándar de excreción de sodio y potasio para hombres, mujeres y población general, respectivamente.

El porcentaje de individuos según el consumo de sal/sodio se muestra en la Tabla 3.

En la Tabla 4 se presentan los valores promedio y DS de consumo de potasio, potasio sérico y excreción de potasio para toda la población, esta última discriminada por sexos.

En la Figura 3 se muestran los valores promedio y desvíos estándar de excreción de sodio y potasio para hombres, mujeres y población general, respectivamente.

DISCUSIÓN

La población presenta peso normal y sobrepeso grado 1, según la clasificación de la OMS como lo indican los valores promedio y DS del IMC: 24 ± 3 Kg/m^2 (Tabla 1) [24, 30].

Se excluyeron los participantes con IMC ³ 30Kg/m^2 porque la obesidad genera retención renal de sodio a través de la resistencia a la leptina, hormona antiobesidad y natriuretica [16].

Tabla 1: Características basales de los participantes (n=121).

Edad (años)	35 ± 10
Sexo (M / F)	51 / 70
IMC (Kg/m2)	24 ± 3
PAS (mmHg)	112 ± 11
PAD (mmHg)	70 ± 10
Glucemia (g/l)	0.87 ± 0.11
DCE (ml/min/SC)	101 ± 26

Tabla 2: Valores promedio y desvíos estándar de consumo de sal, sodio sérico para la población estudiada y Nao para varones, mujeres y población general.

Consumo de sal g/día	8,4 ± 3,4 (144 ± 58 mMol Na /día)
Na sérico mMol/l	140 ± 3,9
Nao población general mMol/día	184 ± 68
Nao hombres mMol/día*	200 ± 56
Nao mujeres mMol/día*	174 ± 73

* $p < 0,05$

FIGURA 1: Distribución de la población estudiada.

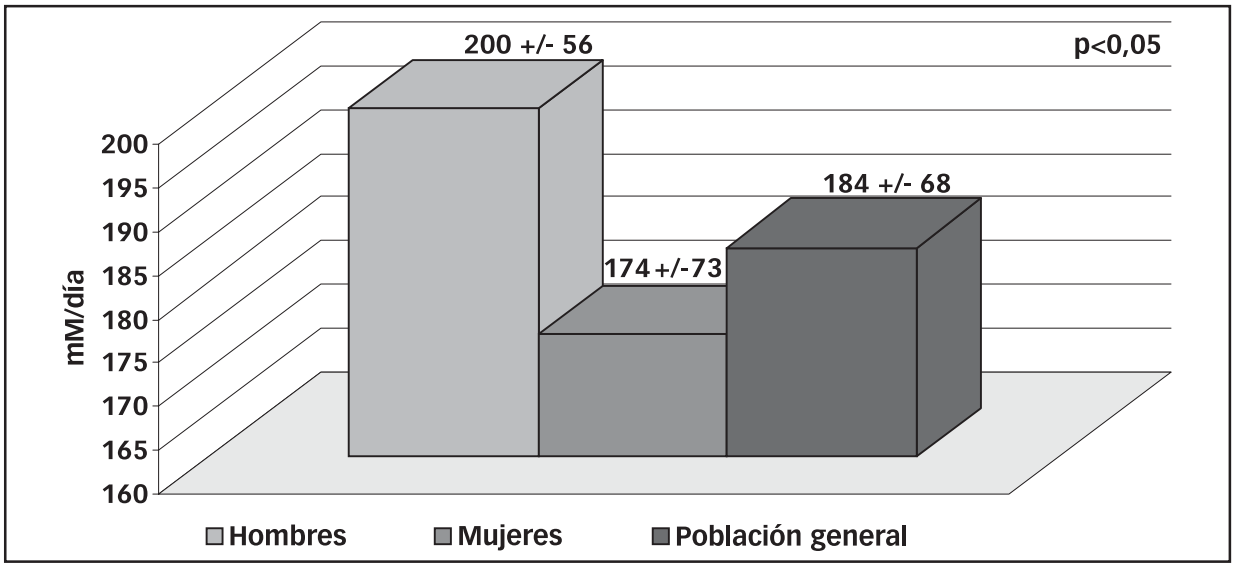

FIGURA 2: Promedio y DS de excreción de sodio para hombres, mujeres y población general.

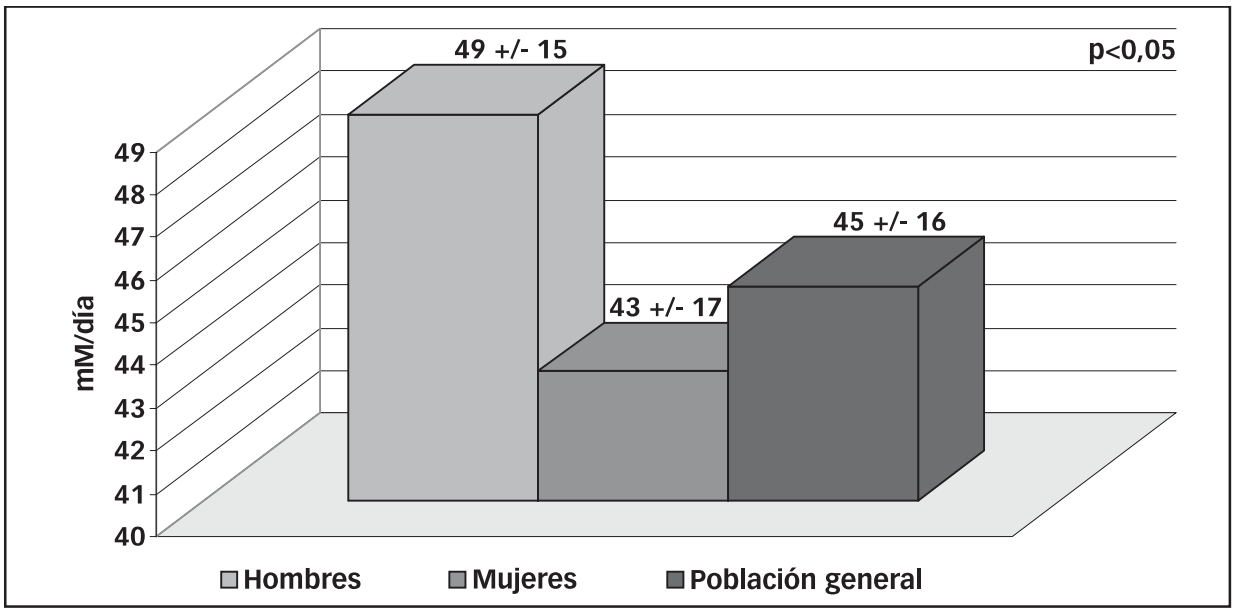

FIGURA 3: Promedio y DS de excreción de potasio para hombres, mujeres y población general.

La población en estudio, según la Tabla 2, consume diariamente una dieta que contiene aproximadamente 8,4 g de sal (144 mMol sodio/día), lo que coincide con la excreción de sodio/día: 116-252 mMol, equivalente a 7 a 15 g de sal (la excreción de sodio es usada como marcador bioquímico de la ingesta) [29].

Estos valores son comparables con los aportados por la bibliografía internacional para sociedades industrializadas con elevada ingesta de la misma [6, 7, 12, 13, 15, 21], a pesar de que la población en estudio proviene tanto del microcentro como de zonas periféricas de la ciudad de Posadas, con distintos niveles socioeconómicos.

El mayor porcentaje de individuos según su consumo (31%) se encuentra dentro del rango 151-200 mMol Na/día (aproximadamente 8,8-11,6 g de sal/día). Solo el 7% de la población cumple con el consumo recomendado ≤ 100 mMol/día, aproximadamente 6 g sal/día (Tabla 3) [7].

Gran número de estudios antropológicos y epidemiológicos [13, 15, 16, 34-36] han puesto de manifiesto una clara e irrefutable relación entre la ingesta de sal y la prevalencia de hipertensión arterial, con lo cual los valores obtenidos en el muestreo aleatorio realizado en la ciudad de Posadas nos indica que la población está sometida a uno de los factores de riesgo que predisponen al desarrollo de esta patología.

El nivel promedio del consumo de potasio es cercano a 2,3 g/día (59 mMol de potasio/día), valor aproximado a su excreción: 29-61 mMol/día o 1,1-2,4 g/día K (Tabla 4).

La excreción de potasio al igual que la de sodio es usada como marcador bioquímico de la ingesta [29].

Los datos obtenidos en nuestro estudio respecto al potasio son semejantes a los de la dieta urbana moderna, pero muy bajos con respecto a los de la dieta paleolítica tardía de nuestros antepasados debido a que el procesamiento de los alimentos agrega sodio, elimina potasio y es pobre en frutas y vegetales [13, 15, 17].

Aun así, se cubren los requerimientos mínimos establecidos por la RDA (2,0 g/día) [38] a los cuales contribuye, entre otros, el mate caliente, costumbre muy arraigada en nuestra zona, estimando que una toma de agua/día de 750 ml, acompañado de 100 g de yerba mate, aporta un valor de 100,59 ± 18,32 mg de potasio diario [39].

El ingreso de sodio y potasio discriminado por sexos (obtenido a través de su excreción) presenta diferencias significativas ($p<0,05$), Tabla 2 y 4 / Figuras 2 y 3, originado por la mayor cantidad de alimentos ingeridos por el sexo masculino.

Nuestros datos indican que la población estudiada presenta una ingesta habitual elevada de sal (mayor a sus necesidades fisiológicas) y baja de potasio, con una relación Nao/Ko de 4,2 ± 1,4.

Actualmente se recomienda un consumo moderado de 100 mMol Na/día, aproximadamente 6 g de sal/día o 2,4 g de Na/día; y una ingesta adecuada de potasio de aproximadamente 90 mMol/día (equivalente a 3,5 g de potasio/día), cerca del doble de la dieta habitual; con lo que se lograría una relación Nao/Ko cercana a 1 que podría proteger del desarrollo de hipertensión [6-8, 11, 12, 14, 16, 20-22, 40-42].

El JNC VII [7] aprueba la resolución de la American Public Health Association para que los fabricantes de alimentos y restaurantes reduzcan el suministro de sodio en los alimentos en un 50% durante la próxima década y la Food and Nutrition Board (2004) propone una ingesta adecuada de potasio (AI) de 4,7 g/día [43] lo que debería reducir los efectos adversos del ingreso de cloruro de sodio sobre la presión arterial. ●

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INTERSALT Cooperative Research Group. *INTERSALT: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion.* Br. Med. J.; 297: 319-328. 1988.

2. Elliott, P.; Stamler, J.; Nichols, R.; Dyer, A. R.; Stamler, R.; Kesteloot, H.; Marmot, M. For the INTERSALT Cooperative Research Group. *INTERSALT revisited: further analyses of 24 hour sodium excretion and blood pressure within and across populations.* Br. Med. J.; 312: 1249-1253. 1996

Tabla 3: Porcentaje de individuos según el consumo expresado como g de sal/día y mMol de sodio/día.

Consumo de sal g / día	Consumo de sodio mMol/día	% de individuos
≤ 5,9	≤ 100	7
6,0 - 8,7	101 - 150	26
8,8 - 11,6	151 - 200	31
11,7 - 14,6	201 - 250	23
14,7 - 17,5	251 - 300	7
17,6 - 20,3	301 - 350	4
> 20,3	> 350	2

Tabla 4: Valores promedio y desvíos estándar de consumo de potasio, potasio sérico para la población estudiada y Ko para varones, mujeres y población general.

Consumo de potasio g / día	2,3 ± 0,3 (59 ± 7,7 mMol / día)
K sérico mMol/l	4,2 ± 0,4
Ko población generalmMol/día	45 ± 16
Ko hombres mMol/día*	49 ± 15
Ko mujeres mMol/día*	43 ± 17

* $p < 0,05$

3. Stamler, J.
The INTERSALT Study: background, methods, findings, and implications. Am J Clin Nutr.; 65: 626-642. 1997.
4. The Trials of Hypertension Prevention Collaborative Research Group. *The effects of non-pharmacological interventions on blood pressure of persons with high normal levels: results of the Trials of Hypertension Prevention (Phase I).* JAMA 267: 1213-1220, 1992.
5. The Trials of Hypertension Prevention Collaborative Research Group. *Effects of weight loss and sodium reduction intervention on blood pressure and hypertension incidence in overweight people with high-normal blood pressure: the Trials of Hypertension Prevention, Phase II*. Arch. Intern Med. 157: 657-667. 1997.
6. *The Sixth report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure*. Arch Intern Med; 157: 2413-2446. 1997.
7. *The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure*. JAMA; 289. 2003.
8. Suter, P. M.; Sierro, C.; Vetter, W.
Nutritional factors in the control of blood pressure and hypertension. Nutr Clin Care; 5(1): 9-19. 2002.
9. Hu, G.; Qiao, Q.; Tuomilehto, J.
Non hypertensive cardiac effects of a high salt diet. Curr Hypertens Rep; 4(1): 13-17. 2002.
10. Kuller, L. H.
Less Salt Intake or More Salt Excretion: Is Hypertension Preventable? J Clin Hypertens 3(1): 32-36, 2001.
11. Krauss, R. M. *et al.*
AHA Dietary Guidelines. AHA (Circulation); 102: 2284. 2000.
12. Sacks, F. M. and col.
Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the dietary approaches to stop hypertension (dash) diet. N Engl J Med, 344(1). 2001.
13. Nolan, C. R.; Schrier, R. W.
El riñón en la hipertensión. De Trastornos renales y electrolíticos. Quinta edición. Intermédica. 9: 387-442. 1999.
14. Milan, A.; Mulatero, P.; Rabbia, F.; Veglio, F.
Salt intake and hypertension therapy. J Nephrol; 15(1): 1-6. 2002.
15. Coca, A.; de la Sierra, A.
Ingesta de cloruro sódico e hipertensión arterial. De Sal e Hipertensión Arterial. Primera edición. JIMS. 4: 41-63. 1992.
16. Kaplan, N. M.
Primary Hypertension: Pathogenesis. De Clinical Hypertension. Seventh edition. Williams & Wilkins. 3: 41-99. 1998.
17. Kurokawa, K.
Kidney, salt, and hypertension: How and why. Kidney International; 49(55): 46–51. 1996.
18. Boero, R.; Pignataro, A.; Quarello, F.
Salt intake and kidney disease. J Nephrol; 15(3): 225-229. 2002.
19. Barri, Y. M.; Wingo, C. S.
The effects of potassium depletion and supplementation on blood pressure: a clinical review. Am J Med Sci, 314(1): 37-40. 1997.
20. Kotchen, T.; McCarron, D.
Dietary Electrolytes and Blood Pressure. Circulation; 98: 613-617. 1998.
21. Appleton, J.
Dietary Changes are Key to Lowering High Blood Pressure. Healthnotes Newswire. 2001.
22. Burgess, E.; Lewanczuk, R.; Bolli, P.; Chockalingam, A.; Cutler, H.; Taylor, G.; Hamet, P.
Lifestyle modifications to prevent and control hypertension. 6 Recommendations on potassium, magnesium and calcium. CMAJ, 160(9): 35-45. 1999.
23. *1999 World Health Organization–International Society of Hypertension Guidelines for Management of Hypertension*. H Hypertension; 6: 207–210. 1999.
24. Braguinsky, J.
Epidemiología de la obesidad. De Obesidad. 2º Ed. El Ateneo; 3: 40–48. 1996.
25. Pyorala K.; De Becker G.; Graham I.; Poole-Wilson P.; Wood, D.
Prevention of coronary heart disease in clinical practice: recommendations of the Task Force of the European Society of Cardiology, European Atherosclerosis Society and European Society of Hypertension. Atherosclerosis; 110: 121-161. 1994.
26. *Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.* Diabetes Care; 20(7): 1183–1197. 1997.
27. *Report of the World Health Organization. Definition, Diagnosis, and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications*. 1999.
28. Mazzei, M. E.; Puchulu, M. del R.; Rochaiz, M. A.
CENEXA (Centro de Endocrinología Experimental Aplicada). FEIDEN (Fundación para la promoción de la Educación e Investigación en Diabetes y Enfermedades de la Nutrición) Tabla de composición química de los alimentos. 2ª Ed. 1995.

29. Dyer, A.; Elliott, P.; Chee, D.; Stamler, J.
Urinary biochemical markers of dietary intake in the INTERSALT Study. Am J Clin Nutr; 65: 1246–1253. 1997.
30. Girolami, D. H.
Obesidad. *Definición y medios diagnósticos*. De Obesidad. 2º Ed. El Ateneo 2:15-32. 1996.
31. Murray, R. L.
Creatinina. De Química Clínica. Métodos. Editorial Médica Panamericana. 2: 29-36. 1990.
32. Sokal, R. R.; Rohlf, F. J.
Biometry. WH Freeman & Co. 2ª Ed. 1981.
33. Armitage, P.; Berry, G.
Estadística para la Investigación Biomédica. Doyma, Barcelona, 1992.
34. Hajjar, I.; Kotchen, T.
Regional variations of blood pressure in the United States are associated with regional variations in dietary intakes: the NHANES-III data. J Nutr. 133(1): 211-214. 2003.
35. Falkow, B.
Salt and blood pressure-centenarian bone of contention. Lakartidningen. 100(40): 3142-3147. 2003.
36. Geleijnse, J. M.; Kok, F. J.; Grobbee, D. E.
Blood pressure response to changes in sodium and potassium intake: metaregression analysis of randomized trials. Journal of Human Hypertension. 17(7): 471-480. 2003.
37. Pao-Hwa, L. et al.
Food group sources of nutrients in the dietary patterns of the DASH-Sodium trial. Journal of the American Dietetic Association. 103(4): 488-496. 2003.
38. National Research Council: *"Recommended dietary allowances"*, 10th Edition, Report of the subcommittee on the Tenth Edition of the RDA, Food and Nutrition Board, National Academy Press. Washington DC, 1-2. 1989/1999.
39. Ramallo, L.; Smorcwski, M.; Valdéz, E.; Paredes, A. M.; Smalko, M.
Contenido nutricional del extracto acuosos de la yerba mate en tres formas diferentes de consumo. La alimentación Latinoamericana. 225. 1998.
40. Tobian, L.
Dietary sodium chloride and potassium have effects on the pathophysiology of hypertension in humans and animals. Am J Clin Nutr. 65(2): 606-611. 1997.
41. Coruzzi, P.; Brambilla, L.; Brambilla, V.; Gualerzi, M.; Rossi, M.; Parati, G.; Di Rienzo, M.; Tadonio, J.; Novarini, A.
Potassium depletion and salt sensitivity in essential hypertension. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 86(6). 2857-2862. 2001.
42. Naismith, D. J.; Braschi, A.
The effect of low-dose potassium supplementation on blood pressure in apparently healthy volunteers. Br J Nutr. 90(1): 53-60. 2003.
43. Dietary Reference Intakes for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate. National Academy Press, Food and Nutrition Board Institute of Medicine. 2004. www.nap.edu/openbonk

Recibido: 05 de Marzo de 2004.
Aprobado: 18 de Mayo de 2005.

Rev. Cienc. Tecnol.
Año 7 / Nº 7a / 2005 / 45-52

FACTORES DE RIESGO ATEROGÉNICOS: INFLUENCIA SOBRE GLÚCIDOS Y LÍPIDOS SANGUÍNEOS DE ANCIANOS DEL NORDESTE ARGENTINO

[1]Mussart, N. B. / [2]Coppo, J. A. / [3]Coppo, D. J.
[1]Prof. Adj. [2]Prof. Tit., Cátedra de Fisiología General, F.C.E.Q.yN., U.Na.M. Félix de Azara 1552, Posadas (3300), Misiones, Argentina. E-mail: normamussart@yahoo.com.ar.
[3]Aux.de Ira., Cátedra de Fisiología Humana, Facultad de Ciencias Exactas, UNNE y Médico Residente del Hospital Perrando, Resistencia, Chaco.

ABSTRACT

ATHEROGENIC RISK FACTORS INFLUENCE ON BLOOD GLUCIDID AND LIPIDIC ANALITES FROM ARGENTINA NORTHEASTERN ELDERLY PEOPLE.

Stress, tobacco and excessive consumption of alcohol are considered as modifiable atherogenic risk factors, whereas ageing is a non modifiable factor. The aim of this study was to investigate the influence of such factors on some atherogenic risk biochemical indicators in elderly people, who are exposed to higher risk due to ageing. People of both sexes from Corrientes, Chaco and Misiones provinces (60 to 92 years old, n = 320), were studied through a blocks design. Analysis of variance was performed by two-way linear model. General means obtained for plasmatic glucose (0.94±0.13 g/l), fructosamine (332±50 umol/l), total cholesterol (2.17±0.46 g/l), triglycerides (1.31±0.29 g/l) and beta lipoprotein (54.6±8.2%) were higher than those obtained on general population. On the other hand, alpha lipoprotein (34.5±5.1%) and pre-beta lipoprotein (10.9±2.3%) remained into that reference interval. Stressed older people revealed unfavorable glucidic and lipidic modifications, as glucose, fructosamine, total cholesterol, triglycerides and beta lipoprotein plasmatic concentration increases. Smoking habit was also deleterious because it caused alpha lipoprotein decrease and total cholesterol and beta and pre-beta lipoprotein increases. On the contrary, moderate alcohol quantities (wine) caused beneficial effects on cardiovascular health, promoting alpha lipoprotein increase (protection factor) and beta lipoprotein and total cholesterol decreases (risk factors). In spite of physiological and homeostatic deterioration due to ageing, results suggest that elderly people reaction to atherogenic factors is similar to the registered on general people.

KEY WORDS: atherogenic risk, plasmatic indicators, ageing, stress, tobacco, alcohol.

RESUMEN

Estrés, tabaquismo y consumo excesivo de alcohol factores modificables de riesgo aterogénico, envejecimiento en cambio no lo es. El propósito de este trabajo fue estudiar los factores que pudieran afectar parámetros bioquímicos de riesgo en población senil. Se estudiaron 320 personas sanas de ambos sexos, de 60 a 92 años, residentes en Corrientes, Chaco y Misiones. A partir de un diseño en bloques se efectuó análisis de la varianza por modelo lineal a dos vías. Los promedios generales obtenidos en plasma para los metabolitos analizados fueron mas alto que los admitidos para la población general, a excepción de las lipoproteinas alfa y pre-beta. Los ancianos con estrés revelaron desfavorables modificaciones glucídicas y lipídicas. El tabaquismo resultó nocivo, provocando disminución de ciertos metabolitos. Por el contrario, moderadas cantidades de vino fueron benéficas para la salud cardiovascular. Todo esto sugiere que los ancianos responden a los factores estudiados de manera similar en la población general.

PALABRAS CLAVES: riesgo aterogénico, indicadores plasmáticos, envejecimiento, estrés, tabaco, alcohol.

INTRODUCCIÓN

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica de la pared de los vasos sanguíneos, cuyo endotelio se lesiona por diversos factores como estrés oxidativo, hipertensión, nicotina, homocisteína e incluso agentes infecciosos (clamidias, virus), los cuales provocan la expresión de receptores para lipoproteínas de baja densidad e incrementan la adherencia de los macrófagos. La progresión de la aterosclerosis conduce al desarrollo de un placa lipídica (ésteres de colesterol), cuya ruptura provoca el síndrome coronario agudo [1].

Entre los factores que influyen sobre el riesgo aterogénico se incluye el ambiente (zona geográfica), herencia (antecedentes familiares), estilo de vida (nivel sociocultural y económico), ocupación laboral, estrés, actividad física, dieta, obesidad, hipertensión y consumo de alcohol y tabaco, los cuales condicionan cambios metabólicos (hiperlipemias, dislipoproteinemias, hiperglucemias) que se acrecientan en la tercera edad. Envejecimiento y herencia, son factores de riesgo no modificables [2, 3, 4].

El envejecimiento se define como un proceso deletéreo, progresivo, intrínseco y universal que, con el tiempo, ocurre en todo ser vivo a consecuencia de la interacción entre la genética del individuo y su medio ambiente y estilo de vida [5]. La capacidad del anciano para mantener la homeostasis disminuye ante el desgaste general, cuya magnitud determina la edad biológica del individuo, a veces muy diferente de la edad real o cronológica [6].

En la senescencia tienden a aumentar los niveles lipídicos y glucídicos, favoreciendo la aparición de ateromas. Un rol importante en la patogenia aterosclerótica lo cumple el estrés oxidativo, capaz de producir la peroxidación de lipoproteínas, trastorno que se incrementaría en la tercera edad porque las lipoproteínas se tornan más susceptibles a la oxidación [7]. Las modificaciones oxidativas de las lipoproteínas de baja densidad también estarían relacionadas al tabaquismo, hábito que promueve la aterogénesis [8]. El hábito de fumar casi duplica la probabilidad de enfermedad cardiovascular y la mortalidad total; el riesgo disminuye con la edad, pero aún persiste en la población mayor de 65 años [9]. En exceso, el alcohol provoca hipertrigliceridemia, hipertensión y daños tisulares relacionados a las enfermedades cardiovasculares, tanto cardíacas como cerebrales, aunque en cantidades moderadas podría ejercer un efecto preventivo contra la aterogénesis [10].

Entre otros indicadores plasmáticos de riesgo aterogénico, destacan analitos glucídicos inherentes al metabolismo hidrocarbonado actual (glucosa) y retrospectivo (fructosamina) y al metabolismo lipídico, incluyendo predictores de riesgo (colesterol total, triglicéridos y lipoproteínas de baja y muy baja densidad) e indicadores de protección (lipoproteínas de alta densidad) [4, 6, 11]. Generar conocimientos sobre el impacto que algunos hábitos de vida provocan sobre tales indicadores en la población senescente, más vulnerable al riesgo aterogénico, contribuiría al mejoramiento de la salud, optimizaría el diagnóstico, evitaría pasajes a la cronicidad, abarataría los costos provocados por las enfermedades y posibilitaría la adopción de medidas que eleven no solamente la cantidad sino también la calidad de vida de los ancianos.

El objetivo del trabajo fue indagar la influencia del estado de estrés y del consumo de alcohol y tabaco sobre los valores plasmáticos de glucosa, fructosamina, colesterol total, triglicéridos y lipoproteínas alfa, pre-beta y beta, en población de la tercera edad de las provincias de Corrientes, Misiones y Chaco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se empleó un diseño prospectivo de bloques aleatorizados con una sola restricción, donde cada tratamiento apareció una sola vez en cada bloque, eliminando la interacción tratamiento x bloque [12]. Las unidades experimentales fueron 320 personas *razonablemente sanas* acorde al criterio geriátrico [6], con edades entre 60 y 92 años, exentas de medicación. El grupo estuvo compuesto por 114 personas de 60-69 años, 109 personas de 70-79 años y 97 personas de 80/+ años (152 varones y 168 mujeres). Se excluyeron individuos con problemas mentales, obesos y alcohólicos. Ritmo circadiano y efecto postprandial quedaron marginados del diseño debido a que las muestras se tomaron a la misma hora, en condiciones basales y bajo ayuno previo [13]. Las unidades experimentales se particionaron alternativamente en bloques con presunción de homogeneidad, para que la variabilidad dentro del bloque sea menor a la variabilidad entre bloques, a efectos de eliminar del error experimental el efecto de los bloques [12].

Variables

Las variables dependientes (cuantitativas continuas) fueron los valores plasmáticos obtenidos en el laboratorio. Las variables independientes (categóricas, tratamientos) a considerar alternativamente acorde a la probabilidad de variabilidad fueron agrupadas en 3 categorías con dos bloques cada una (si-no). La primera fue la presunción de estrés por separación matrimonial, duelo reciente, despido laboral, depresión, insomnio, penuria económica y otros, según criterios epidemiológicos [5,

14]. La segunda fue el consumo moderado de alcohol: 1-2 vasos de vino con las comidas y ocasionalmente alguna otra bebida, versus la abstención [15, 16]. La tercera fue el hábito de fumar, donde se compararon no fumadores versus fumadores de más de 10 cigarrillos por día [17, 18] o mascadores de tabaco. Tales datos surgieron del interrogatorio efectuado al anciano y a sus familiares o convivientes.

Toma de muestras y determinaciones de laboratorio

Las muestras se tomaron en el domicilio del encuestado, en horario matutino (8-9 AM), con la persona descansada, bajo ayuno de 12 horas y en posición sentada [13]. Por venopunción radial o cefálica se obtuvo sangre, que tras coagular fue centrifugada para separar el suero. Este fue mantenido a 5ºC hasta su procesamiento, realizado dentro de las 4-5 horas post-extracción. En un espectrofotómetro Labora Mannheim 4010 digital provisto de microprocesador automático, cubeta termostatizada y módulo de succión, se efectuaron determinaciones de colesterol total CT (técnica de la oxidasa-peroxidasa, lecturas a 505 nm, reactivos Wiener), triglicéridos TG (enzimático GPO-PAP, 505 nm, reactivos Wiener), glucosa GL (oxidasa-peroxidasa, 505 nm, reactivos Wiener) y fructosamina FR (azul de nitrotetrazolio, 546 nm, reactivos Boehringer) [19, 20]. Por electroforesis semimicro realizada en aparato Chemar CHF-I-3 con soporte de gel de agarosa (Sigma), buffer de veronal sódico y coloración Fat Red 7B (Biopur), se separaron las lipoproteínas alfa (HDL), prebeta (VLDL) y beta (LDL) [21], valorándose ulteriormente por densitometría en aparato Citocon 440 automático con impresora de curvas y valores. Para todas las determinaciones se efectuó control de calidad interno (exactitud y precisión) utilizando patrones comerciales.

Procesamiento estadístico

La distribución normal fue verificada por test de Wilk-Shapiro (WS). Constatada la simetría gaussiana, se aplicaron estadísticas descriptivas paramétricas de tendencia central (media aritmética) y dispersión (desvío estándar). El análisis de la variancia (ANOVA) para cada variable dependiente se efectuó por modelo lineal a dos vías (bloque x tratamiento), previa verificación de homogeneidad de la variancia (test de Bartlett). El sexo fue introducido como covariable. Las comparaciones de medias (post-ANOVA) se efectuaron mediante el test de Tukey. El grado de asociación lineal se obtuvo a través del coeficiente de Pearson. Los cálculos se realizaron con el auxilio de un programa informático (Statistix 1996). Para todas las inferencias se estipuló un nivel de riesgo de a=5%, por debajo del cual se rechazó la hipótesis nula de igualdad [12].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se exponen las estadísticas descriptivas obtenidas para la muestra estudiada. Los valores adoptaron simetría gaussiana (WS) excepto VLDL, cuyo coeficiente resultó ligeramente inferior al valor crítico establecido. Si bien los rangos fueron amplios, los intervalos de confianza se ciñeron en torno a la media aritmética. Para la totalidad de los ancianos estudiados, los valores de GL, FR, CT, TG y LDL fueron más altos que los reportados para población general (jóvenes y adultos), o bien se posicionaron en cercanías del rango máximo del intervalo de referencia admitido [20-23], en concordancia con numerosas investigaciones que destacan la elevación de estos analitos en la tercera edad [6, 19, 24-26].

Coincidentemente, un estudio realizado en 280 ancianos de Corrientes, reveló que el 36% poseía altos valores lipídicos en sangre; el CT elevado fue un hallazgo común a todos los grupos, pero el aumento de CT no habría acompañado en forma lineal al aumento de TG [27]. Otra investigación efectuada en la misma provincia sobre población de 15 a 87 años (n=428), descubrió que

Tabla 1: Valores obtenidos para la totalidad de la población estudiada.

analito	$\bar{x}$ ± DE	IC ± 95%	rango	WS
GL (g/l)	0.94±0.13	0.93-0.96	0.79-1.32	0.978
FR (umol/l)	332±50	326-337	263- 397	0.981
CT (g/l)	2.17±0.46	2.12-2.22	1.68-3.12	0.988
TG (g/l)	1.31±0.29	1.25-1.36	0.67-2.28	0.968
HDL (%)	34.5±5.1	33.9-35.1	26.3-43.8	0.981
VLDL (%)	10.9±2.3	10.7-11.2	7.8-13.6	0.937
LDL (%)	54.6±8.2	53.7-55.4	41.8-69.5	0.977

$\bar{x}$: media aritmética. DE: desvío estándar. IC: intervalo de confianza. WS: test de normalidad distributiva de Wilk-Shapiro (valor crítico: 0.947), GL: glucosa. FR: fructosamina, CT: colesterol total, TG: triglicéridos, HDL: lipoproteína de alta densidad. VLDL: lipoproteína de muy baja densidad. LDL: lipoproteína de baja densidad.

el 75% de la muestra poseía valores compatibles con dislipemias, severas en el 48% de los casos [28].

La Tabla 2 muestra la tendencia central, el grado de dispersión y la significación estadística obtenida en cada bloque, en personas con presunción de estrés versus libres del síndrome, consumo moderado de alcohol versus abstención e individuos fumadores versus no fumadores.

En la población geriátrica estudiada, los individuos presuntamente afectados por estrés revelaron poseer más elevados niveles plasmáticos de GL (significativos). Se obtuvo un alto grado de asociación lineal entre los aumentos de GL y CT (+0.88, $p = 0.0005$). En los ancianos cuyas declaraciones permitieron conjeturar ausencia de estrés, se hallaron ligeramente más altas las tasas del factor de protección aterogénica (HDL).

A partir de la información brindada por el encuestado y/o sus familiares directos, surgió que las principales causas del estado de estrés se constreñían a conflictos familiares y/o laborales, ruptura matrimonial, duelo reciente, enfermedad terminal de un allegado, exceso de trabajo, despidos, penuria económica, falta de adaptación a las limitaciones propias de la senescencia y otras. Los signos detectados consistieron en irritabilidad, agresividad, insomnio, depresión, indiferencia, aislamiento, cansancio y desavenencias conyugales. Se afirma que el envejecimiento entrañaría profundas modificaciones psíquicas que no sobrevienen espontáneamente sino que son el resultado de acontecimientos adversos como la jubilación o el duelo. Resultarían afectadas las esferas cognoscitiva (pensamientos, capacidades) y psicoafectiva (personalidad, afecto) [5, 14].

Estímulos psíquicos (angustia, depresión, interacciones sociales conflictivas) estimularían la médula adrenal y las catecolaminas liberadas provocarían elevaciones plasmáticas de GL [22, 23], CT y LDL, con disminución de HDL [29], tal como ocurriera en el presente estudio. A su vez, catecolaminas y corticosteroides causarían taquicardia y débito cardíaco, conduciendo a la hipertensión arterial, con riesgo de episodios isquémicos, trombosis coronaria e infarto de miocardio [30].

El hallazgo de elevaciones significativas de GL y no significativas de TG, así como la disminución de HDL en sujetos bajo presunción de estrés aquí estudiados, coincide con resultados obtenidos en otras investigaciones. El estrés se asociaría a la intolerancia a la GL, reducción del colesterol de HDL y aumento de TG y presión arterial, predisponiendo a enfermedades cardiovasculares [31]. En ancianos diabéticos sedentarios, el estrés se asoció significativamente con mayor hiperglucemia [32]. También habría concordancia respecto a los aumentos de CT, aunque estos fueron de escasa magnitud en los ancianos aquí encuestados. El estrés crónico aumentaría los niveles sanguíneos de CT [33]. El tratamiento de los factores psico-fisiológicos vinculados al estrés haría disminuir el riesgo aterogénico: reducciones del 10% del CT plasmático harían decrecer en un 20% o más los eventos coronarios [34].

El aumento de FR constatado en los ancianos estresados del presente estudio, si bien escaso, coincide con la elevación de esta glicoproteína verificada en personas padeciendo estrés por exceso de trabajo; FR es considerada como un como parámetro útil para valorar retrospectivamente las hiperglucemias del estrés metabólico [35]. El nivel de fructosamina debe ser incluido como indicador de riesgo aterogénico, especialmente al examinar pacientes ancianos [4]. El estrés laboral sería más intenso y riesgoso que el originado por razones familiares [33]; la tensión ocupacional provocaría hipertensión arterial, con aumento de TG y escasos cambios de CT y HDL [36]. Según algunas teorías, abandonar el hábito de fumar reduciría el estrés al suprimir los periódicos efectos adversos de la depleción nicotínica [37].

Tabla 2: Valores según presunción de estrés y consumo de alcohol y tabaco ($\bar{x} \pm$ DE).

analito	estrés		alcohol		tabaco	
	si	no	si	no	si	no
GL (g/l)	1.02 [a] ± 0.15	0.88 [b] ± 0.11	0.95 [a] ± 0.13	0.92 [a] ± 0.11	0.97 [a] ± 0.10	0.94 [a] ± 0.12
FR (umol/l)	338 [a] ± 52	330 [a] ± 48	335 [a] ± 48	331 [a] ± 46	334 [a] ± 47	328 [a] ± 43
CT (g/l)	2.19 [a] ± 0.48	2.15 [a] ± 0.44	2.14 [a] ± 0.43	2.18 [a] ± 0.44	2.31 [a] ± 0.48	2.10 [b] ± 0.41
TG (g/l)	1.33 [a] ± 0.31	1.28 [a] ± 0.27	1.29 [a] ± 0.27	1.33 [a] ± 0.29	1.34 [a] ± 0.30	1.30 [a] ± 0.28
HDL (%)	33.2 [a] ± 5.0	35.7 [a] ± 5.3	39.8 [a] ± 5.2	33.7 [b] ± 4.8	29.1 [a] ± 4.6	36.9 [b] ± 5.1
VLDL (%)	10.6 [a] ± 2.1	11.4 [a] ± 2.3	9.6 [a] ± 1.8	10.9 [a] ± 2.1	13.2 [a] ± 2.3	9.3 [b] ± 2.0
LDL (%)	56.2 [a] ± 8.3	52.9 [a] ± 7.9	50.6 [a] ± 7.7	55.4 [b] ± 8.3	57.7 [a] ± 7.6	53.8 [b] ± 7.9

$\bar{x}$: media aritmética. DE: desvío estándar. GL: glucosa. FR: fructosamina. CT: colesterol total. TG: triglicéridos. HDL: lipoproteína de alta densidad. VLDL: lipoproteína de muy baja densidad. LDL: lipoproteína de baja densidad. En cada fila, letras distintas indican diferencias significativas (test de Tukey, $p < 0.05$).

El hábito de consumir alcohol en forma moderada produjo, con relación a su abstención, niveles significativamente más altos de HDL (protección) y más bajos de LDL (riesgo aterogénico); el resto de los analitos registró variaciones no significativas. Coincidentemente, en población general otros investigadores también habrían hallado elevaciones de HDL en consumidores moderados de alcohol [15]. El colesterol ligado a HDL (C-HDL) aumentaría ante ingestas moderadas de alcohol, a razón de aproximadamente 1 mg/dl por cada 30 ml diarios de alcohol ingerido, más rápidamente en mujeres que en varones y con mayor magnitud entre aquellos que inicialmente poseían altas tasas de HDL. El incremento de C-HDL provocado por el alcohol no se acompañaría del habitual descenso de TG, por el contrario: el alcohol sería uno de los pocos responsables de la elevación conjunta de C-HDL y TG [9, 38]. En discordancia, en los ancianos del presente estudio no se constataron elevaciones de TG relacionadas a la ingestión de alcohol, quizás porque el consumo fue exiguo, o bien porque la respuesta metabólica podría ser distinta en la senescencia.

En efecto, la elevación de TG sería una respuesta al consumo *excesivo* de alcohol; su ingestión en cantidades moderadas podría ser causa de hipertrigliceridemia solamente en individuos susceptibles, como diabéticos y dislipidémicos. El mecanismo es aun oscuro, pero parecería estar relacionado con la excesiva biosíntesis de quilomcrones y VLDL [9]. Según otros, el alcohol competiría con los ácidos grasos para su oxidación hepática, aumentando la síntesis de TG y VLDL en dicho órgano; la subsecuente elevación de la concentración plasmática de TG sería coadyuvada por la inhibición de la actividad de lipasas hepáticas [39, 40].

Como en el presente estudio, pequeñas dosis diarias de alcohol habrían sido capaces de disminuir los niveles de LDL y aumentar los de HDL sin modificar significativamente las VLDL. Simultáneamente habrían disminuido tanto la concentración de plaquetas como la agregación plaquetaria, elevándose los niveles de prostaglandina E, de comprobada acción vasodilatadora coronaria [16]. Ante el consumo moderado de vino tinto se incrementarían los antioxidantes (óxido nítrico) y disminuiría la adhesión endotelial [15]. En los ancianos aquí considerados, las variaciones de CT fueron no significativas. En personas jóvenes de la ciudad de Corrientes tampoco se registraron correlaciones significativas entre CT y consumo moderado de alcohol [41]. Estudios poblacionales habrían sugerido la existencia de un polémico aumento de la longevidad asociado a la ingesta moderada de alcohol [9].

El consumo moderado de alcohol se concibe como la ingestión de hasta aproximadamente 60 g/día, equivalente a unos 400 ml de vino, 1 litro de cerveza, o 120 ml de bebidas destiladas [16]. Para otros, el consumo máximo de alcohol útil para elevar el factor de protección (HDL) sería de hasta 30 g/día [40]. Una encuesta realizada en la ciudad de Posadas sobre 498 personas mayores de 20 años reveló que el promedio diario de alcohol consumido era de aproximadamente 5 g/día [18]. La gran mayoría de los ancianos aquí estudiados declararon consumir casi exclusivamente vino, en cantidades escasas a moderadas. El vino tinto contendría antioxidantes (flavonoides) que protegerían a las LDL de las modificaciones oxidativas [40]. Componentes del vino tinto evitarían tanto la oxidación de LDL como de HDL [42]. Tal reducción de la peroxidación lipoproteica sería particularmente favorable en sujetos fumadores y ocurriría aún con vino desalcoholizado [43].

Los polifenoles del vino, citrina y catequina, y también flavonoides como taninos, quercetina y antocianina, ejercerían acciones antioxidantes. Un estilbeno (resveratrol) reduciría la viscosidad de la sangre. Además, el vino aportaría silicio, cuya carencia ha sido relacionada con la aterogénesis, y algo de ácido acetilsalicílico. El cromo contenido en vinos y cervezas ejercería efectos benéficos sobre el metabolismo de lípidos y glúcidos (insulina) [16]. Dicho oligoelemento sería necesario para integrar el factor de tolerancia a la glucosa, compuesto que adyuva a mantener la normoglucemia [23]. Recientemente se ha postulado que el vino *blanco* poseería similares propiedades preventivas que el vino tinto [44]. El vino sería más eficaz que la *cerveza* para prevenir el riesgo aterogénico [16]. Se ha propuesto que el mecanismo de acción de los polifenoles del vino tinto consistiría en suprimir la síntesis hepática de VLDL y minimizar la producción de quilomicrones intestinales [39].

Los gerontes fumadores registraron valores más altos de CT (significativos) y TG (no significativo). Hubo alta correlación entre CT y TG (+0.90, $p = 0.0001$). Sin significación estadística, los fumadores revelaron valores plasmáticos más elevados de GL y FR, pero el hábito de fumar se tradujo en significativos aumentos de VLDL y LDL (riesgo), con menores porcentajes de HDL (menor protección). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en investigaciones donde se habría demostrado el aumento de CT, C-LDL, TG y GL en personas fumadoras. Habitualmente estos individuos revelarían anomalías en la curva de tolerancia a la glucosa y en la relación lactato/piruvato, debido a la menor cesión de oxígeno a los tejidos. La lipólisis y la movilización de grasas estarían estimuladas, con el consecuente aumento sostenido de TG y ácidos grasos libres. La magnitud de la alteración estaría estrechamente relacionada a la cantidad de cigarrillos

diarios fumados, así como al grado de inhalación del humo [45].

Epidemiológicamente, el riesgo de enfermedad arterial coronaria se evidenciaría cuando se fuman más de 20 cigarrillos por día [46]. Existiría una relación dosis-respuesta entre el aumento del número de cigarrillos consumidos y la magnitud de los cambios lipoproteicos [9]. Estudios realizados en una muestra poblacional de nuestro país habrían revelado que el tabaquismo fue capaz de discriminar significativamente entre pacientes con enfermedad coronaria versus controles sanos [47].

Otros investigadores habrían encontrado similares cambios de la bioquímica clínica en sujetos fumadores. Pobladores del sur argentino adictos al tabaco habrían revelado significativas disminuciones de C-HDL, más pronunciadas en varones que en mujeres. Los gerontes no permanecerían ajenos a este cambio, que se acompañaría del aumento de TG [48]. Los niveles de TG y CT se incrementarían a través del gradiente [no-fumadores ® ex-fumadores ® fumadores], a la inversa de lo que sucedería con la tasa C-HDL [49]. El riesgo de enfermedad coronaria disminuiría luego de abandonar el hábito de fumar, a diferencia de lo que ocurriría con el cáncer y el riesgo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica, para los cuales el riesgo persistiría [9]. Los riesgos cardiovasculares involucrados en el tabaquismo abarcarían tanto a fumadores como mascadores de tabaco. La concentración de C-HDL resultaría mayor en los no adictos, a la par que CT, TG, C-LDL y C-VLDL resultarían mayores en fumadores [9] y mascadores de tabaco, entre los cuales las diferencias serían no significativas [50].

En conclusión, surge que el estrés se reveló capaz de alterar desfavorablemente los indicadores plasmáticos de riesgo aterogénico en los gerontes estudiados, elevando los niveles de GL, FR, CT, TG y LDL. El hábito de fumar correlacionó con bajos valores de HDL y altos niveles de CT, LDL y VLDL, revelando que los ancianos fumadores no escaparon de las consecuencias deletéreas del tabaquismo descritas para jóvenes y adultos. Por el contrario, el alcohol en cantidades moderadas reveló efectos benéficos para la salud cardiovascular, al promover la elevación de HDL (factor de protección) y la disminución de LDL y CT (factores de riesgo), tal como sucede en la población general.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo brindado por SGCYT-UNNE (Proyecto PI-217-01-06), CIDET-UNAM (Proyecto 160203-Q/070) y Wiener Lab (Rosario, Argentina). ●

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kher, N.; Marsh, J. D.
Pathobiology of atherosclerosis. A brief review. Semin. Thromb. Hemost. 6: 665-672, 2004.

2. Coniglio, R. I.
Aterosclerosis coronaria: criterios para la detección de individuos de alto riesgo. Acta Bioquím. Clín. Latinoam. 28: 519-527, 1994.

3. Costa Gil, J. E.; De Marco, B.; Pérez, N. D.; Bernardi, R.; Reggiani, L.; Ennis, I.; Dignani, G.; Pizarro, M. B.; Selvaggio, G.; Rivas, M.; Véndola, A. M.
Lípidos séricos y evaluación antropométrica en adultos jóvenes. Acta Bioquím. Clín. Latinoam. 32: 233-245, 1998.

4. Browner, W. S.; Pressman, A. R.; Lui, L.Y.; Cummins, S. R.
Association between serum fructosamine and mortality in elderly women. Am. J. Epidemiol. 149: 471-475, 1999.

5. Gómez Rinessi, J. F.
Envejecimiento. Rev. Posgrado Fac. Med. UNNE (Corrientes) 100: 21-23, 2000.

6. Dybkaer, R.; Lauritzen, M.; Krakauer, R.
Relative reference values for clinical chemical and haematological quantities in healthy elderly people. Acta Med. Scand. 209: 1-9, 1981.

7. Napoli, C.; Abete, P.; Corso, G.; Malorni, A.; Postiglione, A.; Ambrosio, G.; Cacciatore, F.; Rengo, F.; Palumbo, G.
Increased low-density lipoprotein peroxidation in elderly men. Coron. Artery Dis. 8: 129-136, 1997.

8. Scheffler, E.; Wiest, E.; Woehrle, J.; Otto, I.; Schulz, I.; Huber, L.; Ziegler, R.; Dresel, H. A.
Smoking influences the atherogenic potential of low-density lipoprotein. Clin. Investig. 70: 263-268, 1992.

9. Oberman, A.; Kreisberg, R. A.; Henkin, Y.
Fundamentos y Manejo de los Trastornos Lipídicos, Ed. Waverly, Buenos Aires, 1993.

10. Stason, W. B.; Neff, R. K.; Miettinen, O. S.; Jick, H.
Alcohol comsumption and nonfatal myocardial infarction. Am. J. Epidemiol. 104: 603-608, 1976.

11. Hoschoian, J. C.; Catz, S. D.; Borruel, M. A.; Wikinski, R. L.; Rodríguez, M. P.
Evaluation of the blood components considered as risk predictors in coronary heart disease. Medicina (Buenos Aires) 53: 13-20, 1993.

12. Steel, R. G.; Torrie, J. H.
Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach, 2nd ed., McGraw-Hill, New York, 1992.

13. Solberg, H. E.; Petitclerc, C.
Preparación de individuos y obtención de especímenes para la producción de valores de referencia. Acta Bioquím. Clín. Latinoam. 22: 603-611, 1988.
14. van Hooren, S. A.; Valentijn, S. A.; Bosma, H.; Ponds, R. W.; van Boxtel, M. P.; Jolles, J.
Relation between health status and cognitive functioning: a 6-year follow-up of the maastricht aging study. J. Gerontol. B Psychol. Sci. Soc. 60: 57-60, 2005.
15. de Lorimier, A. A.
Alcohol, wine, and health. Am. J. Surg. 180: 357-361, 2000.
16. Sousa Neto, J. A.; Moreira Consenza, R.
Efeitos do vinho no sistema cardiovascular. Rév. Méd. Minas Gerais 4: 27-32, 1994.
17. Wynder, E. L.; Graham, E. A.
El consumo de tabaco como posible factor etiológico en el carcinoma broncogénico. En: *El Desafío de la Epidemiología* (Buck C.; Llopis, A.; Nájera, E.; Terris, M. Ed.), OPS-OMS, Washington, 1994.
18. Castillo, S.; Coniglio, R.I.; Doubnia, N. I.; López Torres, J.; Guersanik, C. S.; Meza, G.; Claramaunt, R.; Durando, A.; Ramírez, R.; Silva, E.; D´Alonzo, T.
Factores de riesgo para la aterosclerosis coronaria en el noreste argentino. Dieta alimentaria y nivel de instrucción. Rev. Ciencia y Tecnología (Posadas, Argentina) 3: 6-16, 2000.
19. Ióvine, E.; Selva, A. A.
El Laboratorio en la Clínica, 2º ed., Panamericana, Buenos Aires, 1981.
20. Actis Dato, S. M.; Rebolledo, O. R.
Avances en la valoración de fructosamina: ventajas de un nuevo equipo diagnóstico aplicado a estudios poblacionales. Acta Bioquím. Clín. Latinoam. 25: 391-402, 1991.
21. Kalinov, A.
El Laboratorio y su Interpretación Semiológica, 2º ed., López Libreros, Buenos Aires, 1984.
22. Ganong, W. F.
Fisiología Médica, 15º ed., Manual Moderno, México, 1996.
23. Coppo, J. A.
Fisiología Comparada del Medio Interno, Ed. Dunken, Buenos Aires, 2001.
24. Ash, K. O.; Clark, S. J.; Sandberg, L. B.; Hunter, E.; Woodward, S. C.
The influences of sample distribution and age on reference intervals from adult males. Am. J. Clin. Pathol. 79: 574-581, 1983.
25. Miller, S.
Valoración geriátrica en el laboratorio. En: *Química Clínica* (Anderson, S. Ed.), Interamericana, México, 1995.
26. Coppo, J. A.; Mussart, N. B.
Evolución de valores de la bioquímica clínica conforme avanza el envejecimiento. Prensa Méd. Arg. 87: 717-727, 2000.
27. Acosta, A. H.; Rodríguez, M. A.; Dikowiec, J. J.; Rojas, R.
Prevalencia de hiperlipidemia en una población seleccionada de pacientes ancianos y su relación con algunas variables. Actas de Ciencia y Técnica UNNE (Corrientes, Argentina) 3: 9-12, 1999.
28. Graziano, F. I.; Azula, J. E.; Vallejos, J. A.; Rasmussen, R.; Brizuela, M.; Fernández, C.
Encuesta de prevalencia de factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares en la Provincia de Corrientes. Anales de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE, Trabajo N° 60. Resistencia (Argentina), 2000.
29. Ronsein, G. E.; Dutra, R. L.; Silva, E. L.; Martinello, F.; Hermes, E. M.; Balen, G.
Influência do estresse nos níveis sanguíneos de lipídios, ácido ascórbico, zinco e outros parâmetros bioquímicos. Acta Bioquím. Clín. Latinoam. 38: 39-46, 2004.
30. Krants, D. S.; Sheps, D. S.; Carney, R. M.; Natelson, B. M.
Effects of mental stress in patients with coronary artery disease. J. Am. Med. Assn. 283: 1800-1802, 2000.
31. Lee, P. N.
Lung cancer and type of cigarette smoked. Inhal. Toxicol. 13: 951-976, 2001.
32. Aikens, K. S.; Aikens, J. E.; Wallander, J. L.; Hunt, S.
Daily activity level buffers stress-glycemia associations in older sedentary NIDDM patients. J. Behav. Med. 20: 379-390, 1997.
33. Iglesias, R.; Bianco, M.; Scoppa, G.; Agnelli, H.; Gauna, H.
Efecto del estrés crónico sobre los factores de riesgo del infarto de miocardio. Anales II Reunión Latinoamericana de Fisiología, p. 7, Río Cuarto (Argentina), 1996.
34. Guize, L.; Iliou, M. C.; Henry, P.; Lavergne, T.; Le Heuzey, J. Y.
Impact of controlling risk factors after myocardial infarction. Arch. Mal. Coeur Vaiss. 3: 51-57, 1995.

35. Arnetz, B. B.; Andreasson, S.; Strandberg, M.; Eneroth, P.; Kallner, A.
Comparison between surgeons and general practitioners with respect to cardiovascular and psychosocial risk factors among physicians. Scand. J. Work Environ. Health 14: 118-124, 1988.
36. Su, C. T.; Yang, H. J.; Lin, C. F.; Tsai, M.C.; Shieh, Y. H.; Chiu, W. T.
Arterial blood pressure and blood lipids as cardiovascular risk factors and occupational stress in Taiwan. Int. J. Cardiol. 81: 181-187, 2001.
37. Parrott, A. C.
Smoking cessation leads to reduced stress, but why? Int. J. Addict. 11: 1509-1516, 1995.
38. Ginsberg, H. N.
Nonpharmacologic management of low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Am. J. Cardiol. 86: 41-45, 2000.
39. Takechi, R.; Hiramatsu, N.; Mamo, J. C.; Pal, S.
Red wine polyphenolics suppress the secretion and the synthesis of Apo B48 from human intestinal CaCo-2 cells. Biofactors 22: 181-183, 2004.
40. Sociedad Española de Arteriosclerosis (SEA). Dieta y enfermedades cardiovasculares. Página SEA, http://www.searteriosclerosis.org/recomendaciones-2.htm, p. 1-7, noviembre 30, 2000.
41. Martínez, C. A.; Ibáñez, J. O.; Kriskovich, J. O.; De Bonis, G. R.; Herdt, A. E.; Correa, L. M; Ibarra, R. A.; López Campanher, A. G.
Hipercolesterolemia en estudiantes de medicina. Anales Reunión de Comunicaciones Científicas y Técnicas de la UNNE, C. 065, Corrientes (Argentina), 2000.
42. Ivanov, V.; Carr, A. C.; Frei, B.
Red wine antioxidants bind to human lipoproteins and protect them from metal ion-dependent and independent oxidation. J.Agric. Food Chem. 49: 4442-4449, 2001.
43. Abu-Amsha, R.; Burke, V.; Mori, T. A.; Beilin, L. J.; Puddey, I. B.; Croft, K. D.
Red wine polyphenols, in the absence of alcohol, reduce lipid peroxidative stress in smoking subjects. Free Radic. Biol. Med. 30: 636-642, 2001.
44. Andalo, P.
Una afección silenciosa. Diario Clarín, Buenos Aires, p. 32, mayo 18, 2001.
45. Chanyeung, M.; Ferreira, P.; Frohlich, J.; Schulzer, M.; Tan, F.
The effects of age, smoking and alcohol in routine laboratory tests. Am. J. Clin. Pathol. 75: 320-326, 1981.
46. Smith, C. J.; Fischer, T. H.
Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. Atherosclerosis 158: 257-267, 2001.
47. Coniglio, R. I.; Colombo, O.; Vasquez, L. A.; Salgueiro, A. M.; Oteo, J. C.; Dahinten, E.; Pino, M.; Cailotto, M.; Camardón, H.; Calvagno, D.; Príncipe, N.
Aterosclerosis coronaria: evaluación de parámetros biomédicos para la detección de individuos de alto riesgo. Acta Bioquím. Clín. Latinoam. 28: 181-196, 1993.
48. Coniglio, R. I.; Dahinten, E.; Vidal, E.; Vásquez, L. A.; Salgueiro, A. M.; Otero, J. C.
Correlación entre variables asociadas con el riesgo para la aterosclerosis coronaria. I: Análisis de una muestra poblacional del sur argentino. Acta Bioquím. Clín. Latinoam. 26: 35-43, 1992.
49. Fogelholm, M.; Kujala, U.; Kaprio, J.; Sarna, S.
Predictors of weight change in middle-aged and old men. Obes. Res. 8: 367-373, 2000.
50. Khurana, M.; Sharma, D.; Khandelwal, P. D.
Lipid profile in smokers and tobacco chewers. A comparative study. J. Assoc. Physician India 48: 895-897, 2000.

Recibido: 08 de Febrero de 2005.
Aprobado: 09 de Junio de 2005.

Rev. Cienc. Tecnol.
Año 7 / Nº 7a / 2005 / 53-59

IMPACTO DE LAS PARASITOSIS EN INFANTES RESIDENTES DEL MUNICIPIO DE COLONIA AURORA, PROVINCIA DE MISIONES, ARGENTINA

[1]Meyer, A. G. / [2]De Torres, R.
[1]Especialización en Microbiología Clínica, UNaM, Av. San Martín S/Nº, Colonia Aurora.
[2]Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Junín 956, Buenos Aires.

ABSTRACT

EFFECT OF PARASITES ON CHILDREN FROM COLONY AURORA CITY, PROVINCE OF MISIONES, ARGENTINA

An enteroparasitologic prevalence study based on a coproparasitologic analysis and the Graham test were conducted, in order to evaluate the children population (between 1-12 years old) from Colony Aurora, Province of Misiones. The 89.1% of children had parasites. A prevalence of 22.9% for Uncinariasis and 6.9% for Estrongiloidiasis was found.

Also, during 1999-2002, a serial coproparasitologic retrospective study was conducted; the population target was children younger than 6 years old with social security; the 60.5% of them were parasited. A 1.7% case of Uncinariasis and Estrongiloidiasis were found for each one.

When comparing the case frequency of "children younger than 6 years old" sample from the prevalence study against "Children with social security which belongs to the free annual control program 2002" sample, a decrease of 39.6% cases was detected. In this last group, the 24.8% also had anemia, being the parasites found the major cause.

In our study, "Los Toldos" and "El Anta" are identified as hot spots, considering them as points where health program should begin, focused on the parasites described.

KEY WORDS: Entero parasitic Prevalence, Estrongyloidiasis, Misiones, Argentina.

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó un estudio de prevalencia de enteroparasitosis basado en un análisis coproparasitológico y un Test de Graham seriado. El mismo estuvo focalizado a niños entre 1-12 años de edad inclusive, residentes del Municipio de Colonia Aurora, Provincia de Misiones. El 89,1% de los casos estudiados estaban parasitados. La prevalencia fue del 22,9% y del 6,9% para Uncinariasis y Estrongiloidiasis, respectivamente.

De manera similar, en el estudio retrospectivo de coproparasitológicos seriados realizados durante el período 1999-2002, el 60,5% niños menores de 6 años con seguro social estaban parasitados. Los casos de Uncinariasis y Estrongiloidiasis correspondieron al 1,7% para ambas. Al comparar las frecuencias de casos entre la muestra "niños menores de 6 años del estudio de prevalencia", con la muestra "niños con seguro social que integran programas de control anual gratuito en el año 2002", se detectó una disminución de la parasitosis del 39,6%. El 24,8% de los niños con seguro social cursaban con anemia ferropénica, hallándose las parasitosis como causa principal por su alteración nutricional crónica.

Se identifica a los Parajes "Los Toldos" y "El Anta" como puntos críticos para iniciar programas sanitarios tendientes a disminuir estas parasitosis.

PALABRAS CLAVES: Prevalencia enteroparásitos, Anquilostomiasis, Estrongiloidiasis, Misiones, Argentina.

INTRODUCCIÓN

Los parásitos son una de las mayores causas productoras de infecciones, con elevados índices de morbilidad y mortalidad, produciendo además cuantiosas pérdidas económicas al hombre enfermo como así también a su entorno familiar y a la comunidad en la cual está inserto [1].

La Estrongiloidiasis, desde su descubrimiento por Normand en 1876, sigue constituyendo un problema significativo a causa de su capacidad de autoinfección (Endógena y exógena), su resistencia a los tratamientos y su potencial recrudescencia con desenlace fatal en individuos inmunosuprimidos [2].

La Uncinariasis constituye un problema importante para la Salud Pública, porque la infección intestinal por estos nematodos ocasiona una pérdida crónica de sangre que conduce a la anemia ferropénica. En la República Argentina, la zona de la Mesopotamia se considera una región de alta prevalencia de Uncinariasis [3].

El Municipio de Colonia Aurora corresponde al departamento de 25 De Mayo de la provincia de Misiones-Argentina, posee una superficie de 53.000 hectáreas y se encuentra al este el río Uruguay, límite internacional con el Brasil. Posee un clima subtropical sin estación seca, atravesado por numerosos arroyos entre cerros pertenecientes a las Sierras de Misiones [4]; con una población actual de 9.600 habitantes, de característica rural, conformada por un 44,13% con necesidades básicas insatisfechas (NBI). El Municipio está dividido en 27 parajes y colonias comunicados entre sí por 1300 km de caminos terrados. Es también variable el número de familias residentes en cada asentamiento, oscilando entre 10-200 familias. Acceden al agua potable menos del 30 % de las familias de Colonia Aurora (por obras de perforación se alcanza la tercer napa de agua, que no en todos los casos es clorificada y constituye la fuente de agua segura de estas familias) [5]. El relevamiento realizado en octubre del año 2000 revela que el Municipio cuenta con 966 niños entre 2-5 años.

Las enfermedades infecciosas y parasitarias ocupan el 3º lugar en la provincia de Misiones como causa de defunción infantil [6]. La desnutrición crónica con sus consecuencias funcionales que comprometen al individuo y a la Sociedad en su conjunto que conlleva a un mayor riesgo de muerte comparado con niños normales, son el fundamento del presente trabajo.

En la provincia de Misiones, un trabajo realizado en el Barrio El Timbó de la ciudad de Apóstoles en el año 2002, halló una prevalencia del 90,2 % (120 niños de 0-11 años) [7] y en el Hospital Provincial de Pediatría de Posadas año 2000 el 53,51% (5279 muestras) [8].

OBJETIVOS

1- Conocer la prevalencia de enteroparasitosis en niños entre 1-12 años inclusive.

2- Comparar entre la población infantil con cobertura social y la prevalencia de geohelmintos hallada en Colonia Aurora.

3- Identificar los parajes o colonias, donde el control de Uncinariasis constituye una prioridad.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el estudio de prevalencia prospectivo [9,10,11], realizado en los meses de noviembre y diciembre del año 2002, intervinieron 321 pacientes siendo el criterio de inclusión niños entre 1-12 años provenientes de 8 parajes seleccionados por su distribución geográfica y densidad poblacional.

Se realizó una primera visita a cada paraje convocando por medio de comunicación radial a los vecinos para reunirse en la escuela del lugar.

Se realizó una explicación del método de recolección de las muestras y la firma del documento que otorga el consentimiento de los padres o tutores para la realización de los estudios y posteriormente se procedió a la entrega de los materiales.

En un plazo de una semana se retiraban las muestras y una vez obtenido los resultados se convocaba en el mismo lugar a los tutores para la entrega de la medicación antiparasitaria dirigida [12] pertinente y para la explicación de los mecanismos de transmisión y prevención de las enteroparasitosis.

Se realizaron un Test de Graham seriado y un coproparasitológico seriado utilizando formol al 5% como conservante. Las pruebas consistieron en un examen microscópico directo en fresco y coloreado con Lugol y observación microscópica del sedimento por medio del método Teleman modificado [13,14].

Además se realizó un estudio retrospectivo de coproparasitológicos seriados y hemogramas para evaluación de eosinofílias, utilizando la base de datos del único laboratorio existente en el Municipio de Colonia Aurora. El criterio de selección fueron niños menores de 6 años con cobertura social que concurrieron al laboratorio entre 1999 y el 2002 inclusive. El método de concentración de las heces formuladas consistió en "Teleman modificado".

RESULTADOS

El análisis retrospectivo de población infantil de 1-5 años de edad, incluidos en un programa de control anual parasitológico e indicadores hematológicos, se presenta en la Tabla 1.

1- El Test de Graham no integra la lista de determinaciones gratuitas de los planes de control anual parasitológico de los niños con cobertura social.

2- Los casos de amebiasis fueron por especies consideradas comensales.

Es destacable que el 24,8% de los niños desarrollaban una anemia ferropénica en el transcurso del estudio. El estudio de prevalencia prospectivo en el Municipio dio los siguientes resultados.

1- Los casos de amebiasis fueron por especies consideradas comensales.

2- En este grupo se encuentra incluido un 6,9% de pacientes en los cuales se observaron huevos de *Uncinaria spp*. y larvas *Rabditoides* que pueden ser por coinfección con *Strongyloides stercoralis* o por eclosión de los huevos de *Uncinaria spp.* para los cuales se requeriría estudios adicionales para su clasificación.

Tabla 1: Número de pacientes, porcentaje de cada enteroparásito y eosinofília en niños entre 1-5 años inclusive con seguro social, que integran programas de control anual parasitológico. Municipio de Colonia Aurora, provincia de Misiones, Argentina. Año 1999 - 2002.

	1999	2000	2001	2002	Total
N º de pacientes	86	167	111	117	481
Porcentaje de parasitado	60,5 %	50,9 %	57,7 %	53,8 %	
Hematocrito < 33 %				24,8 %	
Eosinofília > 5 %	43 %	41,3 %	47,7 %	47 %	
Himenolepis spp.	2,3 %	3 %	0,9 %	0 %	
***Enterobius vermicularis* (1)**	1,2 %	0 %	0,9 %	6,3 %	
Uncinaria spp.	5,8 %	6,6 %	6,3 %	1,7 %	
Strongyloide stercoralis	4,7 %	0 %	0 %	1,7 %	
Giardia duodenalis	12,8 %	20,4 %	12,6 %	18,8 %	
Áscaris lumbricoides	7 %	0,6 %	9,9 %	4,3 %	
Blastocystis hominis	33,7 %	34,7 %	37,8 %	35 %	
***Ameba spp.* (2)**	1,2 %	8,4 %	6,3 %	2,6 %	

Fuente: Laboratorio de Análisis Clínicos Colonia Aurora.

Tabla 2: Número de pacientes que intervinieron en el estudio por Parajes. Municipio de Colonia Aurora, provincia de Misiones, Argentina. Año 2002.

Paraje	Frecuencia	Porcentaje (%)
El Anta	14	4,4
Flor de Mayo	50	15,6
Iby Porá	54	16,8
Km. 20, Colonia Aparecida	7	2,2
Las Limas	39	12,1
Los Toldos	24	7,5
Pacífico	46	14,3
Progreso	87	27,0
Total	321	100,0

Fuente: propia.

La prevalencia de enteroparasitosis en el Municipio de Colonia Aurora fue del 89,1% en niños de 1-12 años inclusive, observándose que la misma se mantuvo en el rango de 1-5 años de edad.

Calculado las prevalencias de *Uncinaria spp* y *Strongyloide stercoralis* en menores de 6 años los cruzamos con los datos obtenidos de niños con seguro social (Figura 1).

DISCUSIÓN

En poblaciones rurales de zonas tropicales la anemia es relativamente más frecuente, contribuida por las parasitosis, cuya severidad está relacionada al número de parásitos, su cepa y virulencia, el tiempo de infección y la susceptibilidad por parte del hospedero. El 24,8% de los niños entre 1-5 años inclusive con cobertura social padecían anemia ferropénica en el año 2002.

Tabla 3: Distribución de los pacientes por grupo etáreo. Municipio de Colonia Aurora, provincia de Misiones, Argentina. Año 2002.

Grupos etários	Frecuencia	Porcentaje (%)
1 = Menores de 2 años	9	3,0
2= 2-5 años	92	30,9
3= 6-9 años	123	41,3
4= 10-12 años	74	24,8
Total	298	100,0

Fuente: propia.

Tabla 4: Prevalencia de cada enteroparásito, en niños de 1-12 años inclusive. Municipio de Colonia Aurora, provincia de Misiones, Argentina. Año 2002.

Enteroparásito	Prevalencia
Blastocystis hominis	83,1 %
Giardia duodenalis	27,0 %
Ameba spp. (1)	22,3 %
Enterobius vermicularis	22,9 %
Uncinaria spp (2)	22,9 %
Strongyloides stercoralis	6,9 %
Áscaris lumbricoides	10,6 %
Trichuris trichiura	1,6 %
Himenolepis nana	1,6 %
Himenolepis diminuta	1,3 %

Fuente: propia.

Tabla 5: Distribución etaria de la prevalencia de Uncinariasis y Estrongiloidiasis

Grupos etários	*Uncinaria spp.*		Strongyloide stercoralis	
	Frecuencia	Porcentaje %	Frecuencia	Porcentaje %
1= Menores de 2 años	1	11,1	1	11,1
2= 2-5 años	15	16,3	3	3,6
3= 6-9 años	23	18,7	7	5,7
4= 10-12 años	18	24,3	9	12,2

Fuente: propia.

Los parásitos provocan una alteración nutricional crónica y en el caso de la Uncinariasis provoca anemia por pérdida de sangre por succión del parásito, siendo los niños de corta edad la población más susceptible porque juegan en el suelo contaminado [15]. La tabla 5 indica un aumento progresivo de las prevalencias a medida que aumenta la edad, que puede ser explicado porque a corta edad los niños realizan tareas de mantenimiento en las plantaciones.

La realización de un control anual disminuyó en forma significativa el riesgo de Uncinariasis Odds ratio = 0,09 (Tabla 6 y Figura 1). Nuestra investigación de prevalen-

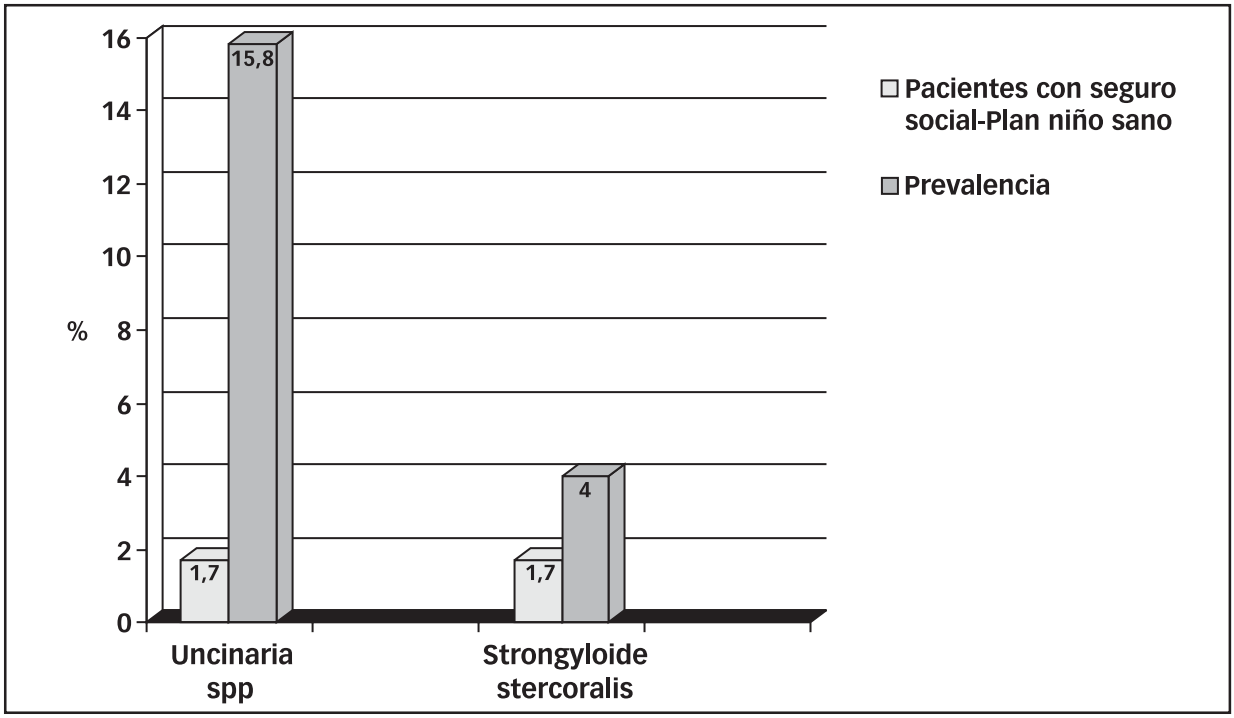

FIGURA 1: Comparación entre pacientes con seguro social que integran programas de control parasitológico anual y prevalencia de *Uncinaria spp.* y *Strongyloide stercoralis* en niños entre 1-5 años inclusive. Colonia Aurora, provincia de Misiones – Argentina. Año 2002. Fuente: propia.
Colonia Aurora, provincia de Misiones – Argentina. Año 2002. Fuente: Propia.

Tabla 6: Asociación entre Programas de control anual parasitológico y prevalencia de Uncinariasis, en niños de 1-5 años inclusive. Municipio de Colonia Aurora, provincia de Misiones, Argentina. Año 2002.

Control parasitológicoanual	Uncinariasis Si	Uncinariasis No	Total
Si	2	115	117
No	16	85	101
Total	18	200	218

Fuente: propia. Odds ratio = 0,09 Límites de confianza al 95 % 0,02 < OR < 0,4

Tabla 7: Asociación entre Programas de control anual parasitológico y la prevalencia de Strongyloides stercoralis, en niños de 1-5 años. Municipio de Colonia Aurora, provincia de Misiones - Argentina. Año 2002.

Control parasitológicoanual	Strongyloides stercoralisSi	Strongyloides stercoralisNo	Total
Si	2	115	117
No	4	97	101
Total	6	212	218

Fuente: propia. Odds ratio = 0,42 Límites de confianza al 95 % 0,09 < OR < 1,89

Tabla 8: Porcentaje de Uncinariasis en niños entre 1-12 años inclusive, por Parajes del Municipio de Colonia Aurora, provincia de Misiones, Argentina. Año 2002.

Paraje o Colonia	Uncinariasis positivo	Uncinariasis negativo	Total	Uncinariasis Porcentaje
El Anta	6	8	14	42,9
Flor de Mayo	10	40	50	20
Iby Porá	11	43	54	20,4
Aparecida	0	7	7	0
Las Limas	0	3 8	38	0
Los Toldos	15	9	24	62,5
Pacífico	3	42	45	6,6
Progreso	21	66	87	24,1
Total	66	253	319	

Fuente: propia.

cia determinó que el 13,6% de la población que integró el estudio defeca en el ambiente. La eliminación de este factor de contaminación ambiental, sumado al uso del calzado y un control anual debe bajar la prevalencia de Uncinariasis hasta su eliminación [16,17]. Un control anual disminuyo en el año 2002 hasta un 39,6% las enteroparasitosis (Tabla 1).

Los parajes Los Toldos y El Anta [Tabla 8], con elevados porcentajes de infección por *Uncinaria spp*., son coincidentes con las zonas más empobrecidas del Municipio, integrando el primer paraje una comunidad aborigen.

En Estrongiloidiasis no se logró una disminución significativa del riesgo con un control anual (Tabla 7) Odds ratio = 0,42 Límites de confianza al 95% 0,09 < OR < 1,89. Esto puede ser explicado por el uso del antiparasitario Mebendazol, aportado gratuitamente por el seguro social, que no constituye el tratamiento de elección de esta parasitosis [18,19].

CONCLUSIONES

1- La alta prevalencia de enteroparasitosis del 89,1%, con característica de endemia, refleja las deficiencias en infraestructura básica y económica del Municipio de Colonia Aurora.

2- La realización de un control parasitológico anual disminuiría significativamente la Uncinariasis. ●

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- Botero, D.; Restrepo, M.
Parasitosis Humanas. 2 º edición. EDT Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia 1992. Cáp. 1. Pág. 12.

2- Cueto, R.; Feldman, R. E.
Strongyloides stercoralis. Microbiología Biomédica. EDT. Atlante Cáp. 123. Pág. 1034.

3- Minvielle, M.
Uncinarias. Microbiología Biomédica. EDT. Atlante Cáp. 124. Pág. 1041.

4- Margalot, J. A.
Geografía de Misiones. Copyright 6 º edición, 1994.

5- Buhazo, María L.; Gileno, José G.
Archivo Municipalidad de Colonia Aurora. Año 2001.

6- Viscaychipi, K.
Relevamiento de enteroparásitos en familias del ámbito suburbano de la ciudad de Apóstoles-Misiones. (Tesina de grado). UNaM, año 2002.

7- Laczeski, M.
Laboratorio – Hospital Provincial de Pediatría Posadas-Misiones-Argentina. Año 2000.

8- Programa Operativo Anual (POA). Coordinación de Programas Materno Infantiles. Ministerio de Salud Pública de la Provincia de Misiones. Tomo I, págs. 49, 51 y 52. Tomo II, pág. 95. Año 2003.

9- Grenberg, R.; Stephen, R.; Flanders, W. y Otros.
Medidas epidemiológicas. Epidemiología Médica. 2º edición 1998. EDT. Manual Moderno, Cáp. 2. Págs. 22 y 23.

10- World Health Statistics Quaterly – *Rapport Trimestriel de Statistiques sanitaries mundiales* 38 (1): 1985.

11- Lwanga, S. K.; Lemesshow, S.
Determinación del tamaño de las muestras en los estudios sanitarios. Manual práctico Ginebra. OMS.
12- Atías, Antonio.
Tratamiento de las parasitosis y tablas terapéuticas. Parasitología Médica. EDT. Mediterráneo 1999. Cáp. 66.
13- Mercado, R.; Munuz, V.; Lorca, M.; García, A.
Métodos de Diagnóstico Directo. Atías Antonio. Parasitología Médica. EDT. Mediterráneo 1999. Cáp. 64. Págs. 563 y 564.
14- García, L. S.; Bruckener, D. A.
1998. *Diagnostic Medical Parasitology*. EDT. Elsevier, New York.
15- Atías, A.
Anemia y Parasitosis. Parasitología Médica. EDT. Mediterráneo 1999. Cáp. 61.
16- Atías, A.
Estrongiloidosis. Parasitología Médica. EDT. Mediterráneo 1999. Cáp. 19. Pág. 186.
17- Naquira, C.
Anquilostomosis. Parasitología Médica. EDT. Mediterráneo 1999. Cáp. 18.
18- Carey, C.; Lee, H.; Woeltje, K.
Enfermedades Gastroenterológicas. Manual Washington de Terapéutica Médica 10º edición. EDT. Masson, SA. Barcelona (España). 1998. Págs. 75-76.
19- Atías, A.
Tratamiento de las parasitosis y tablas terapéuticas. Parasitología Médica. EDT. Mediterráneo 1999. Cáp.66.

Recibido: 12 de Noviembre de 2004.
Aprobado: Agosto de 2005.

Rev. Cienc. Tecnol.
Año 7 / Nº 7a / 2005 / 60-67

NIVEL DE INFORMACION SOBRE FACTORES DE RIESGO ATEROGENICO EN EMPLEADOS DE DOS HOSPITALES PUBLICOS

Castillo Rascón, Maria S.[1-3]; Bonneau, Graciela A.[1-3]; Sánchez, Augusto R.[2-3]; Ceballos, Blanca[1]; Malarczuk, Elba C.[1-3]; Medina, Gladis E.[3]; Jiménez, Sonia[2-3]; Pianesi, Maria E.[2]; Castillo, Claudia[3]
[1]Hospital Dr. Ramón Madariaga, Posadas-Misiones
[2]Hospital Provincial de Pediatría, Posadas-Misiones
[3]Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones.

ABSTRACT

INFORMATION LEVEL OF ATHEROGENIC RISK FACTORS IN EMPLOYEES FROM TWO PUBLICS HOSPITALS

In Misiones, cardiovascular diseases constitute the first cause of morbidity. Hence, we took the decision of evaluating the Information Level (IL) about Atherogenic Risk Factors in hospital employees, relating them with their degree of education and with Hypercholesteronemia (HC), Tobacco Addiction (TA) and High Blood Pressure (HBP). 378 employees from Madariaga and Pediatric Hospitals from Posadas were interviewed. The IL was evaluated by means of a survey elaborated for the purpose. HC was considered: Total Cholesterol (TC) ~ 200mg/dl, HBP ~ 140/90 mmHG.. The 16% and 18% of the interviewees recognized correctly all the ARF and the content TC of food, respectively. We found a positive relationship between IL about ARF and the level of education. The groups with a lower IL presented a higher occurrence of Tobacco Addiction and HBP, and the groups with higher IL presented a higher frequency of HC. Due to the low IL found, we suggest education campaigns to be carried out.

KEY WORDS: High Blood Pressure, Tobacco Addiction, Hypercholesterolemia, degree of knowledge, level of education

RESUMEN

En Misiones las enfermedades cardiovasculares constituyen la primer causa de mortalidad. Por ello nos propusimos: evaluar el nivel de información (NI) sobre Factores de Riesgo Aterogénico (FRA) en empleados hospitalarios, relacionarlos con el grado de instrucción alcanzado y con : Hipercolesterolemia (HC), Tabaquismo e Hipertensión Arterial (HTA). Se entrevistaron 378 trabajadores de los Hospitales Madariaga y Pediátrico de Posadas. El NI se evaluó por encuesta elaborada a tal fin. Se consideró HC: Colesterol Total (CT) □200mg/dl e HTA: □140/90 mmHg.
El 16% y el 18% de los encuestados reconoció correctamente todos los FRA y el contenido CT de los alimentos, respectivamente. Hallamos una relación positiva entre NI sobre FRA y nivel de instrucción alcanzado. Los grupos con menor NI presentaban mayor frecuencia de Tabaquismo e HTA y en los grupos con mayor NI era más frecuente la HC. Debido al bajo NI encontrado se sugiere realizar campañas de educación.

PALABRAS CLAVES: Hipertensión Arterial, Tabaquismo, Hipercolesterolemia, Grado de Conocimiento, Nivel de Instrucción.

INTRODUCCIÓN

La aterosclerosis es una enfermedad del sistema arterial caracterizada por engrosamiento focal de la porción interna de la pared arterial [1]. Se desarrolla en las arterias coronarias, carótidas ,cerebrales, renales, aorta abdominal y arterias que irrigan las extremidades inferiores, siendo el proceso de su formación muy complejo involucrando componentes de la sangre circulante y de la pared arterial [2].

La aterosclerosis coronaria es la principal causa del infarto del corazón y numerosos factores de riesgo intervienen para su silencioso desarrollo a través del tiempo. Se definen como "factores de riesgo" a características o circunstancias personales, ambientales o sociales, que actuando a través del tiempo sobre los individuos o los grupos, aumentan la probabilidad que el evento no deseado ocurra [3].

El tercer informe del Panel de Tratamiento para Adultos (ATP III) establece que los factores de riesgo aterogénico (FRA) mayores para la Enfermedad Cardiaca Coronaria (ECC) son la hipercolesterolemia, el tabaquismo, la hipertensión, el colesterol HDL disminuido, historia familiar de ECC prematura y la edad. Este informe si bien mantiene la atención en el tratamiento intensivo de pacientes con ECC, su característica sobresaliente es el enfoque sobre la prevención primaria en personas con múltiples factores de riesgo [4].

Hace más de cincuenta años que se realiza el estudio Framingham, el cual identifica al Colesterol sérico, la Hipertensión Arterial (HTA) y el Tabaquismo como factores de riesgo mayores modificables para la enfermedad cardiaca coronaria [5].

Estudios previos establecen la relación del colesterol sérico y otras lipoproteínas con la ECC en subgrupos específicos [6]. El estudio internacional MONICA encuentra que los niveles de colesterol solo explican un 35% de los eventos coronarios, mientras que si lo considera junto al tabaquismo, índice de masa corporal y presión sistólica, explican la mitad de los eventos cardíacos [5].

La existencia de una correlación fuerte, positiva, continua e independiente entre presión arterial y riesgo de enfermedad cardiovascular está bien documentada [7]. La OMS establece una categorización en bajo, moderado, alto o muy alto riesgo en función de la probabilidad de un evento cardiovascular en los próximos 10 años [8].

Puesto que la hipertensión arterial es una enfermedad muy frecuente, su importancia como factor de riesgo cardiovascular adquiere una trascendencia sanitaria significativa. La información epidemiológica disponible en nuestro país es escasa, pero los datos muestran una prevalencia que oscila entre el 26.0 y el 39.8% [9].

Gran parte de los pacientes con hipertensión establecida no realizan suficientes cambios en el estilo de vida, no toman medicación o pese a recibirla están insuficientemente controlados. En Argentina la información disponible al respecto es parcial, pero los estudios muestran un grado de control muy pobre, no superior al 13% [9]. En un estudio que realizamos en la ciudad de Posadas sobre individuos aparentemente sanos se encontró que el grupo con nivel de instrucción primario y secundario tenían, mayor frecuencia de HTA respecto de los de nivel terciario, no encontrándose diferencias para el colesterol LDL y el tabaquismo [10].

Actualmente en Argentina se estima que el número de muertes por enfermedades relacionadas con el consumo de tabaco asciende a cerca de 45.000 individuos por año. La probabilidad de desarrollar un Infarto Agudo de Miocardio (IAM) se eleva significativamente cuando el tabaquismo se asocia con diabetes, HTA y dislipidemia. El riesgo de desarrollar un evento coronario fatal se duplica en los hombres fumadores, en las mujeres este riesgo aumenta 4 veces. [11]. El tabaquismo es un factor de riesgo independiente e importante para el infarto agudo de miocardio. y cerca del 40% de los casos en la población argentina (y cerca del 55% de casos por debajo de 55 años) son atribuibles a éste. [12]

En un estudio realizado en adultos de Logroño, España, los autores encuentran una alta prevalencia de los principales factores de riesgo cardiovascular: hipercolesterolemia, hipertensión arterial, tabaquismo y sedentarismo, todos ellos excepto el tabaquismo se incrementan con la edad [13]. En un estudio realizado en la provincia de Corrientes, Argentina, a fin de determinar la frecuencia de factores de riesgo cardiovascular en personal docente, los autores encontraron una frecuencia de hipertensión arterial del 21% y tabaquismo del 28% y no se realizaron determinaciones de colesterol total. [14]

Ciertamente hay evidencia que las grasas oxidadas y los productos de oxidación lipídica están presentes en alimentos humanos, los que son absorbidos por el intestino y aparecen en la circulación sanguínea, ya que estas sustancias ingeridas pueden tener efectos deletéreos cardiovasculares tanto en humanos como en animales de experimentación. Sin embargo, no permanece claro de que manera la grasa oxidada de la dieta amenaza la salud humana o disminuye su longevidad [15].

Diversos estudios hablan de un patrón alimentario "prudente", rico en vegetales, frutas, legumbres, pescado y granos enteros se relaciona con una menor tasa de ECC, mientras que una dieta"occidental" rica en carnes

rojas, manteca , carnes procesadas, huevos y productos con alto tenor graso se vinculan con una tasa mayor de ECC [16].

La enfermedad cardiovascular se asocia con un bajo nivel de clase social en numerosos estudios epidemiológicos. Los mecanismos que se encuentran detrás de estos hallazgos no son totalmente conocidos, aunque varios factores pueden ser de importancia tales como estilo de vida, regulación endocrina y deprivación fetal. Un mejor entendimiento de las bases biológicas para la enfermedad relacionada con la clase social puede facilitar los esfuerzos en medicina preventiva vinculada con la salud cardiovascular [17].

En la provincia de Misiones, las enfermedades cardiovasculares constituyen la primer causa de mortalidad de acuerdo a las últimas estadísticas disponibles en el Ministerio de Salud Pública, las que corresponden al año 2004.[18]

Los empleados de los hospitales públicos se hallan en permanente contacto con los usuarios de estos Servicios, a quienes deben orientar y asesorar sobre conductas que prevengan la aparición de ECC. Sin embargo no existen estudios en muestro medio que demuestren el grado de conocimiento sobre Factores de Riesgo Aterogénico (FRA) en los trabajadores de salud y su relación con la presencia de los mismos en estos individuos.

Los objetivos del presente trabajo podemos resumirlos en: evaluar el nivel de información sobre FRA en empleados de los hospitales públicos de Posadas; relacionar el nivel de información con el grado de instrucción alcanzado y con la presencia de Hipercolesterolemia, Tabaquismo e Hipertensión Arterial.

MATERIALES Y METODOS

Se entrevistaron 378 individuos sobre un total de 1.148 , mayores de 18 años, de ambos sexos, trabajadores de los Hospitales Dr. Ramón Madariaga y Provincial de Pediatría de la ciudad de Posadas, provincia de Misiones. La participación de los individuos fue voluntaria. Las características de la población estudiada fueron las siguientes: (Tabla 1).

Con respecto a la distribución por sexo se debe aclarar que el total del personal se distribuye en un 60% para el sexo femenino y un 40% para el masculino, es decir se obtuvo mayor participación de las mujeres. Los criterios de clasificación de los individuos según nivel de instrucción fue el siguiente: a) Primaria como: Primaria incompleta a completa mas Secundaria incompleta. b) Secundaria como: Secundaria incompleta a completa mas Terciario incompleto a completo y c) Universitaria

Los Factores de Riesgo Aterogénico Mayores Modificables evaluados fueron Colesterol Total ≥ 200 mg/dl, Tabaquismo y Presión Arterial ≥ 140 / 90 mmHg.

La determinación de Colesterol Total se realizó con muestra de sangre obtenida con 12 horas de ayuno, separación del suero dentro de las dos horas y procesamiento en el día. Las muestras fueron procesadas por método enzimático colorimétrico en un Autoanalizador Metrolab 2000 con calibradores comerciales. Se realizó control de calidad interno con pool de sueros preparado en el Laboratorio y control de calidad externo por suscripción a la Fundación Bioquímica Argentina. Los reactivos de laboratorio fueron donados por Laboratorios Wiener.

La presión arterial fue medida en ambos brazos utilizando esfingomanómetro de mercurio y/o aneroides y estetoscopios a diafragma siguiendo las recomendaciones habituales.

A fin de evaluar el grado de conocimiento sobre FRA se solicitó a los entrevistados que identificaran correctamente cuatro factores y para determinar conocimientos sobre contenido de colesterol en los alimentos se les pidió que identifiquen correctamente tres alimentos ricos y tres pobres en colesterol.

Los datos fueron procesados en el programa Epiinfo 2000, el test estadístico utilizado para comparar proporciones fue Chi cuadrado considerándose significativo un $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observa en la Figura Nº 1 que el 28% de la población encuestada no pudo identificar correctamente ningún FRA y si consideramos como punto de corte de aceptabilidad de conocimientos un mínimo de 50% de respuestas correctas el 55% cumplen con este requisito.

En la Figura Nº2 comparado con la anterior se observa un grado mayor de conocimiento con respecto al con-

Tabla 1

Nivel de instrucción	Primaria (n: 130)	Secundaria (n: 128)	Universitaria (n: 120)
Edad (años)	46 ± 10	41 ± 10	43 ± 8
Sexo	Femenino: 74% Masculino: 26%	Femenino: 74% Masculino: 26%	Femenino: 72% Masculino: 28%

tenido de colesterol en los alimentos, el 18% no fue capaz de identificar correctamente ningún alimento y si adoptamos el mismo criterio que en el caso anterior el 62% de los encuestados tuvieron un 50% o más de respuestas correctas.

El último consenso sobre prevención primaria de enfermedad cardiovascular realizado en el año 2002, sugiere continuar con el mensaje de la adopción de estilos de vida saludable. Este último sigue siendo la piedra fundamental de la prevención primaria, incluyendo evitar el tabaquismo, hábitos dietéticos saludables, control de peso y la práctica de ejercicio apropiado de forma regular [19].

Es importante que el personal de salud posea los conocimientos mínimos necesarios sobre identificación correcta de factores de riesgo aterogénico, formas de prevención y control, a fin de poder brindar el asesoramiento y enseñanza adecuada a los usuarios de estos servicios para prevenir la aparición de ECC.

En un estudio realizado en Cuba, donde se evalúa el impacto de la educación sobre factores de riesgo para la enfermedad cardiovascular en la población, a través del médico y enfermera de familia, se observa una disminución de la obesidad, sedentarismo, hábito de fumar y estrés, atribuible al trabajo de promoción y prevención realizado por el equipo de salud [20].

Al relacionar el grado de conocimiento sobre factores de riesgo aterogénico (Figura N° 3) con el nivel de instrucción alcanzado, se observó una relación positiva entre ambos, así por ejemplo no tuvieron ninguna respuesta correcta el 41% de los individuos con instrucción primaria versus el 9% con instrucción universitaria, y en el

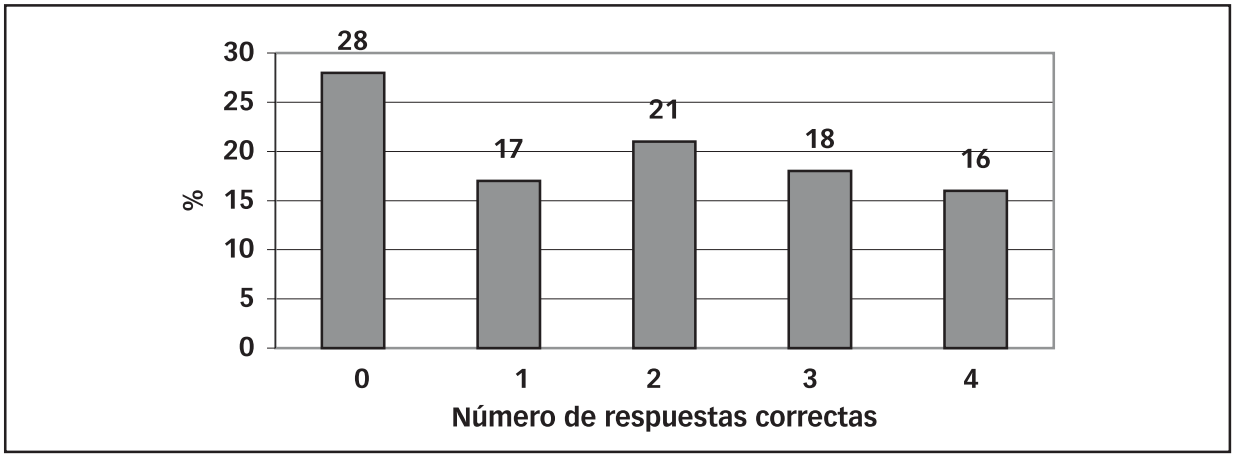

FIGURA 1: grado de conocimiento sobre Factores de Riesgo Aterogénico en un grupo de empleados públicos hospitalarios de la ciudad de Posadas, Misiones, 2002.

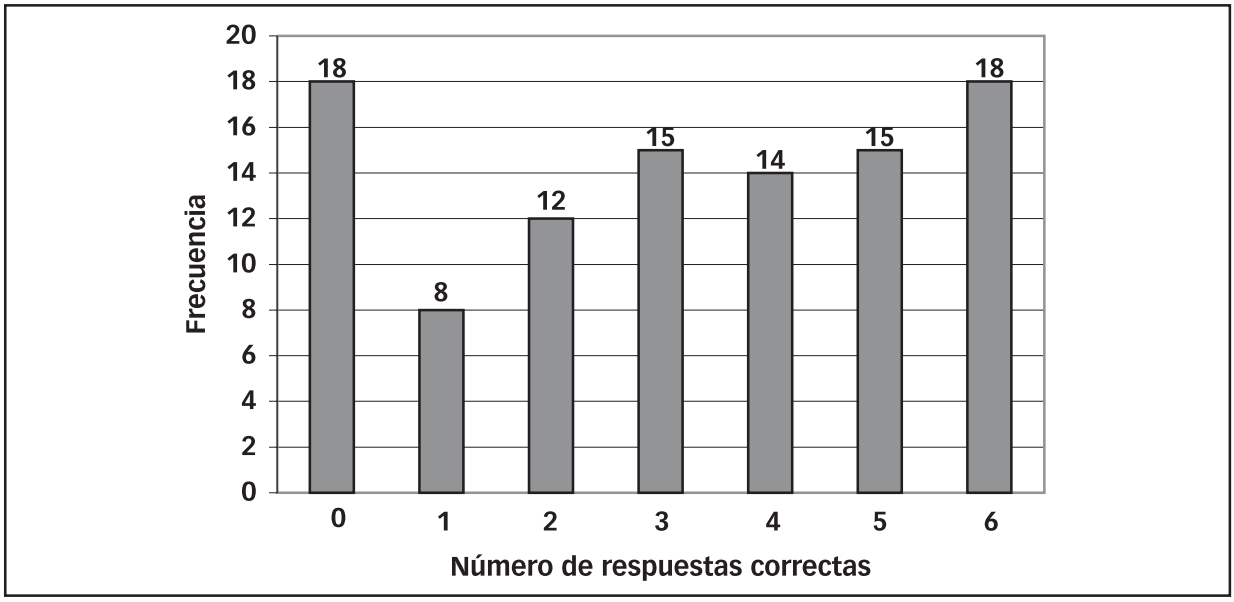

FIGURA 2: grado de conocimiento sobre contenido de colesterol de los alimentos en un grupo de empleados públicos Hospitalarios de la ciudad de Posadas, Misiones, 2002.

otro extremo con el 100% de respuestas correctas el 39% de los de nivel universitario versus el 5% de instrucción primaria. Por lo tanto sería conveniente que dentro de los mismos servicios hospitalarios los empleados con un nivel de formación superior puedan transmitir sus conocimientos al resto del personal, a fin de que el agente público con menor nivel de instrucción pueda optimizar su autocuidado y que el paciente, usuario del hospital, pueda recibir la información adecuada. Una relación similar se observa al comparar el grado de conocimiento sobre contenido de colesterol en los alimentos y nivel de instrucción alcanzado.

Al analizar los resultados de la Figura Nº 5 , si bien no se observan diferencias significativas entre grupos para cada uno de los factores de riesgo aterogénico modificables analizados, los grupos con menor grado de conocimiento sobre factores de riesgo aterogénico presentan una frecuencia mayor de Hipertensión Arterial y Tabaquismo que los grupos con un nivel de información mayor.

Una estrategia poblacional efectiva y amplia para prevenir el incremento de la prevalencia de hipertensión arterial con la edad y reducir el nivel general de presión arterial, aun en una pequeña medida, pueden modificar a

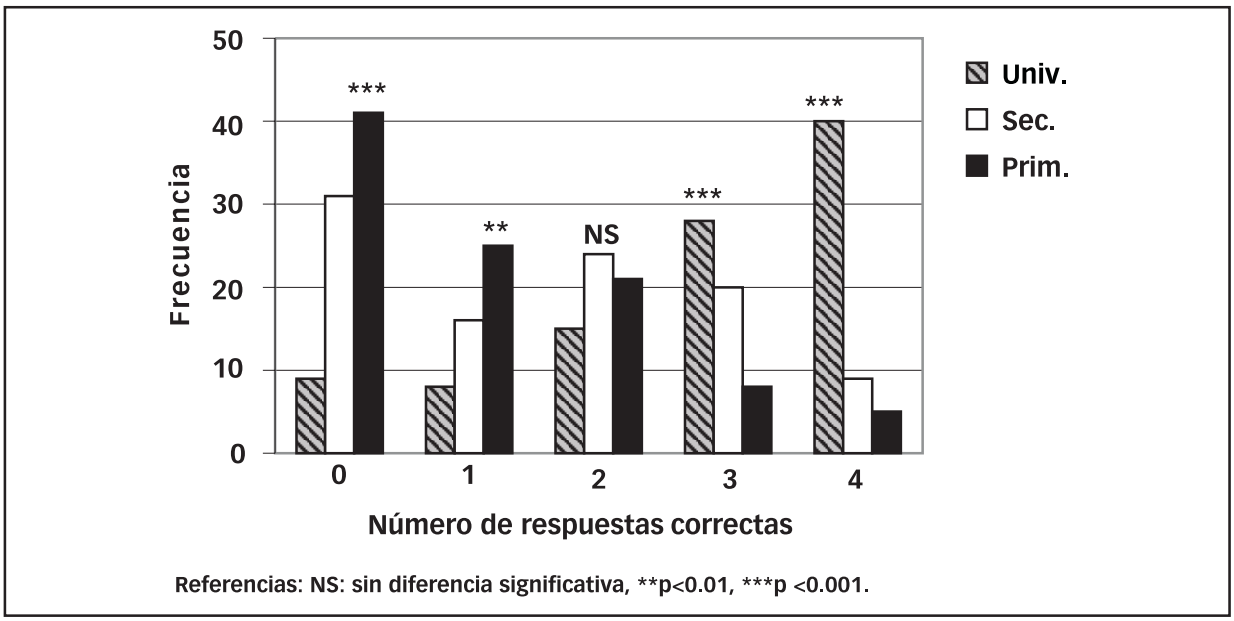

FIGURA 3: relación entre el grado de conocimiento sobre Factores de Riesgo Aterogénico y nivel de instrucción en un grupo de empleados públicos hospitalarios, Posadas, Misiones, 2002.

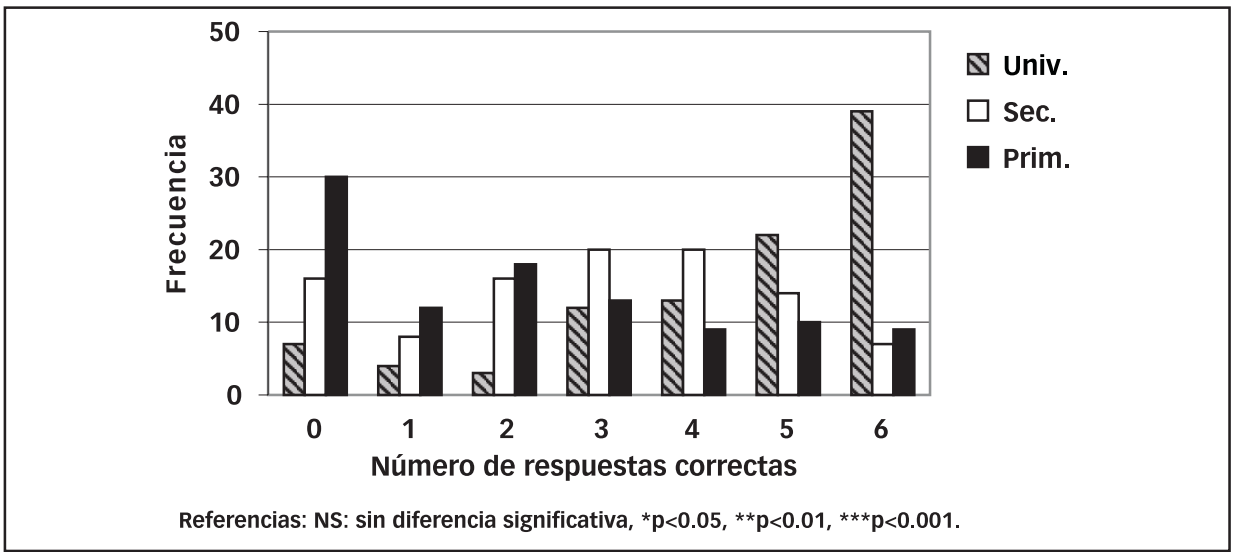

FIGURA 4: relación entre el grado de conocimiento sobre contenido de colesterol en los alimentos y el nivel de instrucción en un grupo de empleados públicos hospitalarios de la ciudad de Posadas, Misiones, 2002.

largo plazo la morbimortalidad cardiovascular total de la población, en una medida similar o mayor a la lograda al tratar tan solo a los hipertensos establecidos [9].

El abandono del tabaco incrementó el colesterol HDL, mejoró la tolerancia a la glucosa, desciende los niveles de tromboxano, mejoró la tensión arterial y la frecuencia cardiaca contribuyendo así a mejorar el perfil de riesgo. La tasa de mortalidad debida a enfermedad coronaria se redujo con la suspensión del hábito de fumar, además se observan resultados favorables a nivel de enfermedad vascular periférica y cerebrovascular con disminución de la incidencia de Accidente Cerebro Vascular isquémico y hemorrágico [11].

Al observar la relación de la Hipercolesterolemia con el nivel de información en las Figuras Nº 5 y 6, los grupos más informados presentaban una frecuencia mayor de niveles elevados de colesterol total que los grupos con menor nivel de información. Es de señalar que los grupos que poseen mayores conocimientos tanto sobre factores de riesgo como sobre contenido de colesterol en los alimentos están constituidos principalmente por agentes con nivel de instrucción universitario completo, es decir individuos con un poder adquisitivo mayor, lo que les permite que puedan acceder con mayor facilidad a productos de alto contenido energético, ricos en grasas saturadas y colesterol.

En el presente trabajo no se analizaron otros factores de riesgo modificables, pero no incluidos entre los mayores como la obesidad, el sedentarismo y los hábitos dietéticos, llamados por el ATP III "factores de riesgo relacionados con el estilo de vida", que pueden influir en los resultados obtenidos. Si bien los rangos de edades son

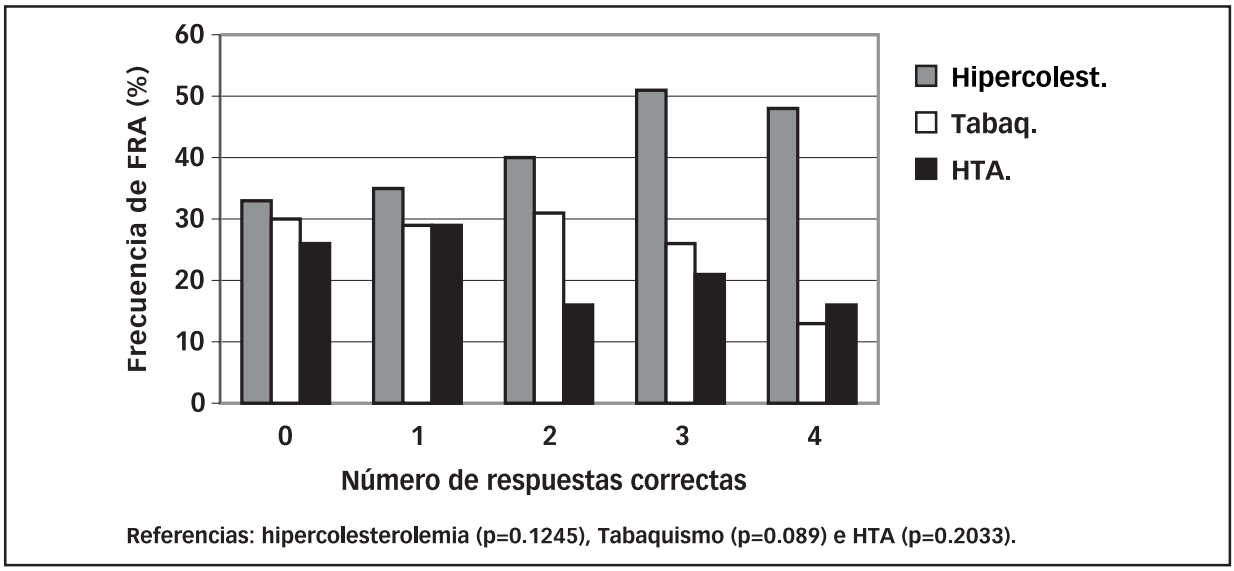

FIGURA 5: relación entre el grado de conocimiento sobre Factores de Riesgo Aterogénico y frecuencia de Hipercolesterolemia, Tabaquismo e Hipertensión Arterial (HTA) en un grupo de empleados públicos hospitalarios de la ciudad de Posadas, Misiones, 2002.

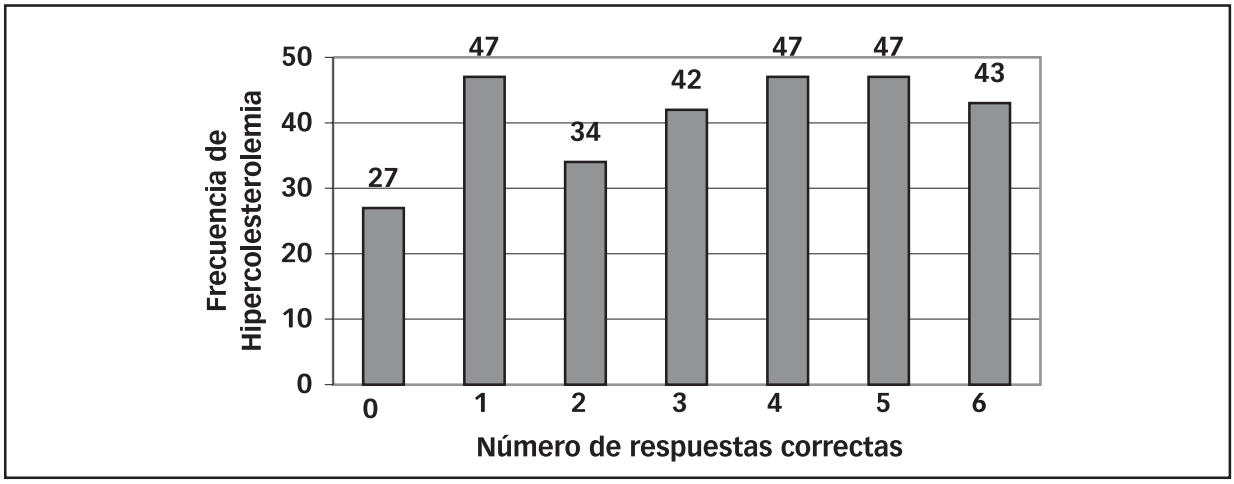

FIGURA 6: relación entre el grado de conocimiento sobre Factores de Riesgo Aterogénico y frecuencia de Hipercolesterolemia, Tabaquismo e Hipertensión Arterial (HTA) en un grupo de empleados públicos hospitalarios de la ciudad de Posadas, Misiones, 2002.

próximos y la distribución por sexo entre grupos es similar no se evaluó el efecto de la menopausia ya que esta se asocia con incrementos significativos del Colesterol Total [21].

También debemos considerar el estrés como factor de riesgo para ECC, donde uno de los componentes más importantes es la hostilidad, cuyo mecanismo está vinculado con hiperactividad del sistema nervioso simpático produciendo aumento de la presión arterial sistólica, taquicardia, mayor secreción de cortisol, noradrenalina y adrenalina y valores elevados de colesterol LDL.[22].

La prevención primaria ofrece la posibilidad de reducir la incidencia de la enfermedad coronaria, basada en cambios en el estilo de vida a través de la disminución de la ingesta de grasas saturadas, control de la presión arterial, eliminación del hábito de fumar, aumento de la actividad física, control de peso y disminución del estrés a fin de mejorar la calidad de vida y disminuir los costos derivados de la atención de estos pacientes. Sin embargo hay autores, que sostienen que el argumento económico de la medicina preventiva es engañoso, ya que el éxito significa a menudo posponer un problema, pero no prevenirlo del todo. Según los economistas, el punto de inflexión se encontraría en alguna edad cercana a los 50 años, en la que los beneficios de unos pocos años productivos más equivalen mas o menos a los costos adicionales de sobrevivir durante una edad avanzada. A partir de esta edad los argumentos económicos para la prevención se derrumban progresivamente. Sin embargo, a cualquier edad antes de la jubilación, cualquier política de prevención que reduzca la incapacidad o mejore la capacidad de trabajo dará lugar a una ganancia económica, y después de la jubilación cualquier medida que aumente la independencia y reduzca la necesidad de apoyo médico y social producirá ahorros económicos [23].

CONCLUSIONES

1-El grado de conocimiento sobre Factores de Riesgo Aterogénico en el grupo de empleados público hospitalario estudiado fue bajo. Se obtuvieron mejores resultados con el nivel de información sobre contenido de colesterol en los alimentos.

2- Se observó una asociación positiva entre el nivel de conocimientos y el grado de instrucción alcanzado.

3-No se encontró asociación significativa entre el grado de conocimiento y la presencia de Factores de Riesgo Aterogénico Mayores Modificables en los individuos estudiados. Fue mayor la frecuencia de Hipertensión Arterial y Tabaquismo en los grupos con menor grado de conocimientos; la Hipercolesterolemia fue más frecuente en los grupos con un nivel de educación superior.

4-Se sugiere realizar campañas de educación entre el personal hospitalario, donde los agentes que tienen un nivel de formación superior sean los que orienten a sus compañeros a fin de optimizar el autocuidado tanto de los agentes de salud como de los usuarios de estos Servicios.

AGRADECIMIENTOS

A todo el personal de los Hospitales Dr. Ramón Madariaga y Pediátrico de la ciudad de Posadas-Misiones.

A los Laboratorios Wiener por los reactivos donados.

Al Dr. Severino Bargardi y al Bqco. Pedrozo, Williams.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- Smith, Thier.
Fisiopatología. Principios biológicos de la Enfermedad. Edit Médica Panamericana. 920. 1986.

2- Coniglio, R. I.
Biología de la aterogénesis: Algunos conceptos de un proceso complejo,1ª parte. Bioquímica y Patología Clínica. 61(1):39-45. 1997.

3- Coniglio, R. I.
Aterosclerosis coronaria: criterios para la detección de individuos de alto riesgo. Acta Bioq.Clin.Lat. XXVIII (4): 519-527. 1994.

4- Executive Summary of the Triad report of the National Cholesterol Education Program(NCEO) Expert Panel on Detection, Evaluation and treatment of high blood colesterol in adults (Adult Treatment Panel III). JAMA. 285(19):2486-2497. 2001.

5- Kromhout, D; Menotti, A; Kesteloot, H.; Sans, S.
Prevention of coronary heart disease by-diet and lifestyle. Evidence from prospective cross-cultural-cohort, and intervention studies. Circulation. 105: 893-898. 2002.

6- Stamler, J; Daviglus, M. L.; Garside, D. B.; et al.
Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity. JAMA. 284: 311-318. 2000.

7- The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation and treatment of high blood pressure. Arch Intern Med. 157 : 2.413-2.446. 1997

8- 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. J. Hypertens. 17 : 151-183. 1999.

9- Informe de Comisión de Hipertensión Arterial Revista Argentina de Cardiología. 69(1) : 5-11. 2001.

10- Castillo, S.; Coniglio, R.; Doubnia, M. I.; Lopez Torres, J.; Guersanik, C.; Meza, G.; Claramaunt, R.; Durando, A.; Ramírez, R.; Silva, E.; D'Alonzo, T.
Factores de riesgo para la aterosclerosis coronaria en el nordeste argentino. Dieta alimentaria y niveles de instrucción. Revista de Ciencia y Tecnología Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, UNAM. 3: 6-16. 2000.

11- Informe de Comisión de Tabaquismo. Revista Argentina de Cardiología. 69(1): 12-21. 2001.

12- Schargrodsky, H.; Rosloznik, J.; Ciruzzi, M.; Pramparo, P.; Hirschon Prado, A.; Cesar, J.; Soifer, S.; Negri, E.; Tognoni, G.; La Vecchia, C.
Cigarette smoking and acute myocardial infarction: a case-control study from Argentina. Tobacco Control. 2:127-131. 1993.

13- Mosquera, J. D.; Brea, A. J.; Remalle Gómora; Gomez Alamillo, C.; Marquez del Prado, M.; Sanz, M.
Prevalencia de los Factores de Riesgo Cardiovasculares en Población Adulta de Logroño, La Rioja. Arteriosclerosis. 12(4) :199-208,2000.

14- Lapertosa, S.; Morales, M.; Rambau, D.; Polimeni, M.
Factores de riesgo cardiovascular en una población docente. Actas del Congreso Argentino de Diabetes. 36, 2. 2002.

15- Cohn, J. S.;
Oxidized fat in the diet, postprandial lipaemia and cardiovascular disease. Current Opinion in Lipidology. 13 : 19-24. 2002.

16- Hu, F. B.
Dietary pattern Análisis : a new direction in nutritional epidemiology. Current Opinion in Lipidology. 13 : 3-9. 2002.

17- Nilsson, P.; Moller, L.; Östergren, P.
Social class and cardiovascular disease-an update. Scans J. Soc. Med. 23(1): 3-8. 1995.

18- Ministerio de Salud Pública-Gobierno de la Provincia de Misiones. Causas de Mortalidad General año 2004. Provincia de Misiones. Estadísticas de Salud Pública. 2005.

19- Pearson, T.; Blair, S.; Daniels, S. R.; and others.
AHA Guidelines for primary prevention of cardiovascular disease and stroke. Update Circulation. 106: 388-391. 2002.

20- Bravet, P. P.; Ordóñez Carcelle, C.; Blanco Bouza, D.; Nordet Cardona, P.; Cardoso, P. M.; Martinez Fernández, C.
Perspectiva en la disminución y control de los factores de riesgo de aterosclerosis en Cuba mediante el médico de familia. Revista Cubana de Medicina General Integral. 6 (1):23-29. 1990.

21- Torng, P. L.; Ta-Chen, S.; Sung, F. C.; Chien, K. L.; Huang, S. Ch.; Chow, S. N.; Lee Y. T.
Effects of menopause and obesity on lipid profiles in middle-aged Taiwanese women : the Chin-Shan Community Cardiovascular Cohort Study. Atherosclerosis. 153 : 413-421. 2000.

22- Comisión de Aspectos Psicosociales. Revista Argentina de Cardiología. 69 : 99-108. 2001.

23- Geoffrey, R.
La estrategia de la medicina preventiva. Ed Masson-Salvat Medicina: 2-4. 1994.

Recibido: 03 de Junio de 2005.
Aprobado: 10 de Septiembre de 2005.

Rev. Cienc. Tecnol.
Año 7 / Nº 7a / 2005 / 68-72

ESTUDIOS CITOGENÉTICOS EN TRES ESPECIES DE AVES ANTÁRTICAS

[1]Ledesma, M. A. / [1]Cardozo, D. E. / [2]Montalti, D. / [3]Leotta, G. A. / [3]Gunski, R. J.
[1]Laboratorio de Citogenética de Aves. Departamento de Genética. F.C.E.Q.yN. U.Na.M. Félix de Azara 1552, 6º Piso. (3300). Posadas, Misiones, Argentina. E-mail: genaves@fceqyn.unam.edu.ar
[2]Dpto. Biología. AVES. Instituto Antártico Argentino. Cerrito 1248. (1010) Cap. Federal.
[3]Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Calle 118 y 60. cc: 296. CP: 1900. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

ABSTRACT

CYTOGENETIC STUDIES IN THREE SPECIES OF ANTARCTIC BIRDS

Peripheral blood samples from *Phalacrocorax bransfieldensis* (7 males), *Larus dominicanus* (4 males-5 females) and from *Chionis alba* (6 males-5females) were taken during the Antarctic expeditions of '97-'98 and '98-'99 summers in the Jubany Station and Orkney Station respectively. To obtain of mitotic metaphases long time cultures of lymphocytes were made. *P. bransfieldensis*, 2n=72, *L. dominicanus*, 2n=68, *C. alba*, 2n=76. Although the present work constitutes the first description of the number and the chromosome morphology of these three species, it is still necessary to make more studies with different types of differentials staining, like C and G bands, that allows to understand in the future the mechanisms that happend during the course of their evolution.

KEY WORDS: Chromosomes, Birds, *Phalacrocorax, Larus, Chionis.*

RESUMEN

Muestras de sangre periférica de *Phalacrocorax bransfieldensis* (7 machos), *Larus dominicanus* (4 machos - 5 hembras) y *Chionis alba* (6 machos - 5 hembras) fueron tomadas durante las campañas antárticas de verano '97-'98 y '98-'99 en las Bases Jubany y Orcadas, respectivamente. Las metafases mitóticas se obtuvieron de cultivos de linfocitos de larga duración. *P. bransfieldensis*, 2n=72, *L. dominicanus*, 2n=68, *C. alba*, 2n=76. Si bien el presente trabajo constituye la primera descripción del número y la morfología cromosómica de estas tres especies, aun es necesario realizar estudios con distintos tipos de coloraciones diferenciales, como los bandeos C y G, que permitan en el futuro comprender mejor los mecanismos que sucedieron durante el transcurso de su evolución.

PALABRAS CLAVES: Cromosomas, Aves, *Phalacrocorax, Larus, Chionis.*

INTRODUCCIÓN

En el Continente Antártico existen aproximadamente 39 especies de aves [1]. Los estudios citogenéticos son prácticamente inexistentes y solo recientemente, a partir del trabajo conjunto desarrollado por el Grupo Aves del Instituto Antártico Argentino y el Proyecto de Citogenética de Aves de la Universidad Nacional de Misiones, se han realizado muestreos sistemáticos que permitieron caracterizar diferentes especies de aves antárticas [2, 3].

El cormorán, *Phalacrocorax bransfieldensis,* (Pelecaniformes: Phalacrocoracidae), es residente permanente de latitudes australes. Los ejemplares adultos miden más de 70 cm. de largo y no presentan dimorfismo sexual. Sus colonias reproductivas están formadas por cientos de parejas que se ubican en las zonas costeras de diversas islas subantárticas. [1].

La paloma antártica, *Chionis alba*, (Charadriiformes: Chionididae), es un ave marina que se encuentra en la región antártica. Son completamente blancas y se las llama palomas por su aspecto general, modo de andar y volar. Es la única especie antártica que carece de membranas natatorias en sus patas, lo que no impide que nade con gran facilidad. No presentan diferencias visibles entre ambos sexos. Nidifican en la región antártica y durante el invierno migran hacia el norte, llegando hasta las Islas Malvinas y costas patagónicas. [4].

La gaviota cocinera, *Larus dominicanus*, (Charadriiformes: Laridae), es la única especie de esta familia que se reproduce en la región antártica, es de color blanco con el dorso y las alas negros. Son aves gregarias que se reproducen, comen y migran en grupos. Su distribución llega por el litoral Atlántico hasta Río de Janeiro, Brasil y por el Pacífico hasta Perú, también se las encuentra en África y Nueva Zelanda. [4].

El objetivo del presente trabajo fue describir el complemento y la morfología cromosómica de: *P. bransfieldensis; L. dominicanus* y *C. alba*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de sangre periférica de 7 machos de *Phalacrocorax bransfieldensis,* 4 machos y 5 hembras de *Larus dominicanus* y 6 machos y 5 hembras de *Chionis alba* fueron tomadas durante las campañas antárticas de verano '97-'98 y '98-'99 en las Bases Jubany (Isla 25 de Mayo – Shetlands del Sur, 62º 14' S 58º 40' W) y Orcadas (Isla Laurie - Orcadas del Sur, 60º 44' S 44º 44' S) respectivamente. Para la obtención de metafases mitóticas se utilizó la técnica de cultivo prolongado de linfocitos [5], en 8 ml. de medio de cultivo RPMI 1640 con HEPPES (Gibco), 2 ml. de suero fetal bovino y fitohemaglutinina como agente mitótico, se incubó en estufa a 37º C durante 72 horas, una hora antes de la cosecha del material se agregaron dos gotas de colchicina al 0,05%, luego de retirado el medio de cultivo se adicionaron 10 ml. de solución hipotónica de KCl 0,075 M dejando en estufa durante 15 minutos, para el prefijado se colocaron dos o tres gotas de fijador Farmer (Metanol: Ácido Acético 3:1), el fijado se realizó con 10 ml. de fijador Farmer. El material fue goteado sobre portaobjetos limpios y coloreado durante 10 minutos con solución de Giemsa en buffer fosfato 0,06M, pH 6,8. Para la obtención del número modal, se contaron y analizaron 30 metafases de cada especie, de

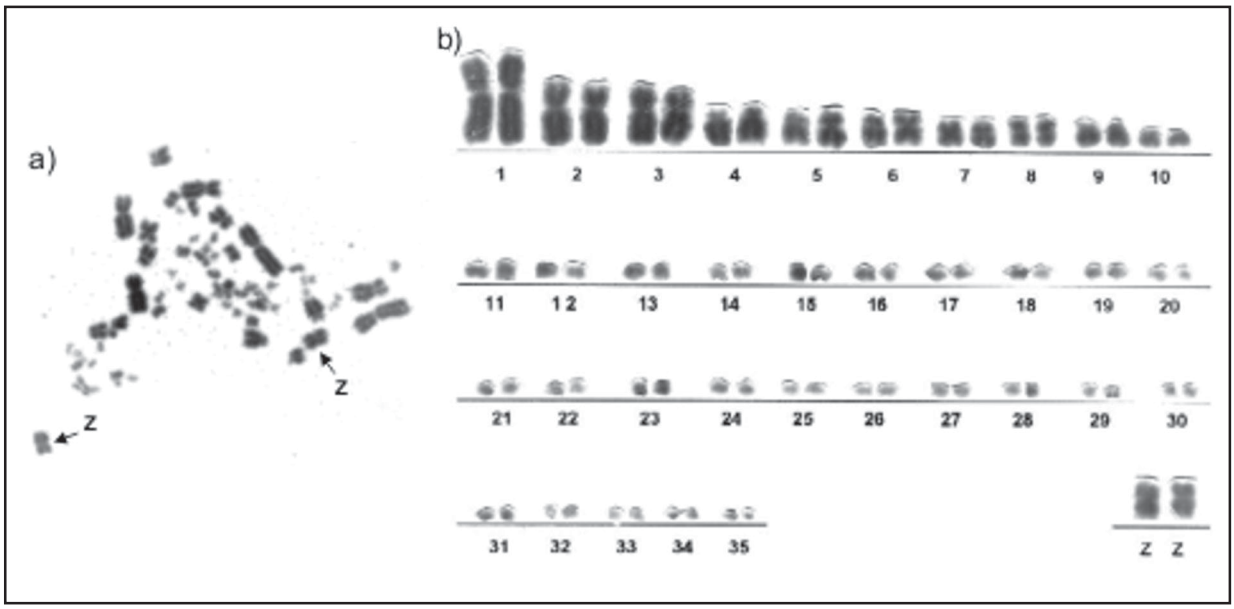

FIGURA 1: Metafase de a) macho y b) Cariotipo de *Phalacrocorax bransfieldensis* 2n=72. Las flechas indican los cromosomas sexuales.

las cuales, las mejores fueron fotografiadas utilizando película Imagelink HQ (Kodak) de 25 ASA y los positivos en papel, Kodabrome IIRC F3. Los cromosomas fueron ordenados según la nomenclatura propuesta por Levan *et al.* [6].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En *Phalacrocorax bransfieldensis,* 2n=72, (Figura 1) los cromosomas de los pares 1º, 2º, 3º y 5º son submetacéntricos, los pares 6º y 7º metacéntricos, 4º y 9º subtelocéntricos y a partir del 10º par son todos cromosomas telocéntricos pequeños. El cromosoma sexual Z es submetacéntrico y equivale en tamaño al 3º-4º par del complemento autosómico.

La familia Phalacrocoracidae está formada por 36 especies [4], de las cuales incluyendo el presente trabajo, han sido estudiadas citogenéticamente solo cuatro de ellas, *Phalacrocorax pygmaeus*, 2n=70 [7], *P. carbo*, 2n=70 [8, 9] y *P. niger*, 2n=90 [10, 11]. De acuerdo a Belterman y De Boer, [9] *P. niger* y *P. pygmaeus* presentan un cariotipo enteramente formado por cromosomas acrocéntricos a excepción del cromosoma Z que es metacéntrico, a diferencia de lo observado para *P. carbo* [9] y *P. bransfieldensis* donde existe predominancia de cromosomas bibraquiales. A pesar de la escasa información que existe hasta el momento en estudios cariotípicos para este orden, es posible observar que mientras las familias Pelecanidae y Sulidae presentan homogeneidad en su constitución cariotípica, la familia Phalacrocoracidae es muy heterogénea, lo que torna a este orden muy atractivo para estudios citogenéticos que permitan interpretar las relaciones cariotípicas que puedan existir entre las distintas familias, incluyendo las que aun no han sido estudiadas como Fregatidae, Anhingidae y Phaetonidae.

En *Larus dominicanus*, 2n=68, (Fig. 2) los pares 1º, 2º y 4º son submetacéntricos, 8º y 9º metacéntricos, 6º y 7º subtelocéntricos, 3º, 5º y 10º son telocéntricos, los restantes cromosomas son todos telocéntricos pequeños. El cromosoma Z es submetacéntrico y equivale en tamaño a los pares 3º-4º del complemento autosómico, el W es también submetacéntrico y equivale en tamaño a los pares 8º-9º.

Otras especies de gaviotas fueron analizadas, *L. argentatus* 2n=72, *L. canus* 2n=66, *L. fuscus* 2n=70, *L. marinus* 2n=72 y *L. ridibundus* 2n=66, [12]. Al comparar las distintas especies se puede observar que existe reducida variabilidad en el número cromosómico y prácticamente muy pocas diferencias a nivel morfológico, lo que sugiere una elevada estabilidad cariotípica en este grupo.

Chionis alba, 2n=76, (Fig. 3), donde los dos primeros pares del complemento son submetacéntricos, los pares 7º, 10º, 11º, 12º y 13º metacéntricos, los pares 4º, 5º, 6º y 9º subtelocéntricos y los pares 3º y 8º telocéntricos, los restantes son cromosomas telocéntricos pequeños. El cromosoma Z es submetacéntrico y de acuerdo a su tamaño se lo ubica entre los pares autosómicos 3º y 4º, mientras que el W es telocéntrico pequeño.

La familia Chionididae está compuesta por dos especies, *C. alba* que habita la zona antártica bajo América del Sur y *C. minor* que solamente se encuentra en la región antártica por debajo del Océano Índico [1]. Se puede observar que en su constitución cariotípica la paloma antártica presenta un elevado número de cromosomas bibraquiados. Hasta el presente, no existían registros citogenéticos para esta familia.

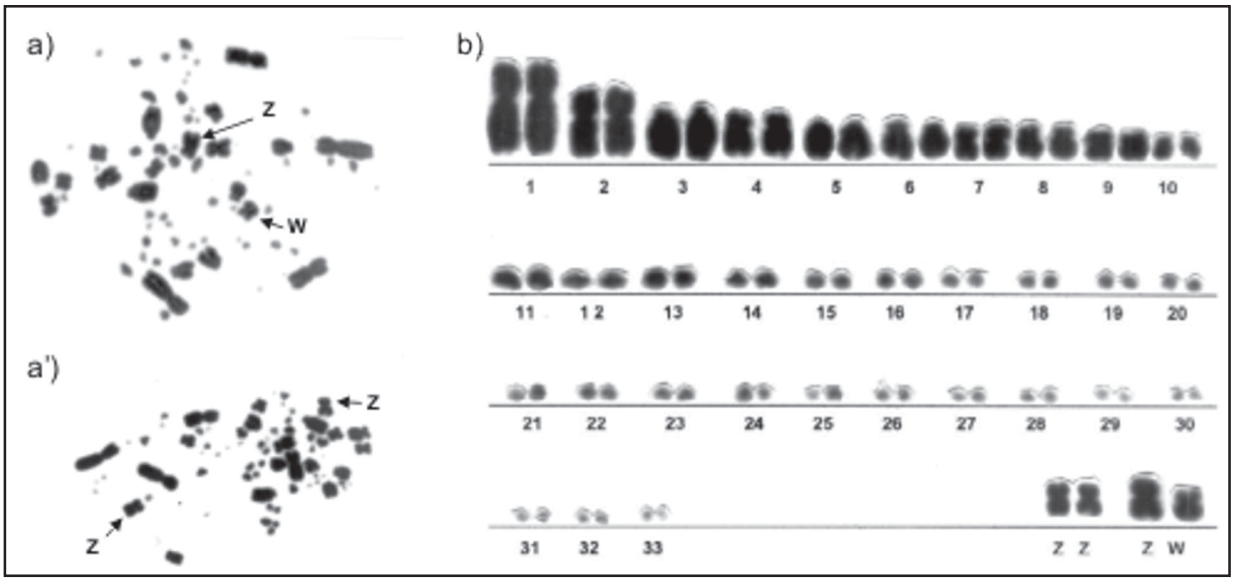

FIGURA 2: Metafases de a) hembra, a') macho y b) Cariotipo de *Larus dominicanus* 2n=68. Las flechas indican los cromosomas sexuales.

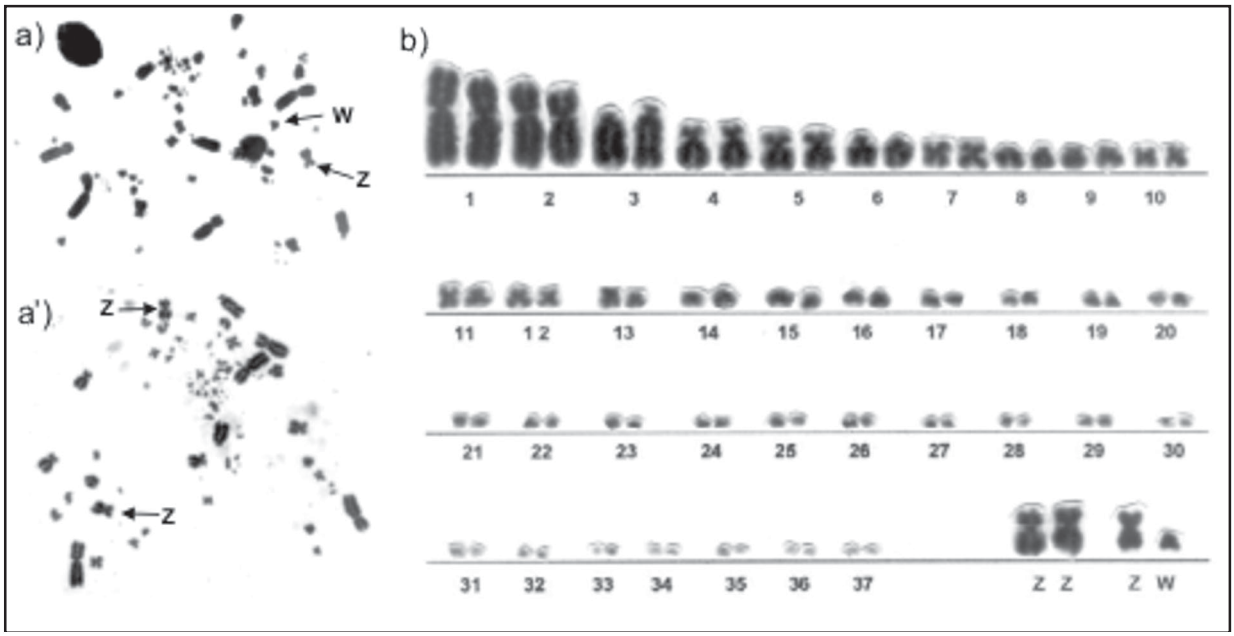

FIGURA 3: Metafases de a) hembra, a') macho y b) Cariotipo de *Chionis alba* 2n=76. Las flechas indican los cromosomas sexuales.

El orden Charadriiformes presenta una gran diversidad cariotípica [13]. Por ejemplo en las especies estudiadas de la familia Charadriidae el número cromosómico es 76 [14, 15, 16], en tanto que en la familia Scolopacidae el número cromosómico asciende hasta los 98 cromosomas [14], en ambas familias el cromosoma sexual Z corresponde en tamaño al 2º par autosómico. Por otro lado, en la familia Burhinidae, aparecen los complementos cromosómicos más bajos registrados hasta la actualidad para la clase Aves, con 2n=40 [17], en tanto que en la familia Laridae la media observada es de 68 cromosomas, y el cromosoma Z de estas familias se corresponde con el 4º par autosómico. *C. alba* y *L. dominicanus* presentan una elevada homogeneidad en su constitución cariotípica, particularmente en la morfología de sus macrocromosomas, lo que indicaría una estrecha relación filogenética entre ambas familias, en este sentido, estudios moleculares serían de gran interés en este orden.

Si bien el presente trabajo constituye la primera descripción del cariotipo de estas tres especies, aun es necesario realizar estudios con técnicas de coloración diferencial y moleculares, que permitan comprender mejor los mecanismos cromosómicos que ocurrieron durante el transcurso de su evolución. ●

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- http://www.argentinaxplora.com/destinos/antartid/antarsvg.htm

2- Delgado Cañedo, A.
Análisis Cariotípico del Género Pygoscelis (Spheniscidae:Aves). Tesis de Grado. Universidad Nacional de Misiones. Posadas, Misiones, Argentina. 59 p. 1999.

3- Boccelli, M.
Estudios Cariotípicos en Petreles. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Misiones. Posadas, Misiones, Argentina. 81 p. 2001.

4- Sick, H.
Ornitología Brasileira. Uma Introdução.V 1. Brasília: Editora Universitária de Brasília. 481 p. 1985.

5- Moorhead, R. S.; Howell, P. C.; Mellman, W. J.; Battips, D. M.; Hundgerford, D. A.
Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. Exp. Cell. Res. 20: 613-616. 1960.

6- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg. A.
Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52: 201-220. 1964.

7- Theodorescu, R. C.
The karyotypic evolution in two Pelecaniformes species (Aves). Caryologia 28: 459-466. 1975.

8- Oguma, K.
Studies on Sauropsid chromosomes IV. Chromosome numbers of sea-birds new to cytology. J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ. 5: 265-282. 1937.

9- Belterman, R. H. R.; De Boer, L. E. M.
A Karyological Study of 55 species of Birds. Including Karyotypes of 39 Species New to Cytology. Genética 65: 39-82. 1984.

10- Bhunya, S.P, Mohanty, M. K.
Localization of constitutive heterochromatin (C-band) and nucleolus organizers (NORs) in the somatic chromosomes of a pelecaniform bird Phalacrocorax niger (Viellot). Chrom. Inform. Serv. 39:17-19. 1985.

11- Patnaik, S.C.; Samanta, M.; Prasad, R.
Chromosome complements and banding patterns in a pelecaniform bird, Phalacrocorax niger. J. Hered. 72: 447-449. 1981.

12- Ryttman, H.; Tegelström, H.; Jansson, H.
G and C banding in four related Laurus species (AVES). Hereditas 91: 143-147. 1979.

13- De Lucca, E. J.; Rocha, G. T.
Citogenética de Aves. Bol. Mus. Para. Emilio Goeldi, sér. Zool. 8(1): 33-68. 1992.

14- Hammar, B.
The karyotypes of thirty-one birds. Hereditas 65: 29-58. 1970.

15- Benirschke, K, Hsu, T. C.
Chromosome atlas: fish, amphibians, reptiles and birds. Aves Folia 15-34. Springer-Verlag, New York. 1973.

16- Shields, G. F.
Comparative avian cytogenetics: a review. Condor 84: 45-58. 1982.

17- Belterman, R. H. R., De Boer, L. E. M.
A miscellaneous collection of bird karyotypes. Genética 83: 17-29. 1990.

Recibido: 28 de Marzo de 2003.
Aprobado: 19 de Mayo de 2004.

Rev. Cienc. Tecnol.
Año 7 / Nº 7a / 2005 / 73-79

LISTA DE LAS ESPECIES DE PECES DEL TRAMO ITUZAINGÓ-IGUAZÚ DEL RÍO ALTO PARANÁ (ARGENTINA).

ROA, B. H.
Facultad Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. "Anexo"
Rivadavia 588. Posadas (3300) Misiones. Argentina. e-mail: hroncati@fceqyn.unam.edu.ar

ABSTRACT

CHECKLIST OF FISH SPECIES FROM ALTO PARANÁ RIVER, ITUZAINGÓ-IGUAZÚ SECTION (ARGENTINE).

This contribution offers a checklist of fishes species from the Alto Paraná River, resulting from captures made during the last 22 years (1978-2001) by routine sampling of the Fishery Biology Project of the *National University of Misiones*, Argentina. In recent years three important regional dams, "Itaipú", "Yacyretá" and "Corpus" were built. Sampling of more than a hundred fish captures in the Ituzaingó (Corrientes)-Iguazú (Misiones), Argentine river section, were made to contribute to ichthyological knowledge. A list of 260 species belonging to 41 fish families and 13 orders were identified. All the specimens conform a regional collection deposited in our Project and part of them are in ILPLA and *Facultad de Ciencias Naturales y Museo (La Plata)* too, whose specialists collaborated in taxonomical studies. The results obtenied allows us to dispose of data for fishery resources evaluation.

KEY WORDS: Fish Resources, Asociations, Alto Paraná, Large Dams.

RESUMEN

El presente trabajo es un listado de especies de peces del Río Alto Paraná capturados durante los últimos 22 años de relevamientos rutinarios realizados por el Proyecto Biología Pesquera Regional de la Universidad Nacional de Misiones (ARGENTINA). En el marco de los estudios medioambientales y los efectos derivados de la construcción de grandes represas, "Itaipú","Yacyretá" y "Corpus". Se llevaron a cabo alrededor de un centenar de campañas ordinarias de pesca experimental, además de aquellas especiales con expertos en taxonomía de peces provenientes del ILPLA y la Facutad de Ciencias Naturales y Museo (La Plata). Los especímenes conforman hoy nuestra colección de referencia regional y parte de estos se hallan en las colecciones de las Instituciones antes mencionadas. En lo que puede considerarse como un corte temporal de 1978 al 2001, se identificaron un total de 260 especies, pertenecientes a 13 órdenes y 41 familias. Los resultados obtenidos permiten disponer de datos para llevar a cabo planes de estudios sobre manejo del recurso íctico.

PALABRAS CLAVES: Recursos ícticos, Asociaciones, Alto Paraná, Grandes Represas.

INTRODUCCIÓN

El río Paraná, por la magnitud de sus caudales, la extensión de su cuenca tributaria y la longitud de su recorrido (4.000 km), constituye uno de los más importantes de Sudamérica. Formado por la confluencia de los ríos Paranayba y Grande, el Paraná posee una cuenca de 2.8 x 10^6 km^2, que incluye toda la parte sudcentral de América del Sur, desde los Andes hasta la Serra do Mar, cerca del Océano Atlántico [1]. Sus caudales varían respetando dos épocas de crecidas y un estiaje invernal, con oscilaciones menores debidas a lluvias locales, una amplitud térmica en el agua de 15º C, con rango entre 15 ºC y 30 ºC, en el marco de un clima subtropical sin estación seca.

El presente trabajo busca comunicar la lista de especies de peces capturados durante 22 años de muestreos en un tramo del Río Paraná que hoy esta cercado por las represas Itaipú (Brasil) y Yacyretá (Argentina).

Desde 1982 la represa Itaipú, disminuyó el recorrido del Río Alto Paraná [2] y modificó el sistema del Paraná Superior en sus condiciones físicas al eliminar del paisaje los Saltos del Guairá y las comunidades preexistentes. Según la intensidad del impacto sobre las especies, estaría dada por la interacción entre las características de la cuenca hidrográfica, del emprendimiento (localización, área, profundidad, circulación del agua) y de la comunidad de peces involucrados [3].

El estado de un sistema es consecuencia de un conjunto de valores tales como las variaciones meteorológicas, hidrométricas, geográficas y antrópicas, expresados en un grupo de especies que, por evolución, han ido desarrollando sus propias moderaciones y equilibrios mutuos.

El curso de agua estudiado se encuentra dentro del Dominio Paranaense y está incluido actualmente en la Ecorregión Ictiológica Misionera [4]. Acorde a esto, el "inventario específico" que aquí se presenta tiene por objeto ofrecer un instrumento útil para comparar cualitativamente las asociaciones de peces en un tramo limitado por estas barreras artificiales con otras, si las circunstancias lo requieren. En este sentido es interesante recordar a Ford [5] quién resalta la importancia de los trabajos de campo para evitar el sesgo de la variabilidad biológica en poblaciones naturales, contrastando con el estudio de organismos en laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las tareas de campo se realizaron en el Río Paraná y algunos de sus tributarios en el tramo entre Puerto Iguazú e Ituzaingó, entre Junio de 1978 y Junio de 2001. Se contó con vehículos y embarcación de la Universidad Nacional de Misiones.

Para la obtención del material en el área de estudio se utilizaron diversas artes de pesca, tales como: redes de espera de distintos tamaños de mallas, espinel con diferentes anzuelos y redes pala para arrastre costero; más el material proveniente de la pesca comercial de subsistencia de la margen derecha del Río Paraná. Cada equipo de redes agalleras fue recorrido en lapsos adecuados al movimiento íctico (alimentación, reproducción, etc.).

El material recogido fue adecuadamente diferenciado por arte de origen para su posterior identificación sistemática y muestreo biológico. La mayor parte fue identificado en campo. Aquellos ejemplares que presentaron inconvenientes en su determinación taxonómica fueron conservados en formol al 10% o refrigerado para su confirmación en laboratorio. En la identificación y el ordenamiento sistemático de los ejemplares se utilizó bibliografía general y específica referida a las distintas entidades taxonómicas [6-24].

El muestreo biológico rutinario consistió en la medición del largo estándar, peso total, altura del cuerpo, determinación del sexo, estadio gonadal macroscópico y observaciones generales (parásitos, anormalidades, contenido estomacal, acumulación de tejido adiposo y demás consideraciones al momento de la captura) [25].

Es importante notar que, para facilitar la lectura de los datos cuando fuera necesario, se consideró y agrupó a los peces en autóctonos, exóticos, por régimen alimentario: iliófagos (influencia humana indirecta, represas, etc.); herbívoros (influencia humana directa, accidentes de transporte de soja); iliófagos naturales (viejas del agua: *Loricariidae*) especies de altas tasas de renovación (autóctonas), tamaño mediano (*Hemiodus orthonops*, *Leporinus obtusidens*) los desplazan en número. Es importante hacer notar que es posible agrupar las especies por tallas a fin de facilitar algunos comentarios relativos a la abundancia y tamaño así se expresa como peces pequeños "mojarras, *piki*", hasta peces medianos y grandes [26].

El trabajo se realizó con la participación de investigadores del Proyecto de Biología Pesquera Regional de la UNaM y el asesoramiento científico del ILPLA, Museo de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de La Plata, INALI, y parte del material colectado se conserva como colección de referencia de la UNaM y las otras instituciones antes mencionadas.

RESULTADOS

En el tiempo y espacio mencionado se colectaron un total de 260 especies agrupadas en 13 ordenes y 41 fami-

lias, con el fin de brindar una aproximación de la taxocenosis para el área y no una descripción de abundancia. Si bien algunas exóticas (carpa, tilapia, trucha arco iris) fueron introducidas con fines de repoblamiento y cultivos en el área, parece que la experiencia no ha sido exitosa de acuerdo al potencial esperado [27] . Dicha información se

Tabla 1: Lista de especies del Río Alto Paraná (1978 - 2001).

CLASE: CHONDRICHTHYES	*Gymnocorimbus ternetzi*
ORDEN: MYLIOBATIFORMES	*Hemigrammus ulrey*
Familia: Potamotrygonidae	*Hyphessobrycon anisitsi*
Potamotrygon brumi	*Hyphessobrycon callistus*
Potamotrygon falkneri	*Hyphessobrycon elachys*
Potamotrygon motoro	*Moenkhausia dichroura*
Potamotrygon sp	*Moenkhausia intermedia*
	Moenkhausia sanctae filomenae
	Tetragonopterus argenteus
CLASE: OSTEICHTHYES	*Tetragonopterus sp*
ORDEN: CLUPEIFORMES	*Cheirodon piaba*
Familia: clupeidae	*Cheirodon interruptus*
Brevoortia pectinata	*Holoshestes pequira*
Pellona flavipinnis	*Odontostilbe microcephala*
Familia: Engraulidae	*Odontostilbe notomelas*
Lycengraulis grossidens	*Odontostilbe hepsetus*
	Odontostilbe paraguayensis
ORDEN: CHARACIFORMES	*Markiana nigripinnis*
Familia: Acestrorhynchidae	*Pseudocorynopoma doriai*
Acestrorhynchus pantaneiro	*Psellogrammus kennedy*
Acestrorhynchus lacustris	*Psellogrammus sp*
Familia: Cynodontidae	**Familia: Serrasalmidae**
Raphiodon vulpinus	*Serrasalmus marginatus*
Familia: Characidae	*Serrasalmus spilopleura*
Asiphonichthys stenopterus	*Pygocentrus nattereri*
Charax gibbosus	*Serrasalmus ternetzi*
Roeboides bonariensis	*Piaractus mesopotamicus*
Roeboides paranensis	*Myleus tiete*
Roeboides prognathus	*Myloplus asterias*
Oligosarcus hepsetus	*Mylossoma duriventris*
Oligosarcus jenynsii	*Mylossoma orbignyanum*
Oligosarcus sp	*Mylossoma paraguayensis*
Cynopotamus argenteus	**Familia: Gasteropelecidae**
Cynopotamus kincaidi	*Thoracocharax stellatus*
Galeocharax humeralis	**Familia: Erythrinidae**
Galeocharax kneri	*Hoplerythrinus unitaeniatus*
Acrobrycon tarijae	*Hoplias malabaricus m.*
Brycon hilarii	**Familia: Lebiasinidae**
Brycon microlepis	*Pyrrhulina australis*
Brycon orbignyanus	*Pyrrhulina melanostoma*
Triportheus paranensis	**Familia: Anostomidae**
Salminus maxillosus	*Leporellus pictus*
Aphyocharax alburnus	*Abramites hypselonotus*
Aphyocharax dentatus	*Schizodon nasutus*
Aphyocharax anisitsi	*Schizodon platae*
Aphyocharax rubropinnis	*Schizodon borellii*
Poptella orbicularis	*Leporinus acutidens*
Astyanax (A) cf. marionae	*Leporinus obtusidens*
Astyanax (A) fasciatus f.	*Leporinus lacustris*
Astyanax (A) lineatus	*Leporinus octofasciatus*
Astyanax (A) scabripinnis	*Leporinus striatus*
Astyanax (A) abramis	*Leporinus sp*
Astyanax (P) bimaculatus b.	**Familia: Characidiidae**
Astyanax (A) eigenmanniorum	*Characidium fasciatum f.*
Astyanax (P) alleni	*Characidium rachovi*
Astyanax paraguayensis	**Familia: Hemiodidae**
Astyanax sp	*Hemiodus orthonops*
Bryconamericus exodon	**Familia: Parodontidae**
Bryconamericus stramineus	*Apareiodon affinis*
Bryconamericus iheringi	*Parodon sp*

Tabla 1: Lista de especies del Río Alto Paraná (1978 - 2001).

Familia: Prochilodontidae
Prochilodus lineatus
Prochilodus scrofa
Familia: Curimatidae
Steindachnerina brevipinna
Steindachnerina biornata
Steindachnerina conspersa
Curimatella dorsalis
Curimata gilberti
Curimata sp.
Potamorhina squamoralevis
Potamorhina sp
Psectrogaster curviventris
Cyphocharax spilotus
Cyphocharax voga
Cyphocharax platanus

ORDEN GYMNOTIFORMES
Familia: Gymnotidae
Gymnotus carapo
Familia: Apteronotidae
Apteronotus albifrons
Apteronotus brasiliensis
Porotergus ellisi
Familia: Rhamphichthyidae
Eigenmannia virescens
Rhamphichthys rostratus
Rhamphichthys hahni
Sternopygus macrurus
Brachypopomus brevirostris
Familia: Engraulidae
Lycengraulis grossidens

ORDEN CYPRINIFORMES
Familia: Cyprinidae
Cyprinus carpio

ORDEN CYPRINODONTIIFORMES
Familia: Poecilidae
Gambusia affinis
Cnesterodon decemmaculatus
Familia: Anablepidae
Jenynsia lineata
Familia: Poeciliidae
Cnesterodon decenmaculatus
Phalloceros caudimaculatus

ORDEN: SILURIFORMES
Familia: Doradidae
Doras eigenmanni
Megalodoras laevigatulus
Oxydoras kneri
Platydoras costatus
Pterodoras granulosus
Rhinodoras dorbignyi
Trachydoras paraguayensis
Anadoras wedelli
Familia: Auchenipteridae
Auchenipterus nuchalis
Auchenipterus nigripinnis
Trachelyopterus striatulus
Trachelyopterus galeatus
Familia: Aspredinidae
Bunocephalus rugosus
Bunocephalus sp
Familia: Pimelodidae
Iheringichthys labrosus
Bergiaria westermanni
Parapimelodus valenciennesi
Pimelodella gracilis
Pimelodella laticeps
Pimelodella griffini
Pimelodella howesi
Pimelodella sp
Pimelodus albicans
Pimelodus argenteus
Pimelodus clarias
Pimelodus ornatus
Pimelodus abscondictus
Pimelodus misteriosus
Pimelodus sp.
Zungaro zungaro
Rhamdia quelen
Luciopimelodus argentinus
Luciopimelodus pati
Megalonema platanum
Brachyplatystoma filamentosum
Hemisorubim platyrhynchos
Paulicea luetkeni
Pseudoplatystoma coruscans
Pseudoplatystoma fasciatum f.
Sorubim lima
Steindachneridion inscripta
Microglanis cottoides
Heptapterus mustelinus
Familia: Ageneiosidae
Ageneiosus brevifilis
Ageneiosus valenciennesi
Ageneiosus dentatus
Familia: Hypophthalmidae
Hypophthalmus edentatus
Hypophthalmus oreomaculatus
Familia: Cetopsidae
Pseudocetopsis gobioides
Familia: Trichomycteridae
Trychomycterus sp.
Familia: Pygidiidae
Homodiaetus maculatus
Paravandelia bertonii
Familia: Callichthyidae
Callichthys callichthys
Corydoras aeneus
Corydoras hastatus
Corydoras paleatus
Corydoras australe
Corydoras sp.
Hoplosternum littorale
Lepthoplosternum pectorale
Familia: Loricariidae
Hypoptopoma inexpectatum
Hypoptopoma gulare
Farlowella amazona
Loricaria cataphracta
Loricaria sp
Loricariichthys anus
Loricariichthys labialis
Loricariichthys maculata
Loricariichthys platymetopon

Tabla 1: Lista de especies del Río Alto Paraná (1978 - 2001).

ORDEN: BELONIFORMES **Familia: Belonidae** *Strongylura microps* *Potamorhaphis eigenmanni* **ORDEN: ATHERINIFORMES** **Familia: Atherinidae** *Odontesthes bonariensis* *Hypostomus albopuntactus* *Hypostomus auroguttatus* *Hypostomus boulengeri* *Hypostomus commersoni* *Hypostomus derbyi* *Hypostomus francisci* *Hypostomus hermanni* *Hypostumus latirostris* *Hypostomus luetkeni* *Hypostomus luteomaculatus* *Hypostomus macrops* *Watawata microstomus* *Hypostomus myersi* *Hypostomus paranensis* *Hypostomus paulinus* *Hypostomus piratatu* *Hypostomus punctactus* *Hypostomus regani* *Hypostomus variipictus* *Hypostumus strigaticeps* *Hypostomus cordovae* *Hypostomus sp.* *Cochliodon cochliodon* *Peckoltia vittata* *Lyposarcus anisitsi* *Megalancistrus parananus* *Hisonotus maculipinnis* **ORDEN: BELONIFORMES** **Familia: Belonidae** *Strongylura microps* *Potamorhaphis eigenmanni*	**ORDEN: ATHERINIFORMES** **Familia: Atherinidae** *Odontesthes bonariensis* *Odontesthes perugiai* **ORDEN: SYNBRANCHIFORMES** **Familia: Synbranchidaes** *Synbranchus marmoratus* **ORDEN: PERCIFORMES** **Familia: Sciaenidae** *Pachyurus bonariensis* *Plagioscion ternetzi* **Familia: Cichlidae** *Apistogramma cormmbrae* *Apistogramma sp* *Cichlasoma dimerus* *Cichlasoma facetum* *Cichlasoma sp.* *Cichla ocellaris* *Cichla orinocensis* *Crenicichla niederleinii* *Crenicichla lepidota* *Crenicichla sp.* *Bujurquina vittata* *Crenicichla semifasciata* *Laetacara dorsigera* *Gymnogeophagus balzanii* *Gymnogeophagus gymnogenys* *Gymnogeophagus sp* **ORDEN: PLEURONECTIFORMES** **Familia: Achiridae** *Catathyridium jenynsi* **ORDEN: LEPIDOSIRENIFORMES** **Familia: Lepidosirenidae** *Lepidosiren paradoxa*

detalla a continuación ordenada en catregorías taxonómicas:

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Enumerar las especies de peces es una de las dificultades más importantes a resolver para contar con un inventario que nos ofrezca un cuadro o estado de una cuenca imbrífera, para que, por ejemplo, con tales datos poder aproximarnos a la riqueza específica e intentar conocer el grado de similitud entre distintas muestras o momentos y así realizar sucesivas aproximaciones, predicciones e hipótesis sobre el grado de complejidad del sistema, o el elenco probable con un repertorio variado. Así es el caso que nos toca presentar del Alto Paraná, una cuenca semicerrada por cataratas naturales ubicadas aguas arriba de Yacyretá, como Iguazú y Uruguaí (Argentina), Monday, Ñacunday (Paraguay), con importantes especies migradoras de variados rangos de densidad.

Podemos decir que esta área constituye una unidad física de distintos aspectos, reconocibles por su composición basáltica, areniscas, arena, limo, arcilla, erosionada y transferida aguas abajo predominando la acumulación sedimentaria, complejo global que justifica la existencia de diferentes hábitat donde se desarrollan múltiples nichos que permiten esperar una variedad específica importante.

La identificación de especies capturadas nos permite aproximarnos al conocimiento de la biodiversidad actual, al mismo tiempo que nos induce a establecer hipótesis sobre las variaciones espacio-temporales de las comunidades ícticas en esta área de estudio.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Hugo López por la lectura crítica del manuscrito. A los especialistas en Sistemática de Peces: Dr. H. López, Dra. Amalia Miquelarena, Dra. Lucila Protogino, Dra. María de las Mercedes Azpelicueta, Dra. Adriana Almirón. A la Entidad Binacional Yacyretá y a la COMIP por el financiamiento de los estudios. A Prefectura Naval Argentina por su desinteresada cooperación con el Proyecto. A nuestro maestro pescador "Mbiguá". Al personal del Programa de Estudios Limnológicos Regionales por su colaboración a través de los años. ●

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- Agostinho, A. A.; Amato de Moraes Vazzoler, A. E.; Thomaz, S. M.
The High River Paraná Basin: Limnological And Ichthyological Aspects p. 59-103. Limnology in Brazil, p. 376. 1995.

2- Bonetto, A. A.; Castello, H. P.
Pesca y Piscicultura en Aguas Continentales de América Latina, Secr. Gral. OEA, Prog. Reg. Des. Cient. Téc. Ser. Biol., Monografía 31: p. 118. 1985.

3- Agostinho, A. A.
Pesquisas, Monitoramento e Manejo da Fauna Aquática em Emprendimentos Hidreléticos. Cuaderno 1. Fundamentos. Seminário sobre Fauna Aquática e o setor elétrico Brasileiro. Comase/Eletrobras/Mme. 1994.

4- López, H. L.; Morgan, C. C.; Montenegro, M. J.
Ichthyological Ecoregions of Argentina. Probiota (Programa para el estudio y uso sustentable de la Biota Austral) SIN 1666-731x. Serie Documentos N°1. p. 70. 2002.

5- Ford, E. B.
The theory of Dominance. Am. Nat., 64: p. 560-566. 1930.

6- Ringuelet, R. A.; Aramburu, R. H.; Aramburu, A. A.
Los Peces Argentinos de Agua Dulce. C.I.C. Pcia. Bs. As. p. 602. 1967.

7- Lopez, H. L.; Menni, R. C.; Miquelarena, A. M.
Lista de los Peces de Agua Dulce. Contribución N° 310 del ILPLA y N° 69 del Laboratorio de Ictiología MLP. p. 50. 1987.

8- Gery, J. J.
Characoids of the world. Tfh Publications. P. 672. 1977

9- Gery, J.; Mahnert, V. y Dlouhy, C.
Poissons Characoides non Characidae du Paraguay (Pisces, Ostariophysi). Revue Suisse Zool. 94 (2): p. 357-464. 1987.

10- Azpelicueta, M. M.; Braga, L.
Los Curimátidos en Argentina. Programa De Agua Dulce Profadu (CONICET) 40 (1): p. 55.1991.

11- Braga, L.
Los Anostomidae (Pisces, Characiformes) de Argentina. Programa De Agua Dulce Profadu (CONICET) 40 (3): p. 61. 1993.

12- Lopez, H.; Miquelarena, A.
Los Hypostomatinae (Pisces: Loricaridae) de Argentina. Programa de Agua Dulce Profadu (CONICET) 40 (2): p. 64.1991.

13- Azpelicueta, M. M.
Los Diplomístidos en Argentina (Siluriformes, Diplomystidae). Programa de Agua Dulce Profadu (CONICET) 40 (4): p. 49. 1994.

14- Azpelicueta, M. M.
*A New specie of Pimelodus (Siluriformes: Pimelodidae) from the Paraguay and lower Paraná Rivers.*Neotrópica 44: (111-112): p. 87-94. 1998.

15- Kullander, S. O.
A *Phylogeny and Clasification of the South American Cichlidae (Teleostei: Perciformes).* En: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Edited By Luiz R. Malabarba, Roberto E. Reis, Richard P. Vari, Zilda Margarete S. De Lucena, Carlos Alberto S. Lucena- Porto Alegre- Edipucrs, 1998 X, p. 603. 1998.

16- Dyer, B.
Phylogenetic Systematics and Historical Biogeography of the Neotropical Silverside family Atherinopsidae (Teleostei: Atheriniformes). En: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Edited By Luiz R. Malabarba, Roberto E. Reis, Richard P. Vari, Zilda Margarete S. De Lucena, Carlos Alberto S. Lucena- Porto Alegre- Edipucrs, 1998 X,p. 603. 1998

17- Reis, R. E.
Systematics, Biogeography, and the Fossil Records of the Callichthydae: A Review Of The Available Data. En: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Edited By Luiz R. Malabarba, Roberto E. Reis, Richard P. Vari, Zilda Margarete S. De Lucena, Carlos Alberto S. Lucena- Porto Alegre- Edipucrs, 1998 X, p. 603. 1998.

18- Malabarba, L. R.
Monophyly of the Cheirodontinae, Characters and major clades (Ostariophysi:Characidae). En: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Edited By Luiz R. Malabarba, Roberto E. Reis, Richard P. Vari, Zilda Margarete S. De Lucena, Carlos Alberto S. Lucena- Porto Alegre- Edipucrs, 1998 X, p. 603. 1998.

19- Vari, R.
Systematics of the Neotropical Characiform genus Potamorhina (Pisces: Ostariophysi). Smithsonian Contributions To Zoology. Washington, D.C.400: p. 1-43.1984

20- Vari, R.
Systematics of the Neotropical Characiform genus Steindachnerina Fowler (Pisces: Ostariophysi). Smithsonian Contributions To Zoology. Washington, D.C.507: p.1-118.1991

21- Vari, R.
Systematics of the Neotropical Characiform genus Curimatella Eigenmann and Eigenmann (Pisces: Ostariophysi), with sumary comments on the Curimatidae. Smithsonian Contributions To Zoology. Washington, D.C. 533: p. 1-48.1992a

22- Vari, R.
Systematics of the Neotropical Characiform genus Chyphocharax Fowler (Pisces: Ostariophysi). Smithsonian Contributions to Zoology. Washington, D.C. 529: p. 1-137.1992b

23- Vari, R.
The Curimatidae, a lowland Neotropical Fish family (Pisces: Characiformes); Distribution, Endemism, and Phylogenetic Biogeography. Reprinted from W.R.Heyer And P. E. Vanzolini, Editors. Proceedings of a Workshop on Neotropical. Distribution patterns. Academia Brasileira de Ciencias, Río de Janeiro. p. 343-377. 1998

24- Weber, C.
Guía de Campo para la Identificación Taxonómica de especies pertenecientes a la Subfamilia Hypostominae. Comunicación Personal. 1986

25- C.O.M.I.P. (Comisión Mixta Argentino-Paraguaya del Río Paraná).
Estudios Ambientales. Anexo II: Comunidades Icticas, Biología Pesquera. Migraciones de Peces del Río Alto Paraná, entre Progresivas Km.1595 Y Km.1924. Proyecto de Biología Pesquera Regional. Universidad Nacional De Misiones. 1987

26- Roa, B. H.; De Lucía, A.; Aichino, D.
Evaluación de Recursos Pesqueros Aguas Arriba. Informe Final. Convenio VII, EBY – UnaM p. 131. 2003.

27- Garcia, J. O.
Introducción de Trucha Arco Iris (Salmo gairdnieri) en la Pcia. de Misiones. III Jornadas de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Subsecretaría de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Misiones. Posadas, Misiones. 1982.

Recibido: 27 de Febrero de 2004.
Aprobado: 18 de Mayo de 2005.

Rev. Cienc. Tecnol.
Año 7 / Nº 7a / 2005 / 80-86

MÉTODO PARA EL AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ADN DE *MICROCYSTIS* SPP.

[1]Llano, Victor M. / [1]Meichtry, Norma R. / [2]Tonon, Sergio A.
[1]Laboratorio de Plancton y Bentos. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. UNaM. Rivadavia 2370. Posadas, Misiones, (3300) Argentina. (vmllano@yahoo.com)
[2]Laboratorio de Biología Molecular Aplicada. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. UNaM. Félix de Azara 1552. Posadas, Misiones, (3300) Argentina. (labimap@mbf.unam.edu.ar)

ABSTRACT

METHOD FOR ISOLATION AND PURIFICATION OF DNA FROM *MICROCYSTIS* SPP.
Alga blooms disrupt the normal aquatic equilibrium, generating low quality waters with unpleasant smells and flavors. Furthermore, some species are capable of generating toxins dangerous to animals and humans. The study of bloom´s genetic diversity is of the utmost importance in order to identify the different cyanobacterium genera involved, mainly focusing in toxic individuals. Our objective is to develop an effective and fast method for the isolation and purification of genomic DNA from *Microcystis* spp., a model of toxic cyanobacteria. The proposed method is sufficient for obtaining good quantity and quality genomic DNA suitable for molecular genotypification.

KEY WORDS: Cyanobacteria, DNA isolation, *Microcystis* spp., blooms.

RESUMEN

Las floraciones de cianobacterias (blooms) alteran el equilibrio acuático, afectan otros organismos, y degradan la calidad del agua por la producción de olor y sabor desagradable. A estos, se le puede sumar el efecto aun más grave de que ciertos géneros son capaces de producir toxinas que afectan a animales y humanos. Debido a la alta dinámica de las floraciones en ecosistemas eutrofizados, es importante el estudio de su diversidad genética a fin de identificar las distintas poblaciones participantes. El objetivo del presente trabajo ha sido la elaboración de un protocolo de trabajo eficaz y rápido que sea óptimo para la extracción y purificación de ADN de *Microcystis* spp. como uno de los géneros más representativos de las cianobacterias tóxicas. La cantidad y pureza del ADN obtenido por el mismo se encuentra en los rangos aceptables para la mayoría de las técnicas moleculares de genotipificación.

PALABRAS CLAVES: Cianobacteria, aislamiento de ADN, *Microcystis* spp., floración.

INTRODUCCION

Las cianobacterias o cianofíceas (algas verdes-azules), son organismos procariotas que pueden encontrarse en forma unicelular estricta, en agregados celulares o en filamentos, cuyos pigmentos no están organizados en cromatóforos [1, 2]. Estos organismos dependen del proceso fotosintético para la obtención de energía, y se estima se habrían originado hace unos 3500 millones de años.

Su facilidad de crecimiento favorece su desarrollo tanto en el suelo como en el medio acuático, preferentemente en ambientes dulceacuícolas, de aguas alcalinas o neutras, con pH superior a 7,5, temperaturas por encima de 25°C y una alta concentración de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo.

La creciente eutrofización de los ambientes acuáticos puede favorecer su proliferación masiva o floración (Harmful Algae *Blooms* -HABs- o simplemente "*Blooms*"). Estos *blooms* pueden ser detectados a simple vista o en otros casos no percibirse, encontrándose dispersos en todo el volumen de agua o localizarse a cierta profundidad formando estratos de muy poco espesor [3].

El ecosistema acuático se ve alterado por los *blooms* de cianobacterias, principalmente por efecto del sombreado. Este inhibe la capacidad fotosintética de otras algas y afecta a los animales del entorno disminuyendo la disponibilidad de oxígeno disuelto para la respiración, y degradando la calidad del agua por producción de olores y sabores desagradables. Pero el efecto más grave, es la potencialidad de ciertos géneros para la producción de toxinas, que son capaces de provocar síntomas agudos y crónicos luego del contacto o la ingestión por animales y el hombre [4, 5, 6].

La toxicidad de los *blooms* de cianobacterias está asociada, entre otros factores, al tamaño de la floración y a su complejidad, dado que algunas especies pueden presentar en una misma floración cepas tóxicas con diferentes rangos de toxicidad y cepas inocuas. La especie colonial *Microcystis aeruginosa* Kütz. (Figura 1 a, b), es una de las más peligrosas debido a su capacidad de biosintetizar una potente toxina, la microcistina. La concentración de esta toxina puede variar o inhibirse en respuesta a cambios ambientales, por lo cual es recomendable suponer que el *bloom* de *Microcystis* es siempre potencialmente tóxico [7].

Debido a la alta dinámica de las floraciones de cianobacterias en ecosistemas eutrofizados (géneros involucrados, capacidad toxicogénica, cantidad relativa, etc.) es importante estudiar su diversidad genética a fin de identificar las distintas poblaciones participantes. En este contexto, las técnicas moleculares son herramientas de

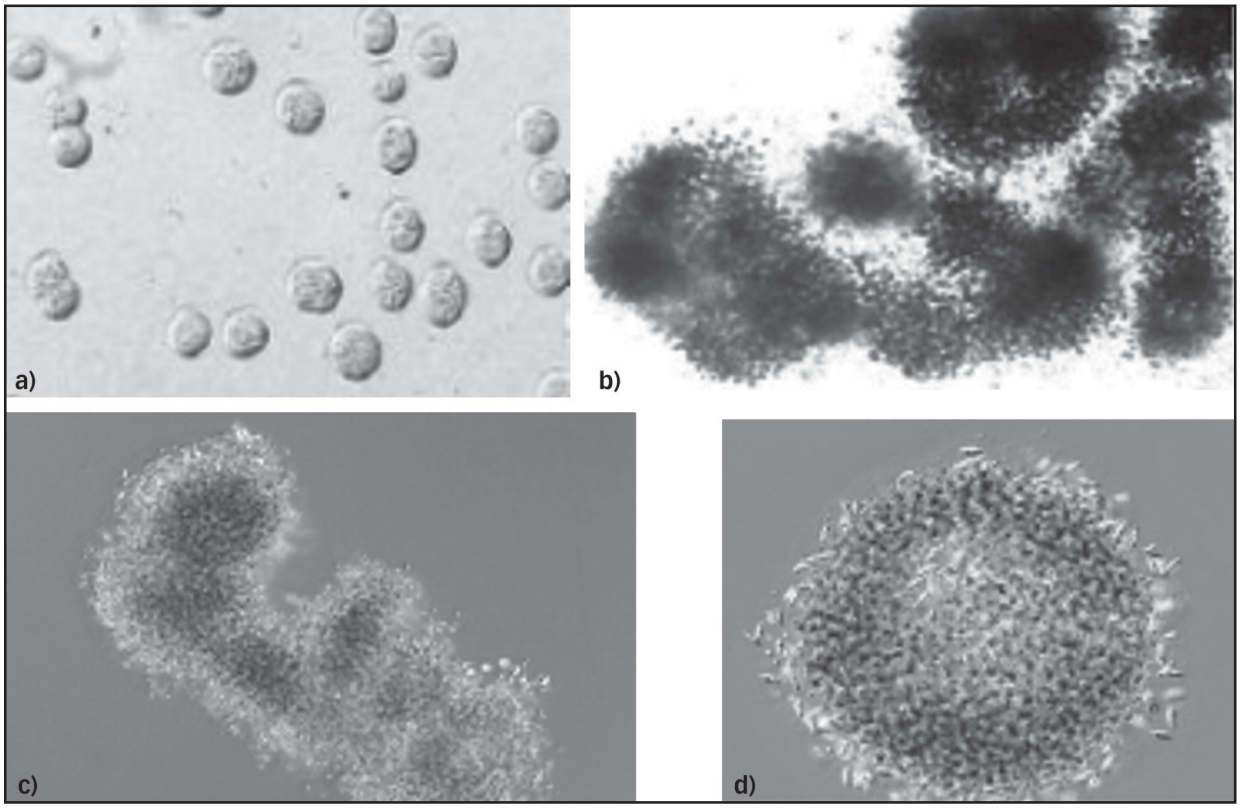

FIGURA 1: *Microcystis aeruginosa,* a) Detalle de las células 1000x, b) Colonia de *Microcystis aeruginosa* 400x, c) y d) Colonias con mucílago evidente 400x.

gran ayuda para la clasificación taxonómica de las especies presentes, debido a que este grupo de algas posee una gran plasticidad fenotípica [8, 9]. Dentro de la variedad de técnicas moleculares actualmente disponibles para la genotipificación de organismos, el requerimiento de ADN de una cierta calidad y pureza es un requisito indispensable. Para ello, es necesario el desarrollo de metodologías de extracción y purificación de ADN genómico que contemplen las particularidades de los organismos bajo análisis.

En el caso de las cianobacterias, el mucílago y la pared celular (figura 1 c, d) que las rodean son un importante impedimento para el aislamiento de ADN de buena calidad. Algunos grupos han logrado buenos resultados, en cuanto a la ruptura de paredes de algas verdes azules, mediante la utilización de detergentes tales como DTAB o CTAB [10, 11]. Se han informado protocolos más simples, pero estos solo son aplicables a unas pocas especies [12, 13]. Es por ello que sigue siendo necesario el desarrollo de metodologías rápidas y confiables para la extracción y purificación de genoma de cianobacterias.

El objetivo del presente trabajo ha sido la elaboración de un protocolo eficaz y rápido para la extracción y purificación de ADN genómico de *Microcystis* spp. como uno de los géneros más representativos de las cianobacterias tóxicas.

Se espera que este protocolo pueda extenderse a otras especies, eventualmente aplicando pequeñas modificaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material fitoplanctónico fue extraído a nivel subsuperficial, filtrando 100 litros de agua a través de una red de plancton de 20 µm de abertura de malla, (Figura 2) y depositado en frascos de 250 ml de capacidad (Figura 3). Las muestras se obtuvieron en diferentes estaciones de colecta sobre el cauce principal del río Paraná, aguas arriba y aguas debajo de la presa Yacyretá (27° 28´ S 56° 44´ O) y un tributario (arroyo Itaembé), en el primer semestre del 2004.

Una de las características del género *Microcystis* es la de poseer vesículas de gas y formar en la muestra acuosa una capa superficial. Aprovechando esta cualidad, con la ayuda de una pipeta Pasteur se absorbió dicha capa y se filtró el mayor volumen posible empleando un matraz quitasato de 250 ml y trampa de agua. El filtro utilizado fue de 20 µm de abertura de malla. El filtrado se desecó en estufa durante 40 minutos a 37 °C hasta eliminación total de la humedad (Figura 4). Una alternativa que se probó fue almacenar el material filtrado a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

El material empleado en los procesos de aislamiento y purificación de ADN genómico (muestra analítica) correspondió al raspado de la materia orgánica desecada sobre los filtros, en una cantidad equivalente a un cuarto del volumen de un tubo eppendorf de 1,5 ml.

A partir de las muestras analíticas, se desarrollaron tres etapas generales para el protocolo de extracción y purificación de ADN genómico:

a) Lisis celular

En esta etapa se probaron tanto procedimientos mecánicos como químicos, utilizándose: mortero, perlas de

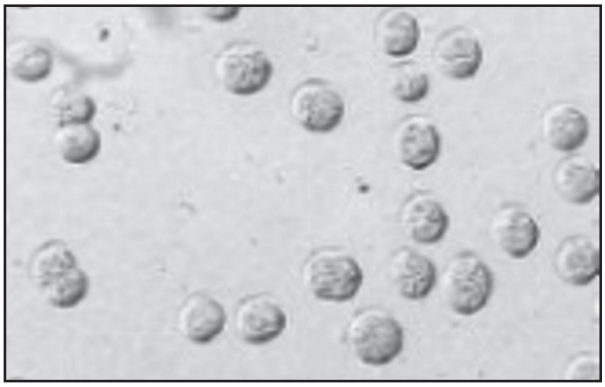

FIGURA 2: Filtrado de agua a través de una red de plancton.

Figura 3: Muestra filtrada en frasco de 250 ml.

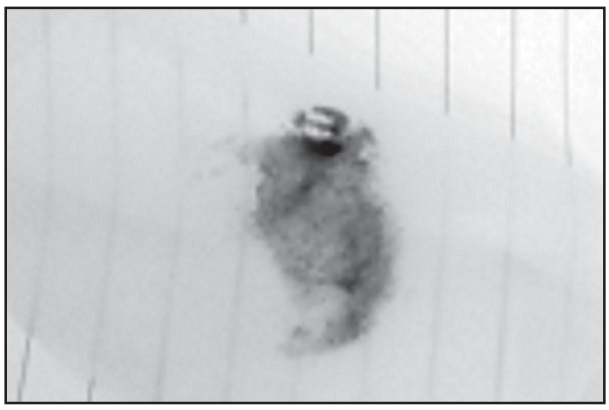

Figura 4: Filtrado en malla de 20 µm de abertura.

plomo, N_2 líquido, CTAB 2X (bromuro de cetrimetil amonio), lisozima, proteinasa K.

b) Purificación de ADN

Se realizaron lavados con cloroformo: alcohol isoamílico, fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, por separado o bien en forma conjunta.

c) Precipitación del ADN

Se probaron tanto isopropanol puro como NaCl en isopropanol.

La cuantificación y pureza del ADN obtenido fue analizada por espectrofotometría empleando un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV-1601PC, de acuerdo a Berger [14].

Materiales

Se emplearon los siguientes reactivos y drogas para el análisis

- N_2 líquido
- Solución de extracción CTAB (Bromuro de cetrimetil amonio).
  - -2% CTAB
  - -1,4 M NaCl
  - - 20mM EDTA
  - -Tris-HCl (pH 8)
  - -1% PVP (polivinilpirrolidona, 40000 D.)
  - -H_2O destilada
- Stock de fosfato de potasio monobásico. Se disolvió 136 mg de fosfato de potasio monobásico en 10 ml de agua destilada.
- Stock de lisozima (USBiological) 5mg/ml, (para 30 reacciones). Se guardó a –20 °C. 5 mg de lisozima se disolvieron en 1 ml de stock de fosfato de potasio monobásico.
- Se tomó 30 µl de este stock y se agregó 270 µl de agua destilada.
- 1 M Tris-HCl (pH 8). Se disolvieron 3,63 g de Tris en 15 ml de agua destilada, se verificó que el pH bajara hasta 8 con ácido clorhídrico fumante, luego se agregó agua destilada hasta llegar a 30 ml.
- Stock NaCl 5 M. Se disolvieron 1,46 g de NaCl en agua destilada y se llevaron a 5 ml.
- TESM.
  - 50 mM Tris-HCl (pH 8)
  - 100 mM NaCl
  - 5 mM EDTA (pH 7)

A 20 ml de agua destilada se agregó 2 ml de de 1 M Tris-HCl (pH 8) y 0,8 ml de solución stock de NaCl 5 M; luego se agregó agua destilada hasta llegar a 40 ml.

- Stock SDS 10% en TESM.
  - 1g de SDS en 10 ml de TESM
- Solución de SDS/proteinasa K, (para 6 muestras).
  - 720 µl de stock SDS 10% en TESM
  - 480 µl TESM
  - 360 µg proteinasa K
- 24:1 cloroformo: alcohol isoamílico.
- 25:24:1 fenol: cloroformo: alcohol isoamílico.
- Isopropanol.
- 5 M NaCl en isopropanol.
- Se disolvieron 5,84 g de NaCl en 20 ml de isopropanol.
- 70% etanol.

Como primera aproximación metodológica se implementó para la lisis celular un macerado de las muestras analíticas en N_2 líquido, empleando en primera instancia mortero a temperatura ambiente, luego perlas de plomo incorporadas al macerado y finalmente solución de extracción CTAB. La purificación constó únicamente de dos lavados en volúmenes iguales con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), recuperándose la capa acuosa por centrifugación y precipitándose los ácidos nucleicos con isopropanol puro a -20ºC y posterior lavado con etanol 70% a temperatura ambiente. Los resultados de esta primera estrategia se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Valores de absorbancia, cantidad e índice de pureza obtenidos empleando la primer estrategia metodológica.

Muestra analítica	Absorbancia 260 nm	Absorbancia 280 nm	[ADN]total (ng/µl)	Indice de Pureza
Río Paraná, Itá-Ibaté.05/03/04	0,057	0,052	57	1,1
Arroyo Itaembé.04/03/04	0,213	0,267	213	0,8
Río Paraná, frente a desemb. del arroyo Yabebiry. 04/03/04	0,150	0,184	150	0,8
Río Paraná, embalse (E10MI). 25/02/04	0,139	0,171	139	0,8

A los efectos de incrementar la pureza del ADN obtenido, en una segunda etapa del trabajo, se modificó el proceso de lisis celular incorporando posteriormente a la maceración con N_2 líquido en mortero, una digestión enzimática con lisozima y proteinasa K. Además, para la purificación de los ácidos nucleicos se probaron dos alternativas:

a) dos lavados con cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 y dos lavados con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1 (muestra 1, 2, 3 y 4).

b) cuatro lavados consecutivos con volúmenes iguales de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 (muestra 5 y 6). Finalmente, la precipitación se realizó con NaCl en isopropanol a -20ºC y un lavado final con etanol 70%. Los resultados de esta segunda estrategia se presentan en la Tabla 2.

Finalmente, se probó en la etapa de purificación el empleo de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1 como única solución de lavado en dos oportunidades, manteniendo el resto de los parámetros sin modificación con respecto a la segunda estrategia. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos demostraron la factibilidad de extraer ADN en cantidades suficientes pero sin alcanzar la pureza requerida para la mayoría de las técnicas moleculares de genotipificación (>1,3 y < 1,9) [14].

Estas modificaciones técnicas permitieron recuperar mayores cantidades de ácidos nucleicos, sin embargo, la pureza de los preparados no mostró cambios, siendo aún inferior a lo deseable.

Tabla 2: Valores de absorbancia, cantidad e índice de pureza obtenidos empleando la segunda estrategia metodológica.

Muestra analítica	Absorbancia 260 nm	Absorbancia 280 nm	[ADN] total (ng/µl)	Masa total (µg)	Indice de Pureza
1 Río Paraná, Rincón Santa María. 08/03/04	0,221	0,301	553	22	0,7
2 Río Paraná, Toma de agua Ituzaingó. 10/03/04	0,094	0,110	235	9	0,9
3 Río Paraná, Rincón Santa María. 08/03/04	0,169	0,179	424	17	0,9
4 Río Paraná, embalse (E10MI). 16/03/04	0,290	0,267	725	29	1,1
5 Río Paraná, Toma de agua Ituzaingó. 10/03/04	0,284	0,290	710	28	1
6 Río Paraná, Toma de agua Ayolas. 17/03/04	0,173	0,172	433	17	1

Tabla 3: Valores de absorbancia, cantidad e índice de pureza obtenidos empleando la tercera estrategia metodológica.

Muestra analítica	Absorbancia 260 nm	Absorbancia 280 nm	[ADN] total (ng/µl)	Masa total (µg)	Indice de Pureza
Río Paraná, Toma de agua Ituzaingó. 05/05/04	0,372	0,296	930	28	1,3
Río Paraná, Rincón Santa María. 05/05/04	0,365	0,284	914	37	1,3
Río Paraná, embalse (E4C). 16/03/04	0,532	0,393	1330	40	1,4
Río Paraná, embalse (E4MD). 16/03/04	0,639	0,458	1597	48	1,4
Río Paraná, embalse (E9MD). 16/03/04	0,565	0,447	1412	57	1,3
Río Paraná, embalse (E10MD). 16/03/04	0,468	0,318	1168	35	1,5

El cambio introducido en esta tercera estrategia permitió alcanzar niveles de pureza compatibles con la mayoría de las técnicas moleculares en uso rutinario.

De esta manera se estableció como protocolo final el siguiente procedimiento:

Lisis de células

Se filtró el máximo volumen posible del concentrado de algas con malla de 20 µm, dependiendo del volumen que se obtuvo de la filtración de 100 litros.

El filtrado se secó en estufa a 37°C durante 30 minutos, hasta eliminación total de la humedad.

Se rescató el filtrado y se maceró con N_2 líquido en mortero a temperatura ambiente.

El mortero se lavó con 700 µl de TESM y se colocó todo el volumen en un tubo de 2 ml.

Se agregó 300 µl de una dilución 1/5 de stock de lisozima y se incubó a 37°C durante 60 minutos.

Se agregaron 200 µl de solución SDS/proteinasa K (50 µg/ml) y se incubó a 55°C durante toda la noche.

Luego se inactivó la proteinasa K por ebullición durante 10 minutos.

Purificación del ADN

Se enfrió la muestra a temperatura ambiente durante 2 minutos.

Se agregó 500 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico y se invirtió el tubo varias veces hasta que se formó una emulsión. Este paso se realizó con cuidado para evitar dañar el ADN.

Se centrifugó la muestra por 5 minutos a 13000 x g.

La capa acuosa se transfirió a un tubo nuevo teniendo cuidado de no absorber la interfase

Si el sobrenadante quedara sucio, se debe proceder a realizar tantos pasos de extracción fenol: cloroformo: alcohol isoamílico sean necesarios. En nuestro protocolo, dos lavados fueron suficientes. Tener en cuenta que cada 2 lavados se pierde aproximadamente un 20 % de muestra.

Precipitación del ADN

Se agregó a la capa acuosa NaCl en isopropanol frío. Se invirtió el tubo varias veces y se llevó a –20 °C, durante al menos 30 minutos.

Se centrifugó por 10 minutos a 13000 x g. Con cuidado se eliminó el sobrenadante invirtiendo el tubo.

Se agregaron 1000 µl de etanol al 70 %.

Luego se centrifugó por 10 minutos a 13000 x g y se eliminó por inversión el etanol teniendo cuidado de no perder el precipitado. Se secó el precipitado dejando el tubo destapado durante unos minutos.

El precipitado de ADN se resuspendió en 50 µl de agua destilada.

La muestra se conservó a –20 °C.

CONCLUSIÓN

El empleo de esta metodología de extracción y purificación de ADN de *Microcystis* permite la obtención de material en cantidad suficiente y con la pureza adecuada para realizar metodologías de genotipificación molecular. El mismo ha sido empleado para la puesta a punto de RAPDs (resultado no mostrado), obteniéndose patrones de bandeo interpretables, coincidiendo con la pureza genómica requerida.

El empleo de esta metodología permitirá desarrollar técnicas para el análisis rápido y confiable de géneros involucrados en "blooms" y, por lo tanto, la detección de aquellos potencialmente asociados a la biosíntesis de toxinas peligrosas, con la consecuente alerta temprana disparadora de acciones tendientes a minimizar la problemática ecológica y de salud en áreas de alto impacto natural. ●

REFERENCIAS

1. Geitler, L.
Cyanophyceae in Rabenhorst´s Kryptogamen-Flora, Akad. Verlagseges, Leipzig. 14: p. 1-1196. 1932.

2. Bourrelly, P.
Les algues d´eau douce III, Editor. Boubée & Cie, Paris. p. 1-512. 1981.

3. Pizzolon, L.; Tracanna, H.; Silva, H.; Prosperi, C.; de Fabricius, A.; García de Emiliani, M.; Otaegui, A.; Amalfi, M.; Labollita, H.; Santinelli, N.; Sastre, V.
Inventario de ambientes dulceacuícolas de la Argentina con riesgo de envenenamiento por cianobacterias, Ingeniería Sanitaria y Ambiental 33: 26-34. 1997.

4. Paerl, H.
Growth and reproductive strategies of freshwater blue-green algae (cyanobacteria) in Growth and Reproductive Strategies of Freshwater Phytoplankton, Editor. Cambridge University Press, Cambridge. p. 261-315. 1991.

5. Carmichael, W.
Liver failure and human deaths at a haemodialysis centre in Brazil: microcystins as a major contributing factor, Harmful Algae News 15-21. 1996.

6. Vasconcelos, V.
Cyanobacteria toxins: diversity and ecological effects, Limnetica 20: 45-58. 2001.

7. García de Emiliani, M.; Devercelli, M.
Fitoplancton y floración de cianobacterias en el Lago Parque General Belgrano en Protección y restauración del Lago del Parque del Sur, Municipalidad de Santa Fe y CERIDE, Santa Fe. Cap. IV, p. 1-14. 2002.

8. Otsuka, S.; Suda, L.; Matsumoto, S.; Watanabe, M.
Morphological variability of colonies of Microcystis morphospecies in culture, J. Gen. Appl. Microbiol. 46: 39-50. 2000.

9. Bittencourt-Oliveira, M.; Oliveira, M.; Yunes, J.
O uso de marcadores moleculares para avaliar a diversidade genética, Biotecnologia Ciencia E Desenvolvimiento. 23: 44-47. 2001.

10. Fiore, M.; Moon, D.; Tsai, S.; Lee, H.; Trevors, J.
Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria, J. Micro. Meth. 39: 159-169. 2000.

11. Fawley, M.; Fawley, K.
A simple and rapid technique for the isolation of DNA from microalgae, J. Phycol. 40: 223-225. 2004.

12. La Claire II, J.; Herrin, D.
Co-isolation of high-quality DNA and RNA from coenocytic green algae, Plant. Molec. Biol. Rep. 15: 263-272. 1997.

13. Wu, X.; Zarka, A.; Boussiba, S.
A simplified Protocol for Preparing DNA from Filamentous Cyanobacteria, Plant Molec. Biol. Rep. 18: 385-392. 2000.

14. Berger, S.; Kimmel, A.
Guide to molecular cloning techniques, Methods in Enzymology. Vol. 152, Academic Press, New York. p. 49-55. 1987.

Recibido: 10 de Diciembre de 2004.
Aprobado: 18 de Mayo de 2005.

Rev. Cienc. Tecnol.
Año 7 / Nº 7a / 2005 / 87-94

DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS HERPES SIMPLE EN MUESTRAS AÓRTICAS DE PACIENTES CON ATEROSCLEROSIS CORONARIA

[1]D'Errico, R. A. / [2]Gotti, A. / [2]Gómez Moreno, J. / [1]Tonon, S. A.
[1]Laboratorio de Biología Molecular Aplicada; Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, U.Na.M. Av. Mariano Moreno 1375, Posadas, Misiones (3300), Argentina.
[2]Fundación Cardiovascular de Misiones. Sgo. del Estero 2369, Posadas, Misiones (3300).
E-mail: labimap@escenf.unam.edu.ar

ABSTRACT

APPLICATION OF A MOLECULAR METHODOLOGY FOR THE DETECTION OF HERPES SIMPLEX VIRUS 1 AND 2 GENOME IN THE ANALYSIS OF AORTIC TISSUES FROM PACIENTS SUFFERING CORONARY ATHEROSCLEROSIS

Herpesviridae viruses have been proposed as potential risk factors for atherosclerosis since it was demonstrated that Marek's disease virus (MDV), an avian herpesvirus, could promote the development of atherosclerotic lesions in aortas of infected chickens. Experiments conducent to demonstrate the putative link between viral infection and atherosclerosis included -seroepidemiological studies, -animal models, and –*in vitro* studies. However, the obtained results are still controversial, banning still a definitive conclusion. One important issue regarding this controversy is that evidence of the actual presence of the virus at the site is scarce, although other mechanisms that do not require the presence of the virus in the vessel wall could exist. In this work, a molecular technique for the specific and sensitive detection of Herpes Simplex Virus (HSV) 1 and 2 genome in human tissue, based in nucleic acid amplification, is employed to test the presence of HSV-1 and HSV-2 in aortic tissue from thirty one severe atherosclerotic patients, who underwent coronary by-pass surgery. All the samples were negative by means of this experimental approach

KEY WORDS: HSV; atherosclerosis; molecular detection.

RESUMEN

Virus de la familia *Herpesviridae* han sido implicados como potenciales factores de riesgo en el desarrollo de la ateroesclerosis coronaria. Sin embargo, diversos trabajos han arrojado resultados controversiales, por lo que aun no se ha podido arribar a una conclusión definitiva. Un punto importante en esta controversia radica en que existe muy poca evidencia directa que demuestre la presencia real del virus en el lugar de la lesión; sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que este agente actúe a través de mecanismos indirectos sin presencia del mismo en la pared vascular. En este trabajo se aplicó una técnica molecular para la detección tipo específica de Virus Herpes Simple 1 y 2 a partir de tejidos humanos. Con la misma se evaluó la potencial presencia de estos virus en tejidos aórticos provenientes de treinta y un pacientes con aterosclerosis coronaria severa. Las muestras analizadas fueron negativas.

PALABRAS CLAVES: HSV; aterosclerosis; detección molecular.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en la Argentina, y dentro de este conjunto de enfermedades, la aterosclerosis coronaria es la principal causa de infarto de miocardio [1, 2]. La formación de la placa aterosclerótica es un proceso complejo en el cual intervienen diversos tipos celulares y que involucra la interacción tanto de factores genéticos como ambientales. Actualmente se considera que la aterogénesis se produce básicamente por una sucesión de eventos inflamatorios, los cuales son inducidos inicialmente como una respuesta a un daño directo de la pared vascular.

En trabajos conducentes a dilucidar el posible mecanismo responsable del inicio de la lesión aterosclerótica, se identificaron diversos factores de riesgo; destacándose la hipercolesterolemia, el tabaquismo, la hipertensión y la diabetes. Sin embargo, hasta un 50% de los pacientes con aterosclerosis carecen de estos factores de riesgo "clásicos", lo que indicaría que los mismos no son suficientes para su desarrollo. Así, se sugiere que existirían otros factores sinérgicos involucrados que aún no han sido reconocidos, dentro de los cuales se encontrarían los agentes infecciosos [3, 4].

Los virus de la familia *Herpesviridae* han sido relacionados con la aterosclerosis como un posible iniciador de la lesión en la pared vascular a partir de estudios pioneros realizados por Fabricant *et al.* en la década del '70 [5, 6]. En estos trabajos, pollos infectados con el virus de la enfermedad de Marek (MDK), un herpesvirus aviano, desarrollaban lesiones en la arteria aorta similares histológicamente a las lesiones ateroscleróticas en humanos. Esto sucedía independientemente de si se les suministraba una dieta normal o hipercolesterolémica. Además, se encontraron antígenos virales específicos en las células musculares lisas de la pared aórtica y la inmunización previa de los pollos con el herpesvirus de pavo era capaz de prevenir a los mismos de la formación de la lesión [6, 7].

Otro modelo animal desarrollado para el estudio de la inducción de aterosclerosis por un herpesvirus, fue el de una línea de ratones con una deleción completa del gen ApoE (ApoE -/-) [8]. Éstos presentan altos niveles de colesterol incluso con dietas normales, y desarrollan ateromas espontáneamente. Para establecer la posible relación entre la infección herpesviral y la aterosclerosis, algunos ratones fueron infectados con un herpesvirus murino (MHV-68) capaz de establecer una infección latente. Los ratones ApoE -/- infectados desarrollaban lesiones ateroscleróticas mas rápidamente que aquellos no infectados y, al final del período de estudio, las lesiones de los primeros eran considerablemente más extensas. Además, pudo detectarse la presencia de ARNm viral en las arterias aortas de los ratones a los 5 días posinfección. Sin embargo, en un trabajo similar publicado posteriormente, la infección de ratones de la misma línea con el HSV tipo 1, a pesar de producir una respuesta inmune sistémica comparable a la provocada por la infección por MHV-68, *no conducía* a una aceleración del proceso aterogénico [9]. Tampoco pudo detectarse ARNm viral en el tejido aórtico de los ratones infectados, lo que indicaría que el montaje de una respuesta inmune no es suficiente para conducir al desarrollo de lesiones vasculares y probablemente sea necesaria la presencia real del virus en la pared vascular para poder causar un efecto directo.

Por otro lado, trabajos con líneas celulares humanas indican que el HSV es capaz de infectar células endoteliales [10-14] y células musculares lisas [15-17] provenientes de la pared vascular, confirmando que posee un tropismo por los tipos celulares que forman la pared arterial. En estos estudios, además, se observó que la infección por HSV provocaba una serie de cambios en el fenotipo celular que se pueden corresponder con características propias de la lesión aterosclerótica.

Entre estos podemos citar:

-un aumento en la expresión de receptores para el fragmento Fc de las IgG y para el componente C3 del complemento en las células endoteliales [10];

-un incremento en la adhesión de granulocitos y monocitos al endotelio [12, 14];

-un cambio en la actividad del endotelio que deja de tener una actividad anticoagulante para ser procoagulante, con un incremento en la generación de trombina y en la unión de plaquetas [11]; y

-un cambio en el metabolismo lipídico de las células musculares lisas, lo que provoca un aumento en la concentración de ésteres de colesterol y triglicéridos debido a una disminución en la actividad de las hidrolasas de ésteres de colesterol citoplasmáticas y lisosomales [16, 18, 19].

Estos resultados obtenidos *in vitro* condujeron a la realización de estudios seroepidemiológicos para establecer la posible relación entre la infección por HSV y el riesgo de contraer una enfermedad coronaria arterial.

Hasta la actualidad se han obtenido resultados contradictorios, principalmente en el análisis de los títulos de anticuerpos anti-HSV en poblaciones de pacientes con una enfermedad coronaria conocida [20, 3, 4]. Más aun, debido a que estos estudios son de corte transversal, no puede establecerse claramente una relación temporal entre el momento de la infección y la aparición de la enfermedad [21, 22]. Para intentar salvar esta cuestión se han realizado estudios epidemiológicos prospectivos. En dos

trabajos de este tipo no se ha encontrado una correlación entre altos niveles de anticuerpos séricos para HSV tipos 1 y 2 y un aumento del riesgo de un futuro evento aterotrombótico [23, 24]; mientras que en otro, a pesar de que se obtiene una correlación positiva, luego de realizar ajustes para otros factores de riesgo clásicos, dicha correlación no es significativa [25].

Así, se considera importante *poder determinar la presencia real del HSV en el sitio de la lesión como hecho necesario para su posible interacción con el metabolismo tisular*, sea esta por vía directa o indirecta.

Para ello se han aplicado diferentes estrategias experimentales, entre las cuales se destacan:

-la detección de la partícula viral por microscopía electrónica [26];

-la detección de genoma viral por hibridación *in situ* [15, 27]; y

-la detección de antígenos virales específicos por inmunodetección [28].

Con el advenimiento de técnicas moleculares amplificativas, se ha hecho posible la detección de ácidos nucleicos con extrema sensibilidad y especificidad. En el presente trabajo se puso a punto una técnica molecular para la detección tipo específica de genoma de HSV 1 y 2 en tejido humano, empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Además, se desarrolló un sistema basado en RFLP (polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción) para corroborar la identidad del producto amplificado. Posteriormente, se aplicó esta metodología a muestras provenientes de pared aórtica de pacientes con aterosclerosis que habían sido sometidos a cirugía de revascularización miocárdica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Controles Virales

Los controles virales utilizados fueron gentilmente provistos por la Dra. Angélica Distéfano del Departamento de Virología del INEI–ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" (Buenos Aires, Argentina). Estos consistían en sobrenadante de cultivo viral de HSV tipos 1 y 2 desnaturalizados por calentamiento y parcialmente purificados por centrifugación. Las concentraciones genómicas estimadas fueron de 350 ng/µl para HSV1 y de 225 ng/µl para HSV2.

Detección tipo específica de genoma viral

Para la detección tipo específica de genoma viral, se amplificaron mediante PCR fragmentos correspondientes a la región *Pol,* mediante una modificación[1] de la técnica original propuesta por do Nascimento *et al* [30]. Para ello se emplearon: -un cebador universal **HSV-U** (GAG CCA CTT CCA GAA GCG CAG) común para HSV tipos 1 y 2 y -dos cebadores, **HSV-1L** (GTT CGT CCT CGT CCT CCC C) y **HSV-2L** (GGC GCC TCC TTG TCG AG), específicos para cada tipo viral. Los fragmentos amplificados esperados fueron de 503 y 435 pares de bases (pb) para HSV tipo 1 y 2, respectivamente (Figura 1).

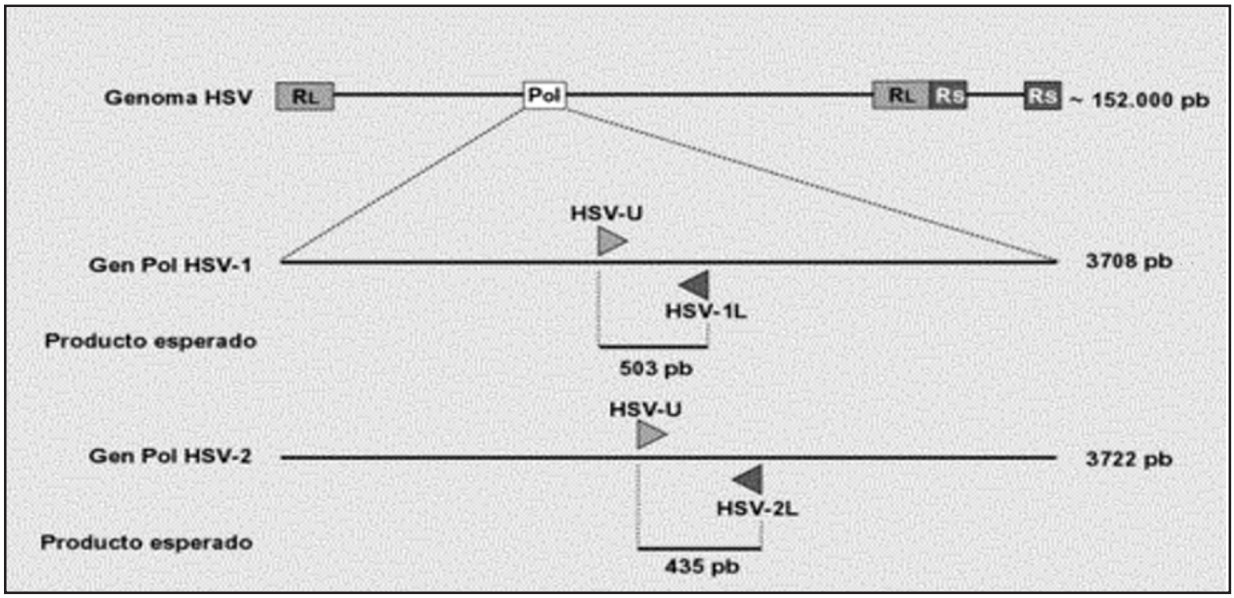

FIGURA 1: representación esquemática del genoma de HSV, destacando la posición relativa del gen *Pol,* blanco de la reacción de amplificación. Se destacan los cebadores empleados en las reacciones tipo-específicas (HSV-U/HSV-1L y HSV-U/HSV-2L) y sus correspondientes productos.

1- Esta incluyó cambios en concentraciones salinas, en cebadores, temperaturas de ciclado y un cambio nucleotídico en el cebador HSV-2L.

La mezcla de reacción para HSV-1 contenía 100 ng totales de genoma de muestra, 0,3 µM de cada uno de los cebadores (HSV-U y HSV-1L), 2 mM de Cl_2Mg, 50 µM de cada uno de los deoxinucleótidos, 50 mM de ClK, 10 mM de Tris-ClH y 0,1% de Tritón® X-100, en un volumen final de 25 µl. Luego de un inicio *hot start* de 45 segundos a 94ºC, se dispensaron 0,02 U/µl de *Taq pol* y se sometió la reacción a 40 ciclos de 45 seg. a 94ºC, 45 seg. a 67ºC y 45 seg. a 72ºC.

Para HSV-2, se empleó una mezcla de reacción de composición semejante, excepto que contenía cebador HSV-2L, 100 ng totales de genoma de muestra y 3,5 mM de Cl_2Mg. En este caso, los 40 ciclos tenían el perfil 45 seg. a 94ºC, 45 seg. a 69ºC y 45 seg. a 72ºC. La detección de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% teñido con bromuro de etidio y observación bajo luz UV.

Confirmación de la identidad del producto amplificado mediante RFLP

Para la confirmación de la identidad de los fragmentos amplificados, se llevaron a cabo digestiones de los mismos empleando la enzima de restricción *Rsa* I, la cual genera un patrón de corte distintivo para los fragmentos HSV-1 y 2 (Figura 2).

La misma se realizó de acuerdo a las condiciones recomendadas por el proveedor, empleándose en cada reacción 1µg de ADN amplificado y 10 U de *Rsa* I (Promega R6371), en solución tampón pH 7,9 (10 mM Tris-ClH, 10 mM Cl_2Mg, 50 mM ClNa, 1 mM DTT). La mezcla de reacción se incubó durante 2 horas a 37°C. Los productos así obtenidos fueron detectados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, y observados por transilumiación con luz UV.

Población analizada

La población analizada comprendió a 31 pacientes, edad promedio de 63,7 años (rango 39 a 78 años), de los cuales 9 fueron de sexo femenino y 22 masculino. El relevamiento de factores de riesgo clásicos presentó la siguiente distribución: -61% de dislipemia, -48% de tabaquismo, y -26% de diabetes no insulino dependiente. Además un 45% declaró un infarto de miocardio previo. Solo uno de ellos informó una infección previa por HSV. Se requirió del consentimiento individual de los participantes, previa información de las características del proyecto[2].

Obtención de muestras

Las muestras analizadas fueron porciones de pared vascular arterial tomadas aleatoriamente a partir de la aorta ascendente de individuos con enfermedad aterosclerótica coronaria. Las mismas se tomaron durante cirugía de revascularización miocárdica en el Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular Misiones, de Posadas, y en el Instituto del Corazón *Cordis* de Resistencia, Chaco, entre los meses de febrero y diciembre de 2001. El tejido se mantuvo en solución tampón PBS estéril a –

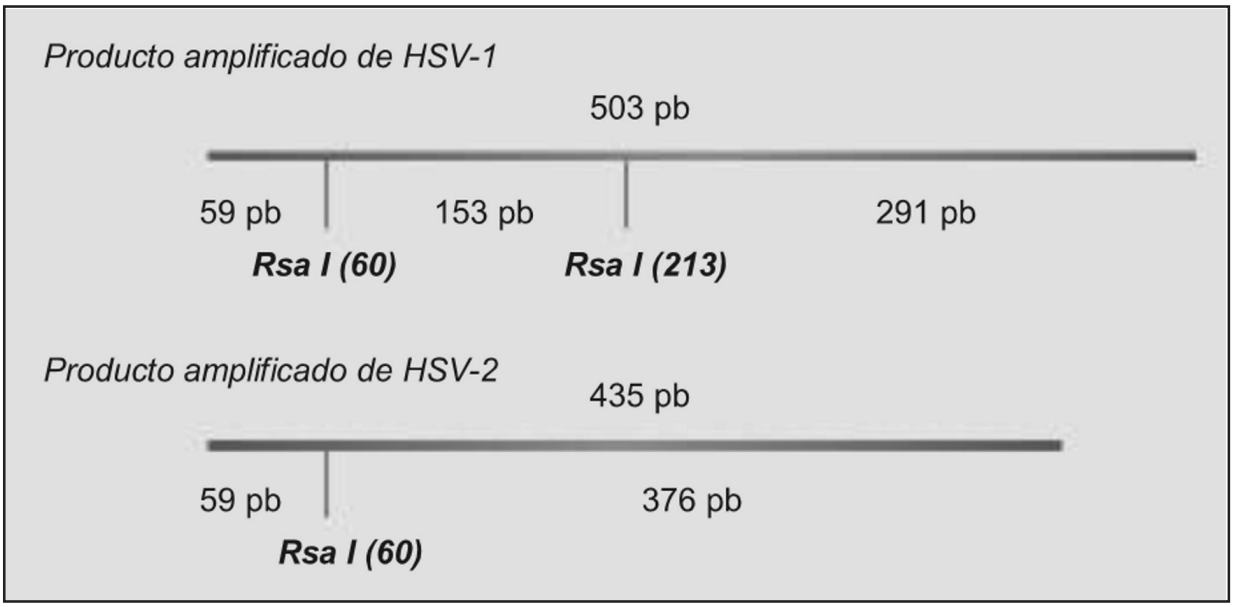

FIGURA 2: patrón de corte de los productos amplificados por PCR, mediante digestión enzimática con *Rsa*. La posición del sitio de reconocimiento se indica entre paréntesis, considerándose como punto de referencia la primer base del fragmento amplificado.

2- *"Todas las investigaciones con sujetos humanos deben realizarse de conformidad con tres principios éticos fundamentales: respeto por las personas, beneficencia y justicia"* (Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas, CIOMS).

20ºC hasta el momento de su procesamiento. Por la metodología quirúrgica empleada, se desconoce si las muestras fueron tomadas precisamente a partir de la lesión aterosclerótica.

Extracción y purificación de ADN genómico total

El tejido fue seccionado con bisturí y degradado enzimáticamente mediante el método proteinasa K/SDS. Se emplearon 200 ng de proteinasa K por muestra, en un volumen final de 500 µl de buffer de digestión (100 mM ClNa, 10 mM Tris pH 8,3, 0,45% Tween 20 y 0,25% SDS). Se incubó durante 5 horas a 58ºC, luego de lo cual se procedió a la inactivación térmica de la enzima.

A cada una de las muestras digeridas se le agregaron 2 µl de una solución de ARNasa (2 mg/ml en buffer TE) y se incubó por 30 minutos a 37ºC para la eliminación del ARN presente. Subsiguientemente, la enzima fue inactivada por tratamiento térmico a 95ºC durante 10 minutos.

Debido al alto contenido lipídico de las muestras, se realizó una doble purificación con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1, pH 8. Para ello se agregaron 100 µl de la solución de purificación a cada una de las muestras, se homogeneizó y luego se separaron las fases por centrifugación a máxima velocidad durante un minuto. Se tomaron 400 µl de la fase acuosa.

La precipitación proteica se llevó a cabo mediante la utilización de una solución salina concentrada provista por el kit Wizard® de Promega. Se agregaron 100 µl de misma y se agitó por 20 segundos, después de lo cual se dejaron en freezer por 3 minutos. Finalmente, se centrifugaron por 3 minutos a 13000 g.

Para la precipitación final del ADN total, se agregaron 20 µl de acetato de amonio 4 M y luego etanol absoluto frío hasta completar los 2 ml. Después de permitir la deshidratación del ADN en freezer por 30 minutos, las muestras se centrifugaron a 13000 g por 5 minutos. El botón de ADN obtenido fue rehidratado en 50 µl de buffer TE.

Las muestras se conservaron a –20ºC hasta el momento de su análisis.

Cuantificación de ADN genómico total

La concentración de ADN obtenido y la pureza del mismo se determinó mediante barrido espectrofotométrico UV, de acuerdo a Berger [29].

RESULTADOS Y DISCUSION

Detección tipo específica de genoma de HSV en controles virales

Para establecer las condiciones óptimas de la técnica de PCR a utilizar, se emplearon controles genómicos puros de HSV tipos 1 y 2. Se evaluaron, principalmente, la concentración de Cl_2Mg y la temperatura de hibridación en el perfil de ciclado.

Luego de titular las concentraciones de Mg^{++} y adecuar la hibridación a cada par de cebadores, se establecieron los valores de 2 y 3,5 mM, y 67 y 69°C para los tipos 1 y 2, respectivamente.

Bajo estas condiciones de reacción, se corroboró la especificidad de los cebadores empleados, no observándose reacción cruzada en las amplificaciones y estableciéndose una total discriminación tipo específica, aún en reacciones *multiplex* (Figura 3).

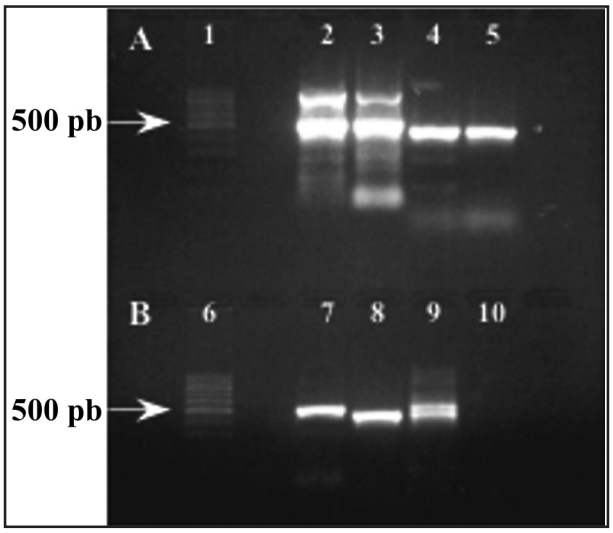

FIGURA 3: Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación de controles virales, mediante la técnica empleada.
Calles 1 y 6: Marcador de peso molecular. **A) Calles 2 y 3:** *Con cebadores HSV-U y HSV-1L*; 35 y 3,5 ng de genoma HSV-1, respectivamente. **Calles 4 y 5:** *Con cebadores HSV-U y HSV 2L* 25 y 2,5 ng de genoma HSV-2, respectivamente. **B)** Reacciones multiplex. *Con cebadores HSV-U, HSV-1L y HSV-2L* **Calle 7:** 3,5 ng de genoma HSV-1. **Calle 8:** 2,5 ng de genoma HSV-2. **Calle 9:** 3,5 ng de genoma HSV-1 y 2,5 ng de genoma HSV-2. **Calle 10:** Control negativo (agua).

Determinación del límite de detección de genoma viral por esta metodología

Para establecer el límite de detección de genoma viral por la metodología de amplificación molecular empleada, se realizaron cuatro series de diluciones sucesivas al 1/100 del stock viral inicial para cada tipo. El límite de detección determinado por titulación fue de 7.10^{-5} ng para HSV tipo 1, y de $4,5.10^{-5}$ ng para el tipo 2. Debido a que el tamaño aproximado del genoma viral de HSV es de 150 kpb, se puede estimar que la técnica utilizada es capaz de detectar, de manera inequívoca, el equivalente a 4.10^2 partículas virales de HSV tipo 1 y $2,7.10^2$ partículas virales de HSV tipo 2.

Detección de genoma de HSV control en un contexto de genoma inespecífico

El límite de detección establecido para genoma viral puro fue corroborado en situaciones en donde el mismo se encontraba en un contexto complejo, mezclado con genoma inespecífico. Para ello, se realizaron nuevas reacciones de amplificación, en donde se utilizó como molde genoma de HSV tipo 1 o 2, a las concentraciones límite de detección, adicionándole 100 ng de genoma de esperma de salmón sonicado. Esta mezcla compleja pretendería simular un ambiente de muestra biológica infectada.

Bajo estas condiciones no se observaron diferencias distinguibles en los resultados, detectándose bandas específicas bien definidas a las concentraciones límites de detección para cada tipo viral y estableciendo que la técnica utilizada tendría la suficiente especificidad y sensibilidad para el análisis de muestras biológicas (Figura 4).

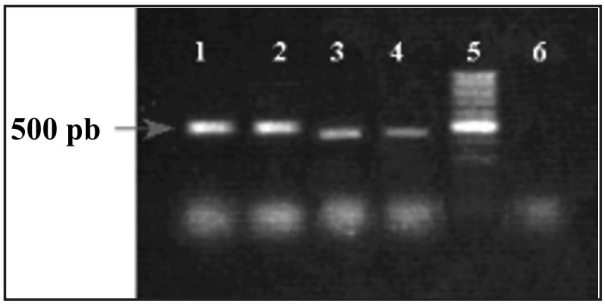

FIGURA 4: Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación de controles virales más genoma inespecífico, mediante la técnica empleada.
Calle 1: 7 x 10^{-5} ng de genoma HSV-1. **Calle 2:** 7 x 10^{-5} ng de genoma HSV-1 más 100 ng de genoma de esperma de salmón. **Calle 3:** 4,5 x 10^{-5} ng de genoma HSV-2. **Calle 4:** 4,5 x 10^{-5} ng de genoma HSV-2 más 100 ng de genoma de esperma de salmón. **Calle 5:** Marcador de peso molecular. **Calle 6:** Control negativo (agua).

Posteriormente, este mismo experimento se repitió con 100 ng de ADN genómico humano proveniente de muestras de punch aórtico, obteniéndose resultados similares, validando la técnica empleada.

Autenticación del producto amplificado mediante RFLP

Con el objetivo de confirmar la identidad de los productos amplificados mediante PCR, se procedió al análisis de los amplicones generados a partir de cada uno de los controles virales, cuyas secuencias referencia fueron consultadas en la base de datos GenBank. Este análisis nos permitió determinar que el amplicón correspondiente a HSV-1 posee dos sitios de reconocimiento para la enzima de restricción *Rsa I*, mientras que el fragmento amplificado a partir de HSV-2 posee un único sitio de corte (Figura 2). Así, la digestión de los mismos por esta enzima permitiría corroborar su identidad generando un patrón de corte distintivo, detectable mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. El patrón de bandas obtenido luego de la digestión (Figura 5b), se corresponde completamente al esperado (Figuras 2 y 5a).

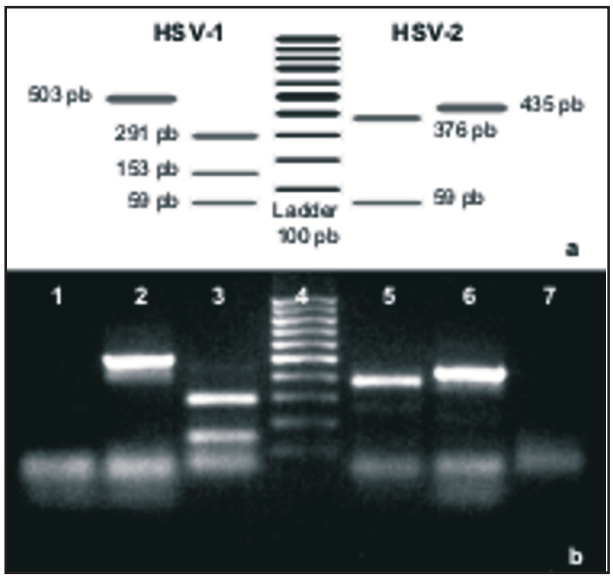

FIGURA 5: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de amplificación de virales, digeridos con la enzima de *Rsa* **a)** Esquema representativo de la fotografía mostrada en b), de acuerdo al patrón de bandas esperado a partir de las secuencias consultadas en la base de datos GenBank. **b) Calle 1:** Control negativo (agua) para HSV-1. **Calle 2:** Producto de amplificación de 0,35 ng de genoma de HSV-1 sin digerir. **Calle 3:** Producto de amplificación de 0,35 ng de genoma de HSV-1 digerido con *Rsa* **Calle 4:** Marcador de peso molecular (escalera de 100 pb). **Calle 5:** Producto de amplificación de 2,5 de genoma de HSV-2 digerido con *Rsa* **Calle 6:** Producto de amplificación de 2,5 ng de genoma de HSV-2 sin digerir. **Calle 7:** Control negativo (agua) para HSV-2.

Extracción y purificación de ADN genómico total a partir de muestras de tejido aórtico

Se compararon dos protocolos diferentes para la extracción y purificación del genoma a partir de tejido aórtico. En una primera instancia se utilizó el kit Wizard de Promega de la manera descripta por el proveedor. Sin embargo, debido a la alta concentración de lípidos característica de este tipo de muestra, el rendimiento de extracción (153,96 ng/µl, σ=65,27) y la pureza del genoma (índice A260/A280 = 1,18, σ=0,14) fue pobre. Así, se incluyó una doble purificación fenólica al mismo, de acuerdo a lo descripto en Materiales y Métodos. Con esta modificación se obtuvieron en promedio 410,26 ng/µl de ADN (σ=255,27) con un índice A260/A280 de 1,38 (σ=0,11).

Detección de genoma de HSV tipos 1 y 2 en muestras de tejido aórtico

Con esta técnica se analizó la potencial presencia de genoma de HSV tipos 1 y 2 en la población de pacientes ateroscleróticos bajo análisis. El *control positivo* de cada grupo de reacciones de amplificación consistió en

100 ng de ADN genómico humano normal más genoma puro de HSV tipo 1 o 2 control, a la concentración límite de detección. Como *controles negativos*, se emplearon s agua, y s 100 ng de ADN genómico humano normal, sin el agregado de genoma de HSV.

En ninguna de las 31 muestras analizadas se detectó la presencia de genoma de HSV (Figuras 6 y 7).

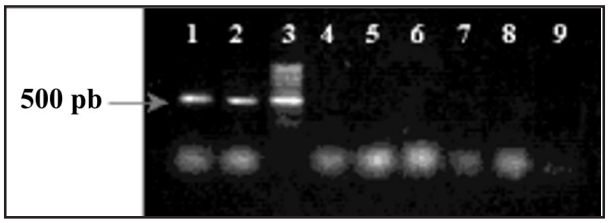

FIGURA 6: Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación de muestras para la detección de genoma de HSV-1, mediante la técnica empleada. **Calle 1:** Control positivo (7 x 10^{-5} ng de genoma HSV-1). **Calle 2:** Control positivo (7 x 10^{-5} ng de genoma HSV-1 más 100 ng de ADN genómico humano). **Calle 3:** Marcador de peso molecular. **Calles 4 a 8:** 100 ng de ADN genómico de muestras. **Calle 9:** Control negativo (agua).

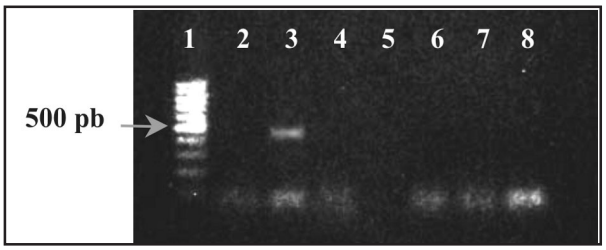

FIGURA 7: Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación de muestras para la detección de genoma de HSV-2, mediante la técnica aplicada **Calle 1:** Marcador de peso molecular. **Calle 2:** Control negativo (agua). **Calle 3:** Control positivo (4,5 x 10^{-5} ng de genoma HSV-2 más 100 ng de ADN genómico humano). **Calles 4 a 8:** 100 ng de ADN genómico de muestras.

En la interpretación de estos resultados se debe considerar que la naturaleza particular de las muestras bajo análisis (*punch* aórtico aleatorio) no permite establecer con certeza que estas contengan regiones que incluyan placas ateroscleróticas, las cuales pueden presentarse en otras áreas de la pared vascular.

Por otro lado, es factible que el agente infeccioso pueda mediar el desarrollo de la placa aterosclerótica por mecanismos indirectos. Esta última hipótesis está apoyada en experimentos con ratas infectadas con otro miembro de la familia *Herpesviridae*, el Citomegalovirus, el que producía una aceleración en el desarrollo de la aterosclerosis en dichos animales, sin que sea necesaria la presencia del mismo en el sitio de la lesión [31].

Si bien la controversia sobre el rol de infección viral aórtica por HSV y génesis de placa aterosclerótica es un tema de debate actual, nuestra aproximación experimental no detectó presencia de genoma viral en tejido aórtico de pacientes con aterosclerosis que habían sido sometidos a cirugía de revascularización miocárdica. ●

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Castillo, S.; Coniglio, R. I.; Doubnia, M. I.; López Torres, J.; Guersanik, C. S.; Meza, G.; Claramaunt, R.; Durando, A.; Ramírez, R.; Silva, E.; D'alonzo, T.
Factores de riesgo para la aterosclerosis coronaria en el nordeste argentino. Dieta alimentaria y nivel de instrucción. Revista de Ciencia y Tecnología. 2000:6-16.

2. Ministerio de Salud de la Nación. Boletín del Programa Nacional de Estadísticas de Salud: *Agrupamiento de causa de mortalidad, por división política territorial, edad y sexo, Argentina 2000. 2002.*

3. Nicholson, A. C.; Hajjar, D. P.
Herpesviruses in atherosclerosis and thrombosis: etiologic agents or ubiquitous bystanders. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1998; 18:339-348.

4. Epstein, S. E.; Zhou, Y. F.; Zhu, J.
Infection and atherosclerosis: emerging mechanistic paradigms. Circulation. 1999; 100:e20-e28.

5. Fabricant, C. G.; Krook, L.; Gillespie, J. H.
Virus-induced cholesterol crystals. Science. 1973; 181:566-567.

6. Fabricant, C. G.; Fabricant, J.; Litrenta, M. M.; Minick, C. R.
Virus-induced atherosclerosis. J. Exp. Med. 1978; 148:335-340.

7. Fabricant, C. G.; Fabricant, J.; Minick, C. R.; Litrenta, M. M.
Herpesvirus-induced atherosclerosis in chickens. Fed. Proc. 1983; 42:2476-2479.

8. Alber, D. G.; Powell, K. L.; Vallance, P.; Goodwin, D. A.; Graham-Clarke, C.
Herpesvirus infection accelerates atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. Circulation. 2000; 102:779-785.

9. Alber, D. G.; Vallance, P.; Powell, K. L.
Enhanced atherogenesis is not an obligatory response to systemic herpesvirus infection in the apoE-deficient mouse: comparison of murine gamma-herpesvirus-68 and herpes simplex virus-1. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2002; 22:793-798.

10. Cines, D. B.; Lyss, A. P.; Bina, M.; Corkey, R.; Kefalides, N. A.; Friedman, H. M.
Fc and C3 receptors induced by Herpes Simplex Virus in cultured human endothelial cells. J. Clin. Invest. 1982; 69:123-128.

11. Visser, M. R.; Tracy, P. b.; Vercellotti, G. M.; Goodman, J. L.; White, J. G.; Jacob, H. S.
Enhanced thrombin generation and platelet binding on herpes simplex virus-infected endothelium. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1988; 85:8227-8230.

12. Zajac, B. A.; O'Neill, K.; Friedman, H. M.; Mac Gregor, R. R.
Increased adherence of human granulocytes to Herpes Simplex Virus type 1 infected endothelial cells. In Vitro Cell. Dev. Biol. 1988; 24:321-325.

13. Friedman, H. M.
Infection of endothelial cells by common human viruses. Rev. Infect. Dis. 1989; 11:s700-s704.

14. Span, A. H. M.; Endert, C. P. A.; van Boven, C. P. A.; Bruggeman, C. A.
Virus induced adherence of monocytes to endothelial cells. FEMS Microbiol. Immunol. 1989; 47:237-244.

15. Benditt, E. P.; Barrett, T.; McDougall, J. K.
Viruses in the aetiology of atherosclerosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1983; 80:6386-6389.

16. Hajjar, D. P.
Herpesvirus infection prevents activation of cytoplasmic cholesteryl esterase in arterial smooth muscle cells. J. Biol. Chem. 1986; 261:7611-7614.

17. Kaner, R. J.; Medina, J.; Nicholson, A. C.; Ursea, R.; Schwartz, S. M.; Hajjar, D. P.
Developmentally regulated herpesvirus plaque formation in arterial smooth muscle cells. Circ. Res. 1993; 73:10-14.

18. Hajjar, D. P.; Pomerantz, K. B.; Falcone, D. J.; Weksler, B.B.; Grant, A. J.
Herpes Simplex Virus infection in human arterial cells. Implications in arteriosclerosis. J. Clin. Invest. 1987; 80:1317-1321.

19. Hajjar, D. P.
Oxidized lipoproteins and infectious agents: are they in collusion to accelerate atherogenesis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2000; 20:1421-1422.

20. Kaner, R. J.; Hajjar, D. P.
Viral activation of thrombo-atherosclerosis. En: Atherosclerosis and coronary artery disease. Fuster, V.; Ross, R.; Topol, E. J.; eds. Philadelphia: Lippincott Raven Publishers; 1996:569-584.

21. Epstein, S. E.; Zhu, J.
Lack of association of infectious agents with risk of future myocardial infarction and stroke: definitive evidence disproving the infection/coronary artery disease hypothesis? Circulation. 1999; 100:1366-1368.

22. Morré, S. A.; Stooker, W.; Lagrand, W. K.; van den Brule, A. J. C.; Niessen, H. W. M.
Microorganisms in the aetiology of atherosclerosis. J. Clin. Pathol. 2000; 53:647-654.

23. Ridker, P. M.; Hennekens, C. H.; Stampfer, M. J.; Wang, F.
Prospective study of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and the risk of future myocardial infarction and stroke. Circulation. 1998; 98:2796-2799.

24. Sorlie, P. D.; Nieto, F. J.; Adam, E.; Folsom, A. R.; Shahar, E.; Massing, M.
A prospective study of cytomegalovirus, herpes simplex virus 1, and coronary heart disease: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. Arch Intern Med. 2000; 160:2027-2032.

25. Zhu, J.; Nieto, F. J.; Horne, B. D.; Anderson, J. L.; Muhlestein, J. B.; Epstein, S. E.
Prospective study of pathogen burden and risk of myocardial infarction or death. Circulation. 2001; 103:45-51.

26. Gyorkey, F.; Melnick, J. L.; Guinn, G. A.; Gyorkey, P.; DeBakey, M. E.
Herpesviridae in the endothelial and smooth muscle cells of the proximal aorta in arteriosclerotic patients. Exp Mol Pathol. 1984; 40:328-339.

27. Yamashiroya, H. M.; Ghosh, L.; Yang, R.; Robertson, A. L. Jr.
Herpesviridae in the coronary arteries and aorta of young trauma victims. Am J Pathol. 1988; 130:71-79.

28. Raza-Ahmad, A.; Klassen, G. A.; Murphy, D. A.; Sullivan, J. A.; Kinley, C. E.; Landymore, R. W.; Wood, J. R.
Evidence of type 2 herpes simplex infection in human coronary arteries at the time of coronary artery bypass surgery. Can J Cardiol. 1995; 11:1025-1029.

29. Berger, S. L.
Quantifying 32P-labeled and unlabeled nucleic acids. En: Methods in enzimology. Berger, S. L., Kimmel, A. R., eds. Orlando, San Diego, New York, Austin, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich; 1987:49-54.

30. Do Nascimento, M. C.; Sumita, L. M.; de Souza, V. A. U. F.; Pannuti, C. S.
Detection and direct typing of herpes simplex virus in perianal ulcers of patients with AIDS by PCR. J. Clin. Microbiol. 1998; 36:848-849.

31. Zhou, Y. F.; Shou, M.; Guetta, E.; Guzman, R.; Unger, E. F.; Yu, Z. X.; Zhang, J.; Finkel, T.; Epstein, S. E.
Cytomegalovirus infection of rats increases the neointimal response to vascular injury without consistent evidence of direct infection of the vascular wall. Circulation. 1999; 100:1569-1575.

Recibido: 15 de Febrero de 2005.
Aprobado: 18 de Agosto de 2005.

LISTADO DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN VIGENTES (DICIEMBRE 2004)

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN INCORPORADOS AL PROGRAMA NACIONAL DE INCENTIVOS A LA INVESTIGACIÓN

• Factores de riesgo aterogénico en empleados de la Administracion Pública. Director: Castillo Rascon. Codirector: Bonneau, Graciela.

• Biodiversidad de ambientes acuáticos subtropicales. Directora: Hirt, Lourdes. Codirectora: Meichtry, Norma.

• Estudios de Aceites Esenciales de especies vegetales de la Pcia. de Misiones II. Director: Kolb K., Nicolás.

• Consumo de Sal y Potasio en población Pediátrica de la Ciudad de Posadas. Directora: Maskin de J., Alicia.

• Aplicación de fosfonatos en Pulpas Kraft blanqueadas ECF. Directora: Area, M. C. Codirector: Felissia, F.

• Proteínas del Gluten: evaluación de procesos de extracción en productos panificados. Directora: Milde, L. Codirector: Valdéz, J.

• Tratamiento de Lixiviados de residuos sólidos urbanos c/Macrofitas Acuáticas. Directora: Pettri Flores, M. D. Codirector: Russo, Héctor R.

• Análisis de la legislación nacional e internacional de Yerba Mate comercializados y de los circuitos comerciales e internacionales. Director: Linares, Andrés. Codirectora: Brignardell, Adriana.

• Aislamiento y caracterización de cepas de levadaduras con actividad macerante de tejidos vegetales. Director: Hours, Roque A. Codirector: Martínez Vásquez Francisco.

• Determinación a escala laboratorio de la relación carbono-nitrogeno-fósforo que maximixa la producción de biomasa en el tratamiento con barros activados de efluentes de pastas celulósicas semiqca. al sulfito neutro. Director: Piris Da Motta, Marcial. Codirectora: Reta, M. Rosa.

• Estudio de la obtención de extractos acuosos concentrados de Yerba Mate. Director: Linares, Andrés. Codirectora: Hase, Sandra L.

• Relevamiento de la Entomofauna de la Provincia de Misiones. Directora: Tricio, Aída. Codirectora: Fernandez Díaz, C.

• Estructura y composición de las comunidades vegetales en el sur de la Prov. de Mnes., Arg. Parte II carcterísticas de las comunidades vegetales y población de *Astronium balansae engl. (anacardiaceae)* en los dptos. Capital y Candelaria. Directora: Rodríguez, Manuela. Codirectora: Cardozo, Alicia.

• Citogenética evolutiva y aplicada de peces del Nordeste Argentino (II). Director: Fenocchio, Alberto. Codirectora: Pastori, María C.

• Cuidado integral en prevención de infec. hospitalar. Directora: Grenon, Sandra. Codirectora: Jacquier, Nora.

• Estudio de infec. bacterianas perinatológicas en Posadas, Mnes. Directora: Vergara, Marta. Codirectora: Quiroga, Marina I.

• Evaluacion Bioquímica del estado nutricional de *Caiman Sp.* en cautiverio (crocodylia: alligatoridae). Director: Mussart, Norma B. Codirectora: Coppo, José A.

• Citogenética de recursos vegetales ornamentales nativos de Misiones y áreas vecinas. Director: Daviña, Julio.

• Caracterización microestructural, resistencia al desgaste y a la corrosión de materiales compuestos de matriz aluminio solidificados direccionalmente. Director: Schvezov, Carlos. Codirectora: Ares, Alicia.

• Modelos de atención de enfermería: enfermería en salud escolar. Directora: Báez, Alina E.

• Micrografía y anatomía vegetal en ciencia forense, control de calidad y conservación. Director: Amat, Aníbal G.

• *Enterococcus spp.* de diversos orígenes: capacidad de generación de bacteriocinas y animas biogénicas. Director: Duce, Jorge A.

• Circulación de arbovirus reemergentes trasmitidos por mosquitos vectores de los generos *culex* y *aedes*, en Posadas y Pto. Iguazú, Pcia. de Mnes. Director: Tonón, Sergio A.

• Desarrollo de una propuesta para: Topes microbiológicos y determinación del contenido de palos en función de las cenizas en Y. Mate elaborada. Director: Duce, Jorge.

• Estudio de la actividad lignilolítica de especies de hongos de pudrición blanca de la Pcia. de Mnes. Para la aplicación en proceso de pulpado. Directora: Villalba, Laura. Codirectora: Gavazzo, Graciela B.

• Contribución al diagnóstico de las infecciones fúngicas: realidad y perspectiva. Medvedeff, Martha.

• El envase en la estabilidad de la Y. Mate. Mecanismo combinado de ganancia de humedad del producto. Director: Albani, Oscar. Codirectora: Ramallo, Laura.

• Determinación del *shelf life* de Yerba Mate elaborada. Directora: Ramallo, Laura. Codirector: Albani, Oscar.

• Optimización de una formulación antifúngica de solución saturada de sacarosa, eugenol y polietilenglic 400. Directora: Lloret, María A. Codirectora: Medvedeff, Martha.

• Materias primas para la producción de pulpas moldeadas. Directora: Gavazzo, Graciela B.

• Estudio de las mutaciones DF508 y G542X de CFTR en pacientes pediátricos sintomáticos con valores de test del sudor patológico y borderline. Directora: Guastavino, Marcela (III). Codirectora: Zacharzewki, Carolina.

• Método secuencial para detección temprana de fibrosis quística en la ciudad de Posadas. Directora: Tibolla, María. Codirectora: Márquez, Nora.

• Subjetividad, violencia y ética educativa III. Director: Nelli, Luis. Codirectora: Leira, C.

• Epidemiol. molecul. de la infección de cuello uterino por virus papiloma humano (hpv) en la pcia. de Mnes. Director: Tonón, Sergio A.

• Acción biológica y est. Fitoquímicos de extractos veget. de plantas de uso medicinal regionales. Director: Bargardi, Severino. Codirector: Kramer, Fernando.

• Estudio de la utilización de los subproductos de la elaboración de la yerba mate. Director: Schmalko, Miguel E.

• Ictioplancton del Río Alto Paraná: un análisis de sus patrones de uso del habitat y sus recursos. Director: Rossi, Liliana. Codirectora: Roa, Blas H.

• Modelado y optimizacion del secado de las ramas de Y. Mate. Director: Schmalko, Miguel E.

• Aplicación del sistema de analisis de peligros y ptos. Críticos de ctrol. (Haccp) en el sect. parrilla del comp. turístic. Cataratas del Iguazú. Director: Marucci, Raúl S.

• Combustor de pellets de aserrín en escala Planta Piloto. Director: Delfederico, Luis E.

• Utilización de hongos de pudrición blanca nativos de la provincia de Misiones para su aplicación en procesos de bioremediación. Directora: Villalba, Laura. L.

• Características de pulpas kraft de *eucalyptus grandis* tratadas con fosfonatos en las etapas de blanqueo TCF. Directora: Area, María C. Codirector: Felissia, Fernando E.

• Diagnóstico del agente causal de coqueluche por metodos bacteriologicos y de biologia molecular en la provincia de Misiones. Directora: Grenon, Sandra L.

• Desarrollo y validación de dos métodos para la detección de esperma humano. Directora: Villamil Lépori, Edda C. Codirector: González, Carlos O.

• Estudios citológicos de Anuros neotropicales. Director: Marti, Dardo A. Codirector: Baldo, Juan D.

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN NO INCENTIVADOS

• Estudio poblacional de la Fauna Íctica de la Pcia. de Misiones. Directora: Hirt, Lourdes.

• Epidemiología de Strongiloidiosis y Criptosporidiosis en población infantil y pacientes HIV/SIDA de Misiones. Director: Deschutter, Jorge.

• El método de penalización cuadrática: mejoramiento de sus propiedades de convergencia. Director: Petryla, Estanislao. Codirector: Iglesias, Omar.

• Citogenética vegetal. Director: Daviña Julio. Codirectora: Honfi, Ana.

• Relevamiento Florístico de la Pcia. de Mnes., Herbario de la Univ. Nac. de Mnes. Directora: Honfi Ana. Codirector: Daviña, Julio.

• Estudio de las comun. Planctónicas y Bentónicas. I estructura de las comun. Planctónicas y bentónicas en el embalse Yacyretá. Directora: Meichtry, Norma R. Codirectora: Peso, Juana G.

• Caracterización morfológica con fines papeleros de la madera de *Eucalyp. grandis* implantada en la Mesopotamia Arg. Director: Nuñez, Carlos.

• Biología pesquera regional. Director: Roa, Héctor.

• Selección de material de construc. de un digestor perteneciente a una plta. de Pulpado Kraft. Directora: Ruíz, Elsa R.; Gassa, L.

• Los conocimientos matemáticos en el umbral de la univ. Una asignatura en discusión. Directora: Zoppi, Ana María. Codirectora: Caronia de Joulia.

• Hongos y micotox. en Y. Mate elabor., en sus distintas formas de comerc. Directora: Jerke, Gladis.

• Correlación entre paramet. de solidif estruct. y propied. mec. de aleaciones Zn –Al(Za). Directora: Ares, Alicia E. Codirector: Gueijman, Sergio F.

• Relación entre la expres del recept. 2 de somatostatina (sst2), la fosfotirosina fosfatasa SHP-1 (PTPN6) y el grado de diferenciación tumoral en el c. de prostata. Director: Zapata, Pedro D.

• Estudio de *Aeromonas Spp.* involucradas en infecciones extraintestinalesquiroga. Directora: Quiroga, Marina I.

• Papeles y cartones en contacto con alimentos. Directora: Gavazzo, Graciela B. ●

GUÍA PARA AUTORES

I - ALCANCE DE LA REVISTA

1) La Revista de Ciencia y Tecnología (ReCyT) publica artículos originales que representan una contribución para el desarrollo científico-tecnológico. Incluye trabajos de investigación básica y aplicada, desarrollo tecnológico, revisiones bibliográficas de alto impacto, notas técnicas y, eventualmente, estudios de casos que por su relevancia ameriten publicarse[1].

2) Las áreas de incumbencia de la revista son las ciencias exactas, químicas y naturales con su correspondiente tecnología. La decisión última, sobre la incumbencia de un artículo presentado, quedará a cargo del Consejo de Dirección (CD).

3) Los autores interesados en publicar artículos en la ReCyT, deberán enviar sus trabajos de acuerdo con las normas que se estipulan más abajo.

4) Los artículos sometidos para publicación no deberán tener "Derechos de Autor" otorgados a terceros, a la fecha de envío del artículo. Caso contrario, el autor deberá gestionar, ante quien corresponda, la autorización por escrito para su nueva publicación en la ReCyT.

5) Los conceptos y opiniones vertidos en los artículos publicados y del uso que otros puedan hacer de ellos, son de exclusiva responsabilidad de los autores, la cual se asume con la sola presentación del artículo enviado por los autores para su publicación. La ReCyT se publicará en idioma español, salvo las partes específicas que se mencionan en las normas.

II. PRESENTACIÓN Y REVISIÓN DE ARTÍCULOS

6) Los manuscritos deberán ajustarse a las normas gramaticales que establece el Diccionario de la Real Academia Española en su última edición. Se debe evitar el uso de términos en otros idiomas, si existe uno equivalente en castellano.

7) El manuscrito se presentará en 1 (una) copia impresa y en formato electrónico como archivo tipo Word (disquete o anexo por correo electrónico) en las oficinas del CIDeT[2]. Al momento de la recepción, se entregará un recibo donde constará: Título del trabajo, autor/es, número de páginas, fecha y hora de la recepción.

8) Los trabajos presentados para publicar serán sometidos a una primera evaluación interna de incumbencia, calidad general y categoría a cargo del CD, y posteriormente a una evaluación externa de pertinencia y calidad científica por miembros del Consejo de Edición, (CE). El CE está integrado por reconocidos especialistas en los temas de incumbencia de la ReCyT.

9) El proceso general de evaluación consiste en una exhaustiva revisión crítica de los contenidos y la estructura del artículo, la recomendación de su publicación o no, y eventuales correcciones.

10) El CD se reserva el derecho de rechazar el trabajo por no ajustarse a las áreas involucradas, no cumplir las normas establecidas o no poseer la calidad científica requerida. También se reserva el derecho de realizar modificaciones menores de edición para una mejor presentación final del trabajo.

11) El CD notificará al autor la aceptación o rechazo del artículo. De ser necesario, le solicitará que realice las modificaciones recomendadas para proceder a los trámites pertinentes previos a su publicación.

12) Los autores deberán realizar las correcciones y modificaciones requeridas por el CD y el CE en el plazo de 30 días. Los autores podrán solicitar aclaraciones a las correcciones al CIDeT. El CD decidirá sobre el particular, y realizará la revisión del trabajo modificado.

13) Aceptado el trabajo para publicación en forma definitiva se comunicará la resolución a los autores de forma escrita. A partir de este momento no se aceptarán modificaciones, salvo solicitud explícita y fundamentada al CD.

14) El CIDeT hará firmar a todos los autores el formulario por sextuplicado de la cesión parcial de los derechos. Una copia firmada por el decano de la FCEQyN, será remitida a los autores.

15) Los trabajos originales quedarán en poder del CIDeT, se publiquen o no.

1- Un artículo se considera trabajo cuando representa el resultado y las conclusiones de una investigación completa. Este tendrá categoría de nota técnica cuando trate de cuestiones como calibraciones, propuestas metodológicas, opiniones sobre normas, resolución de problemas operativos, etc.
2- Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones. Félix de Azara 1552 (3300) Posadas, Misiones, Argentina.

II - NORMAS DE ELABORACIÓN DE MANUSCRITOS

16) Los artículos completos deben tener como máximo 6.000 palabras, 12 figuras y entre 10 y 15 páginas. Las notas técnicas no deberán superar las 10 páginas. En todos los casos deberá utilizarse letra tipo Arial tamaño 11 puntos, y formato de hojas tipo A4, numeradas en el margen inferior derecho, a doble espacio, sin justificación ni separación en sílabas, y con los cuatro márgenes de 2,5 cm.

17) Las tablas y figuras deberán insertarse en el texto del artículo y deberán ubicarse lo más cerca posible del sitio en el que son mencionadas. De acuerdo con su tamaño, podrán presentarse por separado, correctamente identificadas. Los formatos de gráficos aceptados son TIFF y EPS, y deberán tener 300 dpi de resolución. El CD podrá pedir a los autores, una vez aceptado el trabajo, que entregue las imágenes y los gráficos del artículo, con el formato, tamaño, dimensiones, resolución, etc., necesarios.

18) Los artículos científico-técnicos se organizarán siguiendo el esquema general en orden sucesivo: título, título resumido del trabajo (máximo de 8 palabras), nombres del (los) autores, nombres y direcciones de la institución a la que pertenecen, título en inglés, *abstract*, *key words*, resumen, palabras clave, introducción, materiales y métodos, resultados y discusión (juntos o separados), conclusiones, lista de abreviaturas (si corresponde), agradecimientos, referencias y apéndices o anexos (si corresponde).

19) Título: deberá ser breve (no mayor de 15 palabras), conciso y reflejar aspectos específicos del trabajo.

20) Autores: se colocarán los autores separados por punto y coma, situando primero el o los apellidos seguidos de una coma, y a continuación el primer nombre e inicial del segundo con un punto.

21) Dirección: debajo de los autores se indicará la institución a la que pertenecen o dónde fue llevado a cabo el trabajo. Si los autores pertenecen a distintas instituciones, luego de cada nombre se colocará un número entre paréntesis, indicando con esta referencia a las instituciones y sus respectivas direcciones. Se sugiere incluir los nombres de las secciones y dependencias imprescindibles. Señalar, entre paréntesis, las direcciones electrónicas personales.

22) Título en inglés: consistirá en una traducción representativa del título en castellano.

23) Abstract: debe reflejar el contenido en el Resumen, redactado en idioma inglés.

24) Key words: palabras clave en idioma inglés.

25) Resumen: deberá ser una condensación de todas las partes del trabajo en 150 palabras como máximo, sintetizando los objetivos, los métodos, los resultados y las conclusiones.

26) Palabras clave: el artículo deberá contener entre 3 y 10 palabras clave, que servirán para catalogarlo en las bases de datos[3].

27) Introducción: Debe presentar claramente el tema, haciendo solamente referencia a los antecedentes bibliográficos de interés. Los objetivos y las hipótesis deberán estar adecuadamente explicados.

28) Materiales y Métodos: el trabajo deberá describir en forma completa los materiales y metodologías utilizados. Las normas reconocidas deberán ser citadas pero no explicadas. Las técnicas publicadas deberán presentar en forma resumida sus características principales y las referencias correspondientes. Deberán detallarse todas las modificaciones efectuadas a cualquier técnica[4].

29) Resultados y Discusión: estas dos secciones podrán incluirse juntas o separadas. Los resultados se expondrán con estilo conciso y fácilmente entendible. La discusión de los resultados incluirá la comparación con resultados previos (propios o de otros autores, con las referencias correspondientes). Se deberá evitar la duplicación de información en tablas y gráficos.

30) Conclusiones: deben presentarse en párrafos cortos y concretos. No deben hacer referencia a trabajos futuros ni a hipótesis no incluidas en el trabajo.

31) Agradecimientos: podrán incluirse a los organismos que financiaron el trabajo, así como a los colaboradores y al personal técnico o especializado, especificando las tareas realizadas por cada uno. En las filiaciones de los autores se admitirá solamente las siglas de los organismos o el nombre completo de la entidad y entre paréntesis la sigla, por ejemplo, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

32) Referencias: las citas bibliográficas deberán consignarse con números correlativos colocados entre corchetes o paréntesis, de tamaño igual al del texto. El texto puede incluir nombres de autores, pero conjuntamente figurar el número de referencia bibliográfica correspon-

3- Si la disciplina que trata el artículo posee tesauros publicados, se sugiere utilizarlos para la definición de las palabras clave.
4- El criterio general es que con los datos de este ítem se pueda replicar correctamente el trabajo experimental.

diente. En el ítem correspondiente se consignarán según el orden en que aparezcan en el texto. No se incluirán referencias que no figuran en el texto. Respecto al formato de las referencias, se colocarán según el estilo de las disciplinas correspondientes. En todos los casos deberán figurar: apellido e iniciales de los nombres de los autores en ese orden; nombre de la publicación periódica completo o con las abreviaturas oficiales; volumen; número, páginas inicial y final, año de publicación[5]. En el caso de libros: nombre, capítulo, editorial, páginas y año de edición.

Ejemplos orientativos:

1. Atanassov, Z; Zheringe, P. y Wharton, D. *Evaluation of Wheat Response to Fusarium Head Blight Bases on Seed Set.* Appl. Environm, Chem. 48: P. 993-998.1994.

2. Cole, R.J. y Cox R.H. *Handbook of Toxic Fungal Matabolites.* Assoc. Press, New York. P. 356-379.1981.

3. Cotty, P.J. *Agriculture, Aflatoxins and Aspergillus in The genus Aspergillus.* K.A. Powll, Editor. Plenum Press, New York. P. 1-27.1994.

4. National Agricultural Statistics Service (1997) Crops county data [Online]. Available at http://usda.mannlib.cornell.edu/data-sets/crops/9X100 (verified 30, Nov. 1998).

33) Apéndices o Anexos: se reservan para detallar técnicas originales utilizadas o análisis teóricos que impedirían seguir fluidamente el trabajo si se incluyeran en el texto. Las tablas de los apéndices pueden llevar números correlativos con los del texto o comenzar otra numeración.

34) Figuras: las figuras (gráficos, cuadros, fotos, otros) deberán numerarse correlativamente en orden de aparición en el texto y deberán incluir un breve título explicativo en la parte inferior de la figura. Las fotos se designarán como figuras.

35) Tablas: las tablas deberán numerarse correlativamente según su orden de aparición en el texto y en forma independiente de las figuras. Deberán incluir un título explicativo en su parte superior. De ser necesario, se agregarán al pie notas explicativas para detallar abreviaturas, signos, medidas, otros, de tal manera que el lector pueda comprender su contenido sin recurrir al texto.

36) Fórmulas: las fórmulas y expresiones matemáticas deberán ser escritas dejando dos espacios sobre, debajo y entre cada una de ellas. Las fórmulas se ajustarán al margen izquierdo y serán numeradas correlativamente y entre paréntesis sobre el margen derecho. Debe quedar definido el significado y las unidades utilizadas en cada término de las expresiones.

37) Unidades: debe utilizarse el sistema internacional de unidades (SI).

37) Presentar además:

- un título resumido del trabajo, de máximo 9 palabras.
- La posición actual y un resumen del Currículum Vitae de los autores, con un máximo de 150 palabras. ●

5- Además de las que poseen signatura, se podrán colocar referencias inéditas o en prensa (indicando la revista en que se publicarán), comunicaciones personales y páginas web.