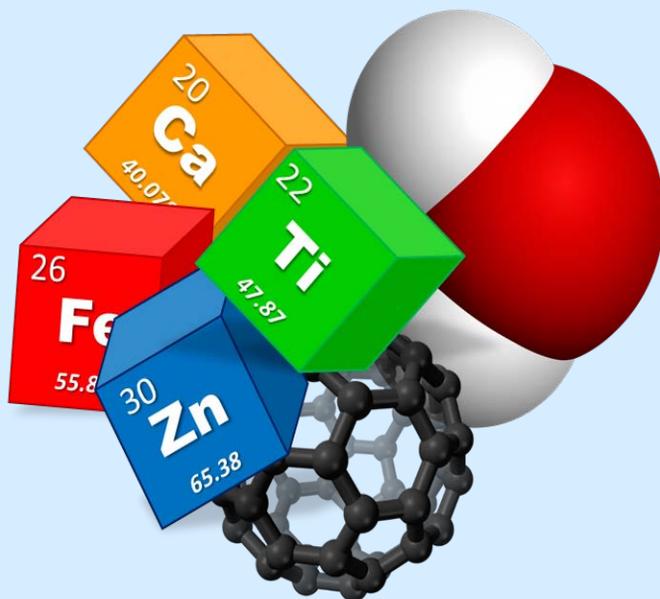


Vol. 110 N° 1



ISSN 2545-8655

ANALES DE LA ASOCIACIÓN QUÍMICA ARGENTINA



Enero - Diciembre 2023

Anales de la Asociación Química Argentina

Editada desde 1913

Editor en Jefe

Dr. Alberto Lazarowski

Vicedirectora Ejecutiva

Dra. Marisa Gabriela Repetto

Comité Asesor de Dirección de la Revista

Dr. Alan Talevi

Dr. Pablo Duchowicz

Comité Editorial

Dra. Alicia Fernández
Cirelli

Dra. Alicia B. Pomilio

Dr. Ángel Alonso

Dr. Alberto L. Capparelli

Dra. Norma B. D'Accorso

Dr. Arturo A. Vitale

Comité Académico Asesor

Dra. Aida Ben Altabef - Universidad Nacional de Tucumán - INQUINOA-CONICET

Dr. Ernesto Calvo – INQUIMAE (UBA-CONICET)

Dr. José Luis Crudo - Jefe Div. Radiofarmacia Básica y aplicada-CNEA

Dr. Carlos O. Della Védova – CEQUINOR (UNLP-CONICET)

Dra. Rosa Erra-Balsells – CIHIDECAR (UBA-CONICET)

Dra. Susana A. Larrondo - UNIDEF-MINDEF-CONICET

Dra. Marta Litter – CNEA-CONICET

Dra. Alicia Penissi – Instituto de Histología y Embriología “Dr. Mario H. Burgos”

Dr. Gustavo Romanelli - Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas

Dr. Rolando Spanevello – Instituto de Química de Rosario (UNR-CONICET)

Dra. Noemí E. Walsøe de Reca - UNIDEF-MINDEF-CONICET

Dr. Roberto J. J. Williams – INTEMA (UNMdP-CONICET)

Comité Científico Internacional

Prof. Sylvio Canuto - Instituto de Física da Universidade de São Paulo, Brasil

Prof. Juan M. Diez Tascón - Instituto Nacional del Carbón, INCAR-CSIC, Oviedo, España

Prof. José Elguero - Instituto de Química Médica, Cons. Sup. de Inv. Cient., Madrid, España

Prof. Ivan Gutman - Physical Chemistry, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

Prof. Arsenio Muñoz de la Peña - Universidad de Extremadura, Badajoz, España

Prof. Emeritus Francisco Tomás Vert - University of Valencia,

España Registro de Propiedad Intelectual N° 164.756

Asociación Química Argentina

Sánchez de Bustamante 1749, 1425 Buenos Aires, Argentina

Tel./FAX: 54-11-4822-4886

Contenido

Vol. 110, N° 1, Enero-Diciembre de 2023

CONTENIDO	Pág.
Editorial..... <i>Carlos O. Cañellas, Presidente de AQA</i>	4 - 5
<i>In Memoriam: Prof. Dr. Marcelo Jorge Vernengo (1930-2023).....</i> <i>Comisión Directiva de la Asociación Química Argentina</i>	6 - 8
Tributo a Marcelo Jorge Vernengo..... <i>Máximo Barón</i>	9 - 10
Anticuerpos y citoquinas en la inmunoterapia con <i>Periplaneta americana</i> <i>Ángel Alonso, Julio F. Albónico, Krikor Mouchián y Alicia B. Pomilio</i>	11 - 31
<i>Ilex paraguariensis</i> : Efecto sobre la actividad de la glicoproteína P Intestinal..... <i>Silvia Adriana Neirotti</i>	32 - 40
Evaluación electroquímica de recubrimientos de conversión de Ce sobre acero en ambiente marino con post tratamiento de Zn y resina epoxi <i>Gabriela P. Cicileo y Sergio E. Chichizola</i>	41 - 63
Optimización multiobjetivo utilizando GAMS para el estudio de caso del proceso de absorción de amoníaco en aire..... <i>Federico Durán Junger, Alejandra M. Manzur y María F. Laborde</i>	64 - 74
Ciclopéptidos tóxicos de <i>Amanita phalloides</i> que crece en Argentina: Extracción, identificación y cuantificación de amatoxinas y falotoxinas. Presencia de otros compuestos tóxicos.... <i>Stella M. Battista, Arturo A. Vitale, Ángel Alonso y Alicia B. Pomilio</i>	75 - 101
Wordlab y Euromedlab 2023: Comentarios sobre algunas presentaciones destacadas..... <i>Nilda E. Fink</i>	102 - 110

Content

Vol. 110, N° 1, Enero-Diciembre de 2023

CONTENT	Page
Editorial..... <i>Carlos O. Cañellas, President of AQA</i>	4 - 5
<i>In Memoriam: Prof. Dr. Marcelo Jorge Vernengo (1930-2023).....</i> <i>Directive Board of the Argentine Chemical Association</i>	6 - 8
Tribute to Marcelo Jorge Vernengo..... <i>Máximo Barón</i>	9 - 10
Antibodies and cytokines in immunotherapy with <i>Periplaneta americana</i> <i>Ángel Alonso, Julio F. Albónico, Krikor Mouchián, and Alicia B. Pomilio</i>	11- 31
<i>Ilex paraguariensis</i> : effect on the activity of intestinal P-glycoprotein.. <i>Silvia Adriana Neirotti</i>	32- 40
Electrochemical evaluation of Ce conversion coatings on steel in marine environments with Zn post treatment and epoxy resin..... <i>Gabriela P. Cicileo and Sergio E. Chichizola</i>	41- 63
Multi-objective optimization using GAMS for the case study of the ammonia absorption in air process <i>Federico Durán Junger, Alejandra M. Manzur, and María F. Laborde</i>	64 - 74
Toxic cyclopeptides from <i>Amanita phalloides</i> growing in Argentina: extraction, identification, and quantitation of amatoxins and phallotoxins. Occurrence of other toxic compounds <i>Stella M. Battista, Arturo A. Vitale, Ángel Alonso, and Alicia B. Pomilio</i>	75 - 101
Wordlab and Euromedlab 2023: Comments on some outstanding presentations..... <i>Nilda E. Fink</i>	102 - 110

Editorial

Pensar si es necesario realizar cambios es parte de los derechos que tenemos como integrantes de la sociedad en la cual vivimos.

Esta responsabilidad está asociada a lo que significa vivir en democracia que si bien no es un sistema perfecto aún no se ha implementado otro que la supere.

La necesidad de modificar algunos aspectos de nuestra vida ciudadana es algo que surge del concepto regidor de la democracia “la opinión de las mayorías”. Existen momentos en los cuales tenemos la posibilidad de expresarnos simultáneamente sin importar los niveles económico-sociales, la religión que profesamos, el nivel cultural al cual hemos llegado, nuestro ideario político, etc.

Esa fecha acostumbramos a denominarla como “día de elecciones” y es uno de los pocos momentos en los cuales todos los ciudadanos de un país somos iguales.

Hoy estamos a las puertas de una de estas fechas y necesitamos reflexionar de dónde venimos y hacia dónde queremos ir; encontrar el camino no es sencillo dado que cada individuo utiliza para el análisis distintas escalas de valores con distintas prioridades, pero no existen dudas que la gran mayoría apuesta por vivir mejor y con una calidad de vida acorde al medio en el cual actúa.

Dentro de la sociedad los ciudadanos realizan distintas funciones y entre estas está la Ciencia y Tecnología y, en consecuencia, la investigación y el desarrollo científico tecnológico.

No aceptar esto es como negar la realidad cerrando los ojos; ahora bien, no por ser parte de la comunidad científica somos más importantes que el resto. Tenemos no sólo los mismos derechos, sino que, además, las mismas obligaciones que el resto y por lo tanto podemos y debemos expresarnos en el contexto político actual.

Sería muy sencillo para los miembros de la Asociación Química Argentina defender el sistema científico enumerando quienes son nuestros Premios Nobel, contar que tenemos en la Universidad de Buenos Aires (UBA) a una de las mejores del mundo, que tenemos cada vez más universidades públicas en todo el país, que en el CONICET se forman cada vez más profesionales, que tenemos uno de los sistemas de evaluación científica más exigentes del mundo en donde nadie progresa por antigüedad sino que por sus méritos y así muchísimos más ejemplos.

Pero vamos a elegir otro método que es el contar a la sociedad que les dio el sistema científico y como se ven diariamente beneficiados con ellos.

Sin un sistema científico funcionando no tendríamos cultivos adaptados a nuestro clima (INTA), no tendríamos obras de ingeniería como las represas, los canales navegables, los puertos, todas ellas realizadas por nuestros profesionales, no tendríamos sistemas de control y validaciones industriales (INTI), no tendríamos energía nucleoelectrica con centrales nucleares únicas en el mundo por su eficiencia (Nucleoelectrica Argentina), no tendríamos terapia radiante ni diagnóstico radio isotópico (CNEA). La lista podría seguir mucho más, pero no hace al objetivo de esta nota.

Defender el sistema científico es defender la educación y salud pública, la independencia tecnológica; en resumen, la posibilidad de un acceso igualitario de toda la sociedad a los beneficios que la Ciencia y la Tecnología generan.

Crear que un sistema científico no es necesario es el comienzo de la decadencia como sociedad dado que sustituir el conocimiento adquirido por uno importado nos llevará irremediabilmente a no poder administrarlo con criterio.

¡Defender la Ciencia y la Tecnología es defender al país y, por lo tanto, a sus ciudadanos!

Dr. Carlos O. Cañellas
Presidente de AQA

In Memoriam: Prof. Dr. Marcelo Jorge Vernengo (1930-2023)

El 31 de marzo del corriente año falleció el Prof. Dr. Marcelo Jorge Vernengo, quien fuera Presidente de la Asociación Química Argentina entre los años 1994 y 2000, esforzándose por una decidida presencia internacional de la Institución, además de hacerse cargo de la Dirección de la revista *Industria y Química*, consolidándola como foro para la discusión de las más variadas opiniones sobre el desarrollo de la Química en el país y su relación con científicos regionales e internacionales. Durante esos años integró un Comité Especial de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*) destinado a establecer propuestas para la Armonización de Esquemas de Garantía de la Calidad de Laboratorios Analíticos.



El Dr. Vernengo alcanzó el título académico de Doctor en Ciencias Químicas (*Ph.D.*) en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN) de la Universidad de Buenos Aires (UBA) en 1955, con la presentación de la Tesis de Doctorado en Química Orgánica, sobre el tema: "Ésteres fenólicos de amino ácidos" (Tesis 0832), realizada bajo la dirección del Prof. Dr. Venancio Deulofeu, años después de haberse graduado de Licenciado en Ciencias Químicas en la misma Facultad. Posteriormente realizó su postdoctorado en la Universidad de Cambridge, en el Reino Unido, culminando en otro doctorado, es decir, el grado máximo de *Ph.D.*, de esa Universidad bajo la supervisión del Prof. Dr. John Harley-Mason, permaneciendo en Cambridge hasta diciembre de 1960.

Una vez completada esta etapa académica, retornó al país para realizar su fecunda labor en docencia e investigación en el Departamento de Química Orgánica de la FCEN, UBA desde 1961, siendo Profesor Asociado con dedicación exclusiva y el primer Químico Orgánico de la Carrera del Investigador del CONICET, recientemente creada. Posteriormente, entre 1969 y 1974, actuó como Profesor Titular de Química Orgánica III

de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, donde colaboró en 1991 hasta 1993 en el desarrollo de actividades interinstitucionales y el dictado de clases especiales sobre temas de Química Medicinal.

No sólo se destaca su labor académica en la docencia y formación de recursos humanos a través de la dirección de Becarios y Tesistas en Productos Naturales y Síntesis Orgánica siendo pionero en la aplicación de técnicas espectroscópicas para la dilucidación estructural de compuestos orgánicos, como resonancia magnética nuclear y espectrometría de masa en la Universidad de Buenos Aires, sino también en la organización y decanato de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Belgrano en 1996, que comenzó a funcionar al año siguiente con las Carreras de Química, Biología, Tecnología de Alimentos y Nutrición, incluyendo el Doctorado correspondiente.

Su labor en investigación se extendió a la estabilidad de medicamentos, con gran preocupación por establecer la Farmacovigilancia en nuestro país, llevando a cabo una re-estructuración muy efectiva en el entonces Instituto de Normalización y Contralor de Drogas y Medicamentos como Director (posteriormente renombrado primero como Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología y desde 1991 como Instituto Nacional de Medicamentos, actualmente formando parte de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica: ANMAT). Estableció inspecciones integrales realizadas por profesionales adecuadamente formados para evaluar si la producción de medicamentos se realizaba conforme a las normas, en esa época incorporadas a legislaciones nacionales basadas en recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud.

Su variada actividad de gestión incluye la participación en organismos nacionales internacionales, como: Consultor de la Farmacopea de los Estados Unidos en el Cono Sur, Consultor de la Organización Panamericana de la Salud, Miembro y Consultor del Comité de Expertos sobre Especificaciones de Medicamentos de la Organización Mundial de la Salud en Ginebra, Miembro de la Royal Society of Chemistry, de la American Chemical Society y de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.

Su posterior incorporación al Colegiado Directivo de la Asociación Argentina para el Progreso de la Ciencia muestra, una vez más, su inquietud permanente por la Ciencia y su difusión. Su interés por la Educación en general y por la enseñanza de las Ciencias en particular le valió su incorporación en 1999 como Miembro de Número de la Academia Nacional de Educación y el nombramiento como Académico Emérito desde el 1º de agosto

de 2016. Asimismo, fue incorporado como Miembro de la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU), desde el 2004 hasta el 2015.

Se destacan su capacidad multifacética, su vocación por la Ciencia, brillantez, cualidades humanas y capacidad para interactuar con diferentes personas.

Fue uno de los pioneros y “padres fundadores” de la Química. Y sobre todo fue un hombre de bien!!

Comisión Directiva de la Asociación Química Argentina

TRIBUTO A MARCELO JORGE VERNENGO

Máximo Barón

¿Cómo hablar de alguien que se conoció, trató y apreció, prácticamente desde siempre?

Esto es lo que me sucede con mi amigo Marcelo, de quien ya se habló y escribió en varias oportunidades describiendo en detalle muchas de sus actividades, intereses y logros. Como ejemplo, basta con mencionar lo publicado oportunamente en la revista *Ciencia e Investigación* [1].

En realidad, era una autobiografía con las características típicas de quien se siente algo incómodo con la luz sobre su cabeza. Por decirlo de alguna manera.

Entonces, que puedo decir yo de él sin caer en la repetición de lo ya dicho por él mismo y por otros.

Después de pensarlo y de recordar las muchas horas que dedicamos a hablar y discutir los temas más diversos, llegué a la conclusión de que a pocos como a él le cabe el título de HOMBRE DEL RENACIMIENTO (RENAISSANCE MAN), Que según la definición de su creador (Publio Terencio Africano 185-159 a. C.) es simplemente, un hombre a quien nada de lo humano le es ajeno. Y esta descripción es la que mejor le cabe a Marcelo Jorge Vernengo porque en su viaje por esta vida, *casi nada humano le fue ajeno*.

Según sus propias palabras nació en un hogar donde el estudio, el conocimiento, la curiosidad y el interés por la realidad en que vivían eran motivo de discusión y análisis permanentes. Todo contribuyó a darle a Marcelo esa formación amplia que, con sus estudios desde la Goethe Schule, con el acceso al alemán, su paso por el Colegio Nacional de Buenos Aires, la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires y los años en la Universidad de Cambridge del Reino Unido de la Gran Bretaña lo prepararon para las numerosas actividades que pudo encarar.

Pronto se volcó a la investigación científica en el campo de la síntesis orgánica, al uso de métodos físicos para el estudio de estructuras moleculares y al estudio de productos naturales. Tema en el que publicó numerosos trabajos.

Se inició tempranamente en la docencia universitaria y en la dirección de trabajos de tesis. Actividad que continuó durante mucho tiempo, incluso cuando se desempeñó en organismos nacionales e internacionales, como el Instituto Nacional de Medicamentos, que luego formó parte de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica – ANMAT y la Organización Panamericana de la Salud. Su experiencia en estos temas lo llevó a la Subsecretaría Adjunta de Regulación y Control y a integrar una Comisión encargada de redactar un proyecto de ley sobre patentamiento de medicamentos. Además de actuar como consultor de organismos nacionales, lo fue también del *Instituto de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)* en Rio de Janeiro.

Pero su interés por la enseñanza se mantuvo tan firme que lo llevó a organizar la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Belgrano, que comprendió cuatro carreras: Nutrición, Farmacia, Tecnología de Alimentos y Química.

En esta tarea volcó toda su experiencia en los distintos temas incluyendo asignaturas como Epistemología con el objeto de estimular en los alumnos una comprensión integral de las ciencias experimentales y de la naturaleza como una parte importante de su formación.

Todo lo dicho justificó plenamente su incorporación como Miembro de Número a la Academia Nacional de Educación. Esto unido a su presidencia de la Asociación Química Argentina y su incorporación a la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (Coneau), a su dominio de varios idiomas, publicaciones sobre temas de ciencia y educación y amplias inquietudes culturales completan la visión de este colega de cualidades excepcionales para quién la definición de *HOMBRE DEL RENACIMIENTO* está plenamente justificada, y quienes tuvimos el privilegio de compartir muchos años de su vida sentiremos penosamente su ausencia.

1. Barón M. Semblanza: Marcelo Jorge Vernengo. *Ciencia e Investigación* 2014; 2 (2): 27-28. ([4MarceloJorgeVernengoResN2-2-2014-5.pdf](#)).

ANTICUERPOS Y CITOQUINAS EN LA INMUNOTERAPIA CON *PERIPLANETA AMERICANA*

Ángel Alonso*¹, Julio F. Albónico², Krikor Mouchián³, Alicia B. Pomilio.⁴

¹⁻²⁻³ División Alergia e Inmunología, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Universidad de Buenos Aires (UBA), Av. Córdoba 2351, C1120AAF Buenos Aires, Argentina.
aalonsomed@gmail.com.

⁴ Departamento de Bioquímica Clínica, Área Hematología, Hospital de Clínicas "José de San Martín", UBA, Buenos Aires, Argentina. abpomilio@sinectis.com.ar; pomilio@ffyb.uba.ar.

Sociedad Científica Argentina- Asociación Química Argentina. Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires.

* Ángel Alonso aalonsomed@gmail.com.

Recibido: 3 de abril de 2023

Aceptado: 31 de mayo de 2023

Resumen

Se exponen los resultados obtenidos en la inmunoterapia con antígenos de la cucaracha *Periplaneta americana* a pacientes alérgicos a la misma, al igual que aspectos bioquímicos de estos antígenos y su importancia epidemiológica al ser componentes del "polvillo habitacional" y constituirse en uno de los factores más importantes del asma bronquial infantil y adulta.

Palabras Clave: *Inmunoterapia; antígenos de Periplaneta americana; asma bronquial infantil.*

Antibodies and cytokines in immunotherapy with *Periplaneta americana*

Abstract

The results of immunotherapy with antigens from the *Periplaneta americana* cockroach to patients allergic to it are shown. The biochemical aspects of these antigens and their epidemiological importance as components of "household-dust" and one of the most relevant factors in childhood and adult bronchial asthma are also discussed.

Keywords: *immunotherapy; Periplaneta americana antigens; children bronchial asthma.*

1. Introducción

Las reacciones de hipersensibilidad al "polvillo habitacional"(PH), "polvillo doméstico" o "polvo de la casa" en especial aquellas relacionadas con el árbol respiratorio (rinitis perenne y asma bronquial) son bien conocidas en el mundo entero [10-11]. Su empirismo inicial (en la Argentina con Luis Ayerza en 1921), encontró sólido sustento con el hallazgo de Voorhorst (1964) vinculado con el ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* [20-38].

Sin embargo, la heterogeneidad del PH es enorme pues incluye a restos esqueléticos, detritus, excretas, mudas y otras secreciones o productos metabólicos de numerosos insectos, hongos anemófilos, pólenes, plumas, pelos, escamas, saliva, orina, deyecciones y proteínas varias provenientes de los animales domésticos.

Todo esto corrobora que el PH es representativo del hábitat del sujeto afectado. Considerando que la cucaracha es un insecto extraordinariamente frecuente en los hogares urbanos y suburbanos más allá de la condición socioeconómica de su morador, no parece descabellado pensar que sus proteínas formen parte del PH e induzcan en el ser humano, preferentemente atópico hiperproductor de IgE, anticuerpos específicos que puedan gatillar los fenómenos de hipersensibilidad del tipo I o amplificar una inflamación crónica de la mucosa respiratoria.

Dentro de la clasificación entomológica general, la cucaracha pertenece al orden Blattodea (del latín *Blatta*: cucaracha y del griego *eidés*: “que tiene aspecto de”), familia Blattidae que abarca a los insectos aplanados, de carrera rápida, con antenas largas y delgadas, ojos bien desarrollados y aparato bucal masticador con mandíbulas [48].

En las especies con alas bien desarrolladas, ambos pares tienen muchas venas y un gran número de vasos transversales. El par anterior, más estrecho, engrosado y coriáceo o apergaminado, llamado tégmenes, sirve principalmente como cubierta para el par posterior cuando no vuelan, mientras que el par posterior de alas, es delgado, mucho más grande, usado principalmente durante el vuelo, permaneciendo plegadas en forma de abanico bajo los tégmenes, cuando no se emplean.

Muchas especies sólo tienen alas rudimentarias o carecen totalmente de ellas. El protórax es grande y oculta gran parte de la cabeza. El abdomen es voluminoso, muy segmentado y lleva un par de cercos apicales.

En América, esta familia está representada por unas 70 especies; en todo el mundo se conocen más de 2000 especies. Las cucarachas se han ajustado muy bien a vivir con el hombre; son una de las más desagradables plagas de las habitaciones humanas.

Se esconden en grietas y hendiduras que les proporcionan los métodos humanos de construcción. Se encuentran en muchas clases de alimentos, comen parte de los mismos, los decoloran y manchan con sus materias fecales, dejando tras de ellos un desagradable olor. Se ha sabido de cucarachas que han mordisqueado los párpados, así como, las uñas de las manos y los pies de niños dormidos.

Son además, portadoras de organismos que causan enfermedades entéricas (Salmonelosis y Disentería bacilar) que llevan desde las alcantarillas y botes de basura hasta el alimento del

hombre; ocasionalmente, se las ha encontrado infectadas con otros organismos patógenos como los de la tuberculosis, de la lepra, ciertos virus, protozoarios y hongos patógenos.

Por ser de hábitos nocturnos, y que se dejan ver a la luz del día solamente cuando se las inquieta o molesta, poco pensamos en ellas como agentes productores de enfermedades.

Las cucarachas tienen pocos enemigos naturales y pueden sobrevivir en cocinas y restaurantes muy higiénicos.

Son viajeras muy cabales que se han esparcido por todo el mundo llevadas por buques y aviones. En nuestro país, 3 especies cosmopolitas son las más abundantes: la pequeña cucaracha alemana o *Blattella germanica* (la más común en las cocinas y en los baños); la cucaracha oriental o *Blatta orientalis* (de mayor tamaño y abundante en los sótanos húmedos y a lo largo de las líneas de drenaje), y, la cucaracha americana o *Periplaneta americana* - (Pa) - (la más grande de las 3 y frecuente en los tiraderos de basura de las grandes ciudades), objeto de este estudio.

Se presentan los resultados obtenidos en el aislamiento y caracterización de los antígenos de la *Periplaneta americana* a punto de partida de un extracto elaborado con el exoesqueleto y formaciones queratinizadas del insecto; su capacidad alergénica en humanos atópicos y controles no-atópicos induciendo la síntesis de un anticuerpo IgE específico detectado por métodos *in vivo* e *in vitro*, y, por último, la cuantificación de anticuerpos IgG e IgE anti-cucaracha, después de 3 años de inmunoterapia parenteral con los antígenos de este insecto (IT) al igual que, las modificaciones de los valores séricos de las citoquinas IL-2 e IL-4 y del receptor para ésta última (IL-4R o CD124).

También se adjuntan las valoraciones clínicas de los grupos sometidos a la IT, en comparación estadística con los controles atópicos no inoculados, que son demostrativos de la utilidad de la inoculación repetida de las glucoproteínas aisladas de la cucaracha *Periplaneta americana*.

2. Materiales y Métodos.

1.-Antígeno: Un extracto total de la cucaracha *Periplaneta americana*, fue preparado por nosotros siguiendo la metodología descrita oportunamente por Frugoni y Hansen. Los insectos fueron cuidadosamente seleccionados de acuerdo a las normas entomológicas preestablecidas y se tuvo especial cuidado con procesar las estructuras quitinosas del exoesqueleto del insecto. Este extracto total fue sometido a diversos pasajes por columnas de Sephadex y de DEAE-celulosa [2,21,27,30].

2.- Fraccionamiento por columna de Sephadex: Se utilizó una columna de Sephadex G-200 que tenía 780 mm por 22 mm y que se equilibró y se eluyó con buffer fosfato y ClNa 0,15 M a pH 8 y a 4°C. Tres y medio mililitros del extracto crudo fueron sembrados y alícuotas de un mililitro de eluido fueron recogidas en el colector de fracciones con una velocidad de 20 mL/min. El contenido proteico de cada eluido fue determinado por absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Uvicord-LKB; los contenidos en hexosas fueron establecidos por el método del indol que emplea una mezcla de galactosa-manosa como estándares a 470 nm de densidad óptica en el espectrofotómetro [28-49-50].

3.- Fraccionamiento por columna de DEAE-celulosa: Cinco mililitros del extracto total de *Periplaneta americana* fueron dializados contra un buffer de fosfato (pH 8 y 0,01 M) y luego fueron filtrados a través de una columna de DEAE-celulosa de 380 mm por 25 mm. La elución ulterior fue realizada con un buffer de fosfato entre pH 8 y pH 6 con molaridades variables entre 0,01 y 0,5 M. Los contenidos de proteínas y de hexosas fueron registrados espectrofotométricamente, como se describió más arriba.

4.- Determinación cuantitativa de las proteínas: Se aplicó para la detección cuantitativa de las proteínas el método del Lowry, para el extracto total de *Periplaneta americana* y en cada una de las fracciones eluidas [32,44].

5.- Pesos moleculares: Una serie de proteínas de peso molecular conocido usadas como marcadores proteicos, tales como, la anhidrasa carbónica (PM: 29 kDa); la albúmina sérica bovina (PM: 66 kDa); la alcohol dehidrogenasa (PM: 150 kDa); la *beta*-amilasa (PM: 200 kDa); la apoferritina (PM: 443 kDa) y la tiroglobulina (PM: 669 kDa) (Sigma Chemical Co.- lote 125F6005) se aplicaron a una columna de Sephadex G-200. Esta columna de 780 mm por 22 mm se equilibró y se eluyó con un buffer PBS-ClNa 0,15 M a pH 8 y a 4°C.

Un mililitro de cada sustancia fue recogido y sometido al espectrofotómetro LKB Uvicord a una densidad óptica de 280 nm. La concentración proteica de los marcadores fue de 13,5 mg en un volumen de 1,5 mL mientras que el extracto total tenía 147 mg en un volumen de 3,5 mL (42 mg/mL) [19].

6.- Pacientes a estudiar: Treinta y dos sujetos atópicos, 19 mujeres y 13 varones con edades comprendidas entre los 22 y los 57 años, padeciendo de rinitis perenne y de asma bronquial fueron seleccionados en un todo de acuerdo con los criterios establecidos por la Sociedad Americana del Tórax.

Todos eran residentes de la ciudad de Buenos Aires y del Gran Buenos Aires, y fueron incluidos en el estudio en base a los siguientes parámetros: a) Historia clínica indubitable en lo relativo a antecedentes familiares y personales de enfermedades atópicas (rinitis, asma, eccema, urticaria, angioedema y dermatitis ecematososa por contacto); b) cuadro clínico positivo en la actualidad con signos y síntomas inequívocos; c) vírgenes de todo tratamiento inmunoterápico con aero-alergenos ubícuos del habitat; d) niveles séricos elevados de la IgE total por encima de 120 KU/L, y e) pruebas cutáneas intradérmicas inmediatas positivas al PH y al extracto de *Periplaneta americana* (ambos 1/100) en comparación con los habones testigo de solución fisiológica (negativo) y de histamina 1/1000 (positivo).

De este grupo, 10 pacientes recibieron IT con Pa, 10 fueron inoculados con el antígeno purificado Pa-1 y los 12 restantes no recibieron ninguna clase de IT constituyéndose en el grupo control de la población atópica.

El grupo control no-atópico estuvo compuesto por 25 personas, 13 mujeres y 12 varones, con edades entre los 26 y 48 años, con similar residencia, que consultaron en nuestro Centro por signo-sintomatología pseudoalérgica no vinculada con un mecanismo IgE dependiente. No tenían antecedentes familiares y/o personales de enfermedades atópicas y su IgE sérica total fue inferior a 70 KU/L.

Las pruebas cutáneas con 5 aero-alergenos seleccionados por su incidencia (p.ej. ácaros, pelos y escamas del gato y del perro, cucaracha y *Alternaria*) resultaron totalmente negativas.

Los pacientes del grupo experimental padecían empeoramiento sintomático con la exposición al polvillo habitacional y su sufrimiento era perenne, anual, con muy escasa mejoría durante los meses del verano.

Las viviendas de los pacientes de ambos grupos eran en su totalidad de construcción convencional con materiales apropiados, pero todos reconocieron tener cucarachas en sus cocinas o habitaciones domiciliarias y la necesidad de combatirlas principalmente en el verano.

Se tuvo especial cuidado en advertir a los pacientes que, durante la testificación cutánea no ingirieran antihistamínicos desde 7 días antes.

7.- Pruebas cutáneas: En todos los pacientes se practicaron intradermorreacciones en la piel de la cara externa del brazo empleando implementando habones de 0,02 mL con agujas descartables de 13 x 0,4 mm. Además del PH, se utilizaron el extracto total de Pa y su antígeno Pa-1 obtenido del pasaje por columnas de Sephadex G-200 y de DEAE-celulosa, correspondiendo a la sumatoria de los picos glucoproteicos relevantes [17,24,29,37].

En cada habón se inocularon 8 mcg de proteínas puras antigénicas provenientes de Pa.

Todos los antígenos fueron esterilizados por filtración a través de membranas de Millipore de 0,22 μm . Habones controles de solución fisiológica pH 7,2 estéril y de fosfato de histamina diluída al 1/1000 acompañaron a los anteriores.

La lectura de las intradermorreacciones se realizó a los 20 minutos midiendo el eritema y la pápula originada. Tomando como referencia a la reactividad del habón histamínico que alcanzó su máxima respuesta entre los 15 y los 20 minutos, los otros habones se codificaron de la siguiente manera a los fines de simplificar la nomenclatura: de 1 a 4 mm: 1 cruz; de 5 a 9 mm: 2 cruces; de 10 a 14 mm: 3 cruces y más de 15 mm: 4 cruces.

Los pacientes testificados permanecieron durante una hora en observación después de leídos los resultados de las pruebas cutáneas a fin de valorar y controlar eventuales reacciones adversas en los sujetos muy sensibles a los alergenicos.

Las pruebas siempre se realizaron por la mañana y por la misma persona [18,46].

8.-Radioinmunoensayos: La IgE sérica total de los pacientes fue determinada por el método del PRIST siguiendo estrictamente las especificaciones del fabricante (Phadebas, Uppsala, Suecia). Los resultados se expresaron en KU/L. Para dosar IgE e IgG específicas anticucaracha (anti-Pa y anti-Pa-1) se desarrolló la técnica del RAST siguiendo los pasos establecidos por Ceska oportunamente. Los resultados se expresaron en PRU/mL (Phadebas Rast Units: clase 0: menor a 0,35 PRU/mL sin significación; clases con significación creciente: entre 0,35-0,70 PRU/mL es clase 1; entre 0,70-3,50 PRU/mL es clase 2; entre 3,50-17 PRU/mL es clase 3; entre 17-50 PRU/mL es clase 4 y entre 50-100 PRU/mL es clase 5, y por último, más de 100 PRU/mL es clase 6. La IgG se expresó en UI/mL (unidades internacionales/mL).

Sintéticamente, se procedió de la siguiente manera: tanto el extracto total como el antígeno Pa-1 en concentraciones proteicas de 15 mg/mL, constituyeron las fases sólidas respectivas, al unirse covalentemente a discos de celulosa (SS547) con bromuro de cianógeno a pH 11 durante 2 horas en un medio alcalino. Los sitios de las membranas que no reaccionaron fueron bloqueados durante una hora por un buffer compuesto por fosfato 0,2 mol/L, pH 7,5, albúmina sérica bovina al 5% y Tween 20 al 2 % en agua destilada 1/5. Luego fueron lavadas con PBS-Tween 0,01% e incubadas durante toda la noche con una dilución 1/8 de los sueros de los pacientes. Estos reactantes fueron lavados con un buffer-bloqueador y las membranas incubadas con 50.000 c.p.m. de anti-IgE-(o anti-IgG). Iodo¹²⁵ (Pharmacia, Uppsala, Suecia) diluída 1 mL del buffer por toda la noche y luego de lavadas nuevamente su radioactividad se midió en el contador gamma. Siempre se utilizaron controles de cada experiencia con sueros normales [16,47].

Con el propósito de asegurar la especificidad de la respuesta inmune se desarrolló el RAST-INHIBICION, de acuerdo a la técnica de Gleich.

Además de las absorciones de los sueros anti-cucaracha con su antígeno específico desde la dilución 10⁻⁶ hasta el concentrado se utilizaron otros alérgenos no relacionados, tales como, los pólenes de *Ambrosia* y *Lolium perenne* y el pelo de gato concentrados.

9.- Inmunoterapia específica: Fue llevada a cabo mediante la inoculación subcutánea semanal durante 3 años en dosis (de 0,05 a 0,50 mL) y en diluciones crecientes (desde 1:10.000 hasta 1:10) del extracto total de Pa y de su antígeno Pa-1 [12,13,15]. Los 20 pacientes atópicos fueron divididos en 2 grupos (A y B) de 10 enfermos cada uno. El grupo A recibió Pa y el B, Pa-1. En ambos casos, la dosis inicial fue de 1,5 mcg de proteína pura y la más elevada la de 1,5 mg.

A lo largo de toda la inmunización, cada paciente recibió una cantidad total de 1,5 g de proteína pura de cada antígeno. Después de cada inoculación, todos los pacientes permanecieron, por lo menos, 30 minutos en el lugar, para prevenir cualquier efecto adverso inesperado.

10.- Dosajes séricos de las IL-2, IL-4 y del receptor para la IL-4 (IL-4R): A cada paciente se le extrajeron 10 mL de sangre venosa antes de iniciar la inmunoterapia, y a cada intervalo de un año de mantenimiento de la misma con lo cual se totalizaron 4 muestras de cada paciente. Estos sueros se guardaron a -20°C hasta ser empleados en la cuantificación de las IL-2 e IL-4 circulantes mediante los equipos ELISA provistos por INMUNO TECH.

Los niveles del IL-4R se detectaron por RIA merced a un antisuero contra el CD124 marcado por nosotros (Gentileza Dr. Luis M. Scavini) con I¹²⁵ siguiendo el método de Ceska.

Las sensibilidades de los equipos para IL-2 son del orden de los 5 pg/mL, para la IL-4 de 1 pg ó 10 UI y para el IL-4R de 7 pg/mL. Estos equipos detectan entre 0 y 4000 pg/mL de cada citoquina y del receptor (formas solubles o sIL-2, sIL-4 y sIL-4R). La purificación de los mismos ha minimizado la posibilidad de interferencias y de falsos positivos o negativos.

11.-Evaluación clínica: La valoración de los síntomas de la rinitis atópica se llevó a cabo en cada paciente antes de la inmunoterapia, y con intervalos de un mes hasta la finalización de la a anotaba el número de ataques de estornudos, la intensidad de la obstrucción nasal y de la rinohidrorrea, mediante la siguiente escala: **0:** ni estornudos, ni rinohidrorrea ni obstrucción nasal; **1:** de 1 a 5 ataques de estornudos; de 1 a 5 veces sonarse la nariz con obstrucción nasal,

pero sin respiración bucal; **2**: de 6 a 10 ataques de estornudos y el sonarse la nariz con obstrucción nasal y ocasional respiración bucal, y **3**: más de 11 ataques de estornudos y sonarse la nariz con evidente obstrucción y respiración bucal.

Por ello, es que se permitió el empleo de aerosoles broncodilatadores (β_2 agonistas) *ad-libitum*, y, con corticoides en forma regular. No se autorizaron aerosoles nasales ni fármacos anti-H1 *per os*.

12.-Análisis estadístico de los resultados: La comparación entre los grupos en estudio fue realizada por medio del método *t* de Student y del análisis de la varianza. Todos los métodos estadísticos presentaban 2 colas; el valor de la $p < 0,05$ fue considerado de significación.

3. Resultados

El fraccionamiento del extracto total de *Periplaneta americana* (Pa) por la columna de Sephadex G-200 permitió obtener un pico proteico notable entre los tubos 83 y 113 y 3 picos con alto contenido en hexosas que correspondieron a los tubos 12, 64 y el 84-112, y algunos otros picos pequeños de escasa significación hidrocarbonada (**Fig. 1A y B**).

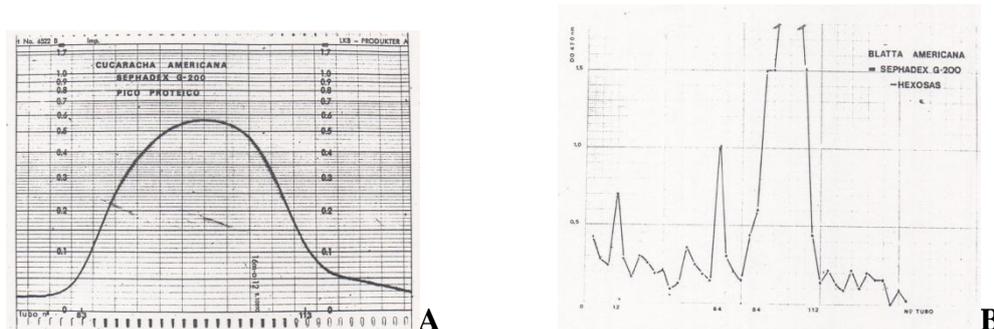


Figura 1: Pasaje del extracto de *Periplaneta americana* por columna de Sephadex G-200. (A) Se observa un único pico proteico entre los tubos 83 y 113. (B) Se observan tres picos de hexosas correspondientes a los tubos 12, 64 y 84-112.

El fraccionamiento del extracto total de Pa por DEAE-celulosa reveló un pico proteico entre los tubos 190 y 290 que eluyó con buffer fosfato 0.1 M pH 8. Las hexosas denotaron 3 picos en los tubos 70, 100 y 150 (**Fig. 2A y B**).

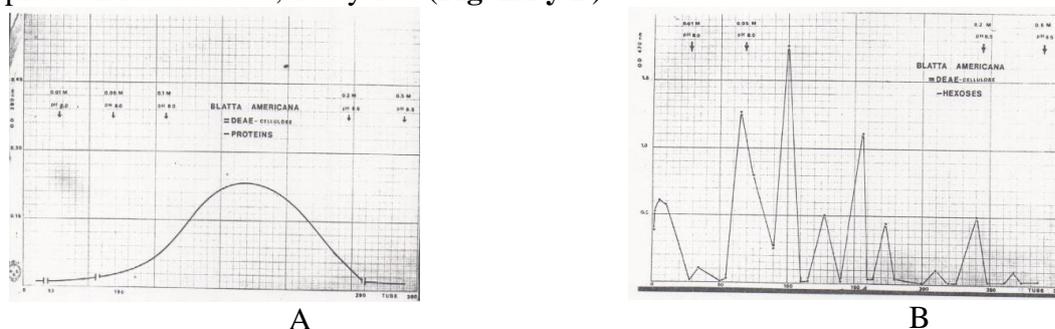


Figura 2: Pasaje del extracto de *Periplaneta americana* por columna de DEAE-celulosa. (A) Se observa un notable pico proteico entre los tubos 190 y 290. (B) Se observan siete picos de hexosas. Los cambios de pH y molaridad se indican con flechas.

La determinación cuantitativa de proteínas en el extracto y en las fracciones obtenidas por cromatografía arrojó los siguientes resultados:

Extracto concentrado de *Periplaneta americana*: 42 mg/mL.

Sephadex G-200, tubo 12: 50 mcg/mL.

Sephadex G-200, tubo 65: 150 mcg/mL.

Sephadex G-200, tubo 76: 180 mcg/mL.

Sephadex G-200, tubo 78: 100 mcg/mL.

Sephadex G-200, tubo 100: 600 mcg/mL.

Sephadex G-200, tubo 123: 370 mcg/mL.

Sephadex G-200, tubo 240: 2000 mcg/mL.

En el estudio del peso molecular, se registraron 6 picos correspondientes a Albúmina sérica bovina, Anhidrasa carbónica, Alcohol dehidrogenasa, beta-Amilasa, Apo-ferritina y Tiroglobulina, cuyos pesos moleculares se vuelcan en la Fig. 3.

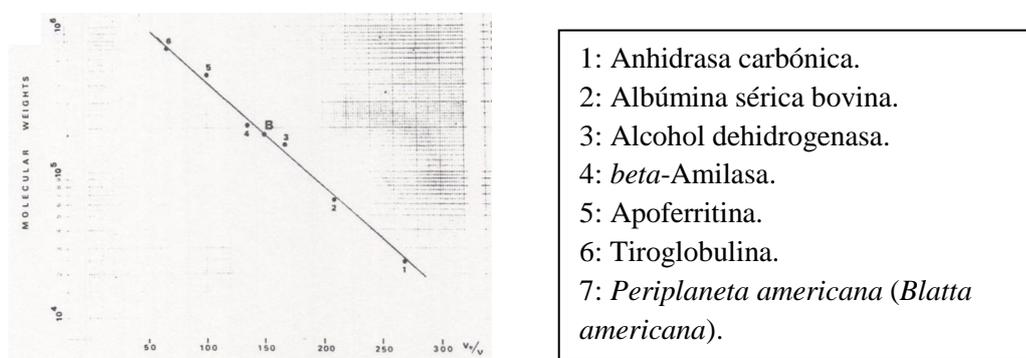


Figura 3: Pesos moleculares de marcadores proteicos y del extracto de Pa. Escala semilogarítmica.

Tras la obtención de precipitinas en las inmunodifusiones entre el sistema Albúmina sérica bovina-anti-Albúmina-sérica bovina, por un lado, y el sistema Pa-anti-Pa de conejo, por el otro, los hallazgos fueron transportados a una escala semilogarítmica con el volumen de elución en la abscisa. El valor extrapolado por aproximación para el extracto concentrado de Pa fue de 180 kD. La Pa mostró precipitinas luego del pico de la Alcohol-dehidrogenasa (PM: 150 kD) al ser testificada contra su antisuero específico de conejo.

La determinación de los valores de las hexosas arrojó los siguientes resultados:

Sephadex G-200, tubo 12: 700 mg %.

Sephadex G-200, tubo 64: 1000 mg %.

Sephadex G-200, tubo 84-112: 3500 mg %.

DEAE-celulosa, tubo 70: 1250 mg %.

DEAE-celulosa, tubo 100: 1750 mg %.

DEAE-celulosa, tubo 150: 1100 mg %.

Resultados en humanos:

Luego de realizar las pruebas cutáneas convencionales, los pacientes del grupo control no-atópico ($n = 25$) resultaron totalmente negativos a los alérgenos utilizados (Pa y Pa-1); los atópicos ($n = 32$) mostraron reactividad significativa tanto al extracto total como al antígeno purificado (**Tabla 1**).

Tabla 1: Positividad de las pruebas cutáneas intradérmicas

ANTÍGENO	PACIENTES ATÓPICOS <i>n=32</i>					CONTROL NO ATÓPICO <i>n=25</i>		
	Neg.	1 ⁺	2 ⁺	3 ⁺	4 ⁺	neg.	1 ⁺	2 ⁺
Pa	0	1	9	9	13	23	2	0
Pa-1	0	0	9	14	9	25	0	0

Nota: la significación de estas pruebas se valora a partir de 2+ (5-9 mm) (ver texto).

La IgE sérica total (PRIST) de los 32 pacientes atópicos reveló un promedio poblacional de 320 KU/L, con extremos entre 120 y 600 KU/L, mientras que, los sueros del grupo control ($n =25$) presentaron valores comprendidos entre las 16 y 70 KU/L.

Los valores de las IgE específicas (RAST) anti-Pa y anti-Pa-1, al igual que, los valores de las IgG específicas (RAST) anti-Pa y anti-Pa-1, antes y después de la inmunoterapia con Pa y con Pa-1, a lo largo de 3 años, se exponen en las **Tablas 2 y 3**, las que consignan, además, los datos de significación estadística (valor de p) entre los hallazgos basales y luego de cada año de inmunoterapia.

Tabla 2: Valores de la IgE sérica total y de las IgE e IgC específicas antes y después de la inmunoterapia con Pa ($n = 10$).

	BASAL	1º Año	2º Año	3º Año
IgE total (PRIST) KU/L	245 ± 111	262 ± 120 Ns	199 ± 86 ns	189 ± 83 Ns
IgE –anti-Pa PRU/ml	1,22 ± 0,66	1,59 ± 0,52 $p=0,2$	1,68 ± 0,59 $p>0,1$	0,96 ± 0,27 $p>0,2$
IgE –anti-Pa-1 PRU/ml	0,98 ± 0,35	1,47 ± 0,50 $p<0,02$	1,35 ± 0,44 $p<0,01$	0,86 ± 0,25 Ns
IgE –anti- Pa UI/ml	26,8 ± 32,8	114,7 ± 100,6 $p=0,02$	239,0 ± 147,1 $p<0,001$	300 ± 178 $p<0,001$
IgE –anti-Pa-1 UI/ml	30 ± 19	66,7 ± 46,7 $p<0,05$	167 ± 106 $p<0,001$	246 ± 92 $p<0,001$

Por su parte, el RAST-INHIBICION a los sueros humanos certificó la especificidad de la reacción inmunológica al provocarse una inhibición variable entre el 80% y el 92% al agregarse concentraciones del antígeno de cucaracha a partir de 10^{-3} . La inhibición con otros antígenos empleados como controles fue irrelevante (v.g. *Ambrosia*, *Lolium* y pelo de gato) ya que a idénticas concentraciones no sobrepasó del 10 %.

Tabla 3: Valores de la IgE sérica total y de las IgE e IgC específicas antes y después de la inmunoterapia con Pa-1 ($n = 10$).

	BASAL	1° Año	2° Año	3° Año
IgE total (PRIST) KU/L	256 ± 109	292 ± 153 Ns	259 ± 109 ns	216 ± 93 ns
IgE –anti-Pa PRU/ml	0,80 ± 0,25	1,33 ± 0,57 $p=0,02$	0,95 ± 0,43 ns	0,66 ± 0,34 ns
IgE –anti-Pa-1 PRU/ml	0,66 ± 0,29	1,16 ± 0,38 $p<0,01$	0,70 ± 0,15 ns	0,50 ± 0,16 ns
IgE –anti-Pa UI/ml	10,7 ± 7,7	94,4 ± 55,0 $p=0,001$	314,0 ± 246,7 $p<0,005$	366,0 ± 184,2 $p<0,001$
IgE –anti-Pa-1 UI/ml	18,7 ± 19,1	85,7 ± 48,4 $p<0,002$	186,0 ± 88,5 $p<0,001$	290 ± 122 $p<0,001$

Dosajes de citoquinas séricas: Los valores de IL-2, IL-4 e IL-4R se consignan en las Tablas 4, 5 y 6; las IL-2 e IL-4 se midieron en UI/mL mientras que el IL-4R lo fue en c.p.m. (cuentas por minuto). En todos los casos, la primera columna expone los valores basales o pre-inmunoterapia, y luego, los valores secuenciales de cada toma anual durante la vacunoterapia hasta los 3 años.

Tabla 4: Valores séricos de IL-2, IL-4 y del IL-4R (CD 124) antes y después de la inmunoterapia con Pa ($n = 10$).

	BASAL	1° Año	2° Año	3° Año
IL-2 (U/mL)	173 ± 118	189 ± 111 ns	166 ± 75 ns	84 ± 48 $p=0,05$
IL-4 (U/mL)	181 ± 116	237 ± 149 ns	239 ± 109 ns	99 ± 21 $p=0,05$
IL-4R (CD 124) (c.p.m.)	2660 ± 975	2898 ± 1227 ns	2905 ± 1164 ns	740 ± 512 $p<0,001$

La significación estadística se consigna siempre entre el valor basal o pre-inmunoterapia y los dosajes anuales post-inmunoterapia. La **Tabla 6** expone los valores de las citoquinas y del receptor de los 25 pacientes no-atópicos, y el grado de significación se establece con los hallazgos basales pre-inmunoterapia de los atópicos, así como, se realiza luego la comparación estadística entre esos datos de los no-atópicos y los resultados finales de los vacunados luego de 3 años

Tabla 5: Valores séricos de IL-2, IL-4 y del IL-4R (CD 124) antes y después de la inmunoterapia con Pa-1 ($n = 10$).

	BASAL	1° Año	2° Año	3° Año
IL-2 (U/mL)	168 ± 119	211 ± 72 ns	160 ± 114 ns	88 ± 45 $p=0,05$
IL-4 (U/mL)	152 ± 70	263 ± 92 $p=0,01$	147 ± 75 ns	104 ± 34 $p=0,05$
IL-4R (CD 124) (c.p.m.)	2070 ± 437	2539 ± 617 $p<0,05$	2110 ± 429 ns	1550 ± 302 $p<0,01$

Tabla 6: Valores de IL-2, IL-4 y del IL-4R (CD 124) séricos después de los controles no atópicos y sus comparaciones con los atópicos no vacunados (basales) y los vacunados después de 3 años.

	NO ATÓPICOS ($n=25$)	GRADO DE SIGNIFICACIÓN (BASALES)	GRADO DE SIGNIFICACIÓN (3 AÑOS)
IL-2 (U/mL)	119 ± 91	$p<0,2$	$p=0,2$
IL-4 (U/mL)	86 ± 44	$p<0,02$	ns
IL-4R (CD 124) (c.p.m.)	550 ± 208	$p<0,001$	$p<0,2$

Valoración clínica:

Los resultados se agruparon en la Tabla 7; se consignan sólo las planillas de 17 pacientes pues los otros 3 no cumplieron con rigurosidad las pautas preestablecidas. Manifestaron el empleo de medicamentos cuya administración errática hizo imposible la confección adecuada de dichas planillas, que, a la postre, ofrecieran una información digna de ser procesada estadísticamente. De tal manera, no puede concluirse cuál antígeno es superior en esta valoración (Pa y/o Pa-1) aunque ambos provengan del mismo insecto y produzcan notables cambios sintomáticos totalmente independientes de una determinada medicación.

Tabla 7: Valoración estadística de los síntomas rínicos antes y después de la inmunoterapia con antígenos de *Periplaneta americana* ($n = 17$).

SÍNTOMAS	SCORE BASAL	DESPUÉS DE LA INMUNOTERAPIA		
		1° Año	2° Año	3° Año
CRISIS DE ESTORNUDOS	1,8 ± 0,8	1,3 ± 1,6 ns	0,6 ± 0,5 $p<0,01$	0,3 ± 0,4 $p<0,001$
RINO HIDORREA	1,8 ± 0,4	1,5 ± 1,1 ns	0,8 ± 0,8 $p<0,01$	0,3 ± 0,4 $p<0,001$
OBSTRUCCIÓN NASAL	2,0 ± 0,9	1,7 ± 0,6 ns	0,9 ± 0,3 $p<0,01$	0,4 ± 0,5 $p<0,001$

4. Discusión

Desde los albores de la práctica alergológica, tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de las rinitis alérgicas y del asma bronquial atópico, el papel jugado por el "polvillo habitacional" fue incuestionablemente destacado. En la década del 60, Voorhorst vinculó fehacientemente a un ácaro (*Dermatophagoides pteronyssinus*) presente en dicho polvillo con los cuadros clínicos de alergia respiratoria. Este hallazgo indujo a otros autores a especular acerca de la probable participación de otros insectos o productos provenientes de animales domésticos (v.g. escamas o pelos del perro; del gato; sus salivas, etc.), en la etiopatogénesis de los síndromes aludidos.

Es así como, uno de los insectos más comunes en el hábitat del hombre, la cucaracha con sus múltiples variedades, se constituye en un elemento apropiado para ser estudiado desde el punto de vista inmunológico tratando de documentar su participación en idénticos episodios de alergia respiratoria [3-7].

De los hallazgos obtenidos durante el desarrollo de diversos planes de investigación, tanto en los animales como en el hombre, surge una conclusión príncipes: la cucaracha común (*Periplaneta americana*) posee capacidad antigénica [9].

Su elevado contenido proteico determinado tanto en el extracto total como en las fracciones solubles obtenidas por el fraccionamiento por las columnas de Sephadex y por DEAE-celulosa, o sea por peso molecular y por intercambio iónico permitieron obtener diferentes eluidos con distinta composición glucoproteica. Este potente y complejo antígeno que indujo en conejos anticuerpos específicos por medio de una clásica inmunización parenteral, fue también capaz de desarrollar en cobayos por la vía inhalatoria una respuesta inmune específica y un fenómeno inflamatorio crónico dependiente de macrófagos y de linfocitos-T CD4 y CD8.

En los humanos atópicos, la inhalación de un "polvillo habitacional" con restos del exoesqueleto de Pa, detritos de su momificación, de su ooteca y de su materia fecal, o sea, de micropartículas que vehiculizan sus proteínas antigénicas, induce una respuesta inmune específica IgE dependiente que se vincula estrechamente con su padecimiento a nivel de la mucosa respiratoria degranulando mastocitos.

La liberación de histamina, leucotrienos y PAF produce los conocidos fenómenos de vasodilatación capilar, edema de la mucosa, contracción del músculo liso e incremento de la actividad de las glándulas del epitelio respiratorio con hipercrinia y discrinia, que tan negativamente influyen en la dinámica respiratoria.

El aflujo de macrófagos y de linfocitos con receptores específicos para estas glucoproteínas conjuntamente con la producción y liberación de las interleuquinas pro-inflamatorias parece

ser trascendente en un modelo experimental desarrollado en cobayos, donde se indujo una neumonitis por hipersensibilidad típica con infiltrados intersticiales, bronquiolitis celular y granulomas solitarios no caseosos.

Teniendo en cuenta que el asma bronquial humana es, en realidad, un fenómeno inflamatorio crónico de la mucosa respiratoria con perpetuación de la residencia de LTCD4 y de LTCD8, macrófagos, eosinófilos y mastocitos, parece razonable sospechar que este fenómeno histopatológico pudiera estar directamente relacionado con las propiedades fisicoquímicas del antígeno (v.g. riqueza proteica e hidrocarbonada; configuración espacial; peso molecular; concentración o polución ambiental, etc.), y la reiterada exposición al mismo, de ahí la utilidad del alejamiento del paciente de la fuente antigénica, cuando ello es posible.

Los anticuerpos específicos contra la Pa., tanto IgG como IgE, podrían desarrollar la activación de muchas células portadoras de receptores Fc-*gamma* o Fc-*epsilon*, tales como, macrófagos, linfocitos de diversas subpoblaciones y mastocitos, a su vez generadores de citoquinas, tales como IL-1, IL-6, factor de necrosis tumoral, IL-3, IL-4, IL-5 e IL-10 y más alejadamente de nueva IgE.

Las enfermedades alérgicas están estrechamente asociadas con una subpoblación de LT-CD4 llamada TH2, productora de IL-4, IL-5 e IL-10 mientras que la TH1 sólo elabora IL-2 e IFN-*gamma*. La IL-4 es crítica para la síntesis de IgE pues es la primera señal que determina el "switch" para la transcripción hacia el gen *epsilon* en la línea germinal del ADN del LB. Cómo se sabe, otra señal depende del LT (interacción del CD40 del LB y su ligando del LT).

La IL-5, por su parte, ejerce un potente efecto sobre la diferenciación, sobrevida y función de los eosinófilos, los que a su vez, integran el infiltrado celular bronquial en el asma humana. La adherencia de los eosinófilos a las células endoteliales se produce por la interacción de moléculas, tales como, CD11/CD18, ELAM-1 y VLA-4/VCAM-1.

Esta inflamación crónica puede ser modificada farmacológicamente con diferentes bloqueadores o inhibidores de los péptidos vasoactivos (histamina y leucotrienos) y de las citoquinas mencionadas (glucocorticoides y ciclosporina-A).

No obstante, la indudable utilidad terapéutica de estos agentes y de otros indicados para idéntico fin, los cambios fisiológicos y biomoleculares son transitorios y mientras dura la administración del fármaco.

Por ello, se intentó una forma de terapia que induce cambios biológicos más profundos, como lo es la inmunoterapia o desensibilización o inoculación crónica de dosis crecientes del antígeno productor del fenómeno de hipersensibilidad [1,8,14].

Estos cambios tanto humorales como celulares han captado la atención de los investigadores de las últimas dos décadas [22,23,25].

En el presente trabajo, se valoraron los resultados obtenidos en una población de pacientes atópicos-respiratorios, antes y después de la inmunoterapia aplicada durante 3 años con un antígeno al que todos ellos revelaron hipersensibilidad manifiesta.

Dicho antígeno, la cucaracha *Periplaneta americana*, se empleó como un extracto crudo obtenido según técnicas clásicas al respecto, y como un antígeno o sumatoria de péptidos purificados obtenidos por pasajes a través de diferentes columnas de filtración. Los pacientes atópicos ($n = 32$) mostraron pruebas cutáneas positivas tanto para el extracto crudo (Pa) como para sus péptidos purificados (Pa-1); por el contrario, el control no-atópico no evidenció esa reactividad, lo cual, confiere al hallazgo una especificidad vinculada con la dependencia de la IgE, y, no un mero fenómeno irritativo inespecífico (**Tabla I**).

Al analizar la situación humoral de los pacientes atópicos ya divididos en 2 grupos de 10 cada uno, se advirtió la existencia de anticuerpos IgE-anti-Pa y anti-Pa-1, así como de IgG-anti-Pa y anti-Pa-1. Todos tenían una IgE total sérica elevada como marcador genético de su condición atópica (**Tablas 2 y 3**).

Luego de un año de inmunoterapia con Pa y con Pa-1, estos valores basales se modificaron en un incremento en todos los casos; así, la IgE-anti-Pa lo hizo más notoriamente ($p=0,02/p=0,2$) en los vacunados con Pa-1 que con el extracto total mientras que la IgE-anti-Pa-1 se incrementó más en ambos grupos.

Por su parte, las IgG-anti-Pa y anti-Pa-1, aumentaron significativamente en los 2 grupos, con respecto a los basales ($p=0,02/p<0,001$ y $p<0,05/p<0,002$ respectivamente) independientemente del antígeno utilizado.

Sin embargo, el antígeno purificado parece inducir una más rápida respuesta humoral en el primer año con relación al extracto crudo. Este hecho podría estar relacionado con una más precisa presentación y procesamiento de los epitopes antigénicos. Al analizar los hallazgos del segundo año, la IgE-anti-Pa desciende en forma más notoria en el grupo vacunado con Pa y no con Pa-1; este hecho se repite al dosar la IgE-anti-Pa-1 ($p>0,1/ns$ y $p<0,1/ns$).

Por su parte, las IgG-anti-Pa y anti-Pa-1, sufren un aumento estadísticamente muy significativo con respecto a los datos basales ($p<0,001/p<0,005$ y $p<0,001/p<0,001$) independientemente del antígeno empleado.

Finalmente, al concluir el tercer año, los valores de las IgE-anti-Pa y anti-Pa-1, no se diferencian significativamente de los valores basales, o sea, que descienden ligeramente con respecto al pequeño pico del primer año. (p 0,2/ns).

Las IgG-anti-Pa y anti-Pa-1 ratifican sus niveles elevados con relación a los iniciales ($p=0,001/p<0,001$ y $p<0,001/p<0,001$). En todos los casos, los valores de las IgE séricas totales, no evidenciaron modificaciones estadísticamente significativas, lo cual obliga a ser muy cuidadosos en la interpretación de estos valores como seguimiento humoral en la evolución clínica del enfermo.

Ni aún los valores séricos de las IgE monoespecíficas se modificaron después de los 3 años de inmunoterapia; tan sólo las IgG específicas son indicadoras de la utilidad de la vacunoterapia.

Estos hallazgos refuerzan las propiedades fisicoquímicas y biológicas de la molécula de IgG, que, gracias a la movilidad que le otorga su bisagra y al ángulo de plegamiento de sus fragmentos Fab (36°), está en condiciones de "atrapar" más determinantes antigénicos específicos, constituyendo así, inmunocomplejos antígeno-anticuerpo que desaparecen de la circulación merced a la actividad macrofágica ("clearance del alérgeno").

De esta manera, disminuyen las posibilidades que dichos epitopes lleguen a contactar a las moléculas de IgE adsorbidas a los receptores épsilon de los mastocitos y basófilos, gatillando las típicas reacciones del tipo I. Si se tiene en cuenta que los niveles séricos de la IgG siempre serán mayores a los de la IgE ($IgG \pm 1000 \text{ mg/dL} \geq IgE \pm 250 \text{ ng/mL}$), y, que además, la afinidad por los antígenos también es mayor para la primera, el beneficio clínico de poseer una IgG específica anti-Pa generada por la inmunoterapia podría ser de gran utilidad. Esta molécula se comportaría como un verdadero "desalergenizador" interno.

Por otro lado, la IgE no lo es todo en la atopía; el papel de las quimioquinas o factores liberadores de histamina (HRF) generados por el macrófago, el LT, el LB, las células endoteliales y las plaquetas parecen condicionar la gravedad del cuadro respiratorio, tal como, lo señaló Lichtenstein con su ecuación: IgE alta y HRF ausentes: asma leve; IgE alta y HRP presentes: asma severa.

Estos péptidos de bajo peso molecular ameritan mayor investigación pues al ser independientes de la IgE, podrían estar relacionados con la amplificación de la llamada fase tardía IgE-dependiente, imbricando mecanismos en la génesis de un mismo fenómeno.

La valoración de la vertiente celular de la respuesta inmune (IL-2) señala alguna modificación en menos en la activación linfocitaria recién en el tercer año de inoculación ($p=0,05$).

Por su parte, la IL-4 sérica muestra un incremento en el primer año ($p=0,01$) y un franco descenso en el tercero ($p=0,05$) en ambos grupos de vacunados; su receptor específico (IL-4R o CD124) también evidencia una disminución notoria en el tercer año con respecto al basal ($p<0,001$) (**Tablas 4 y 5**).

Estos datos indican una activación inicial de esta citoquina TH2 y una ulterior inhibición provocada por la inmunoterapia; menor cantidad de receptores circulantes también aboga a favor de una disminución de la IL-4. Al comparar los valores hallados con los de los no-atópicos, se detecta que la IL-2 evidencia pocos cambios con respecto a los controles normales ($p < 0,2$ y $p = 0,2$). Pero al analizar los valores de la IL-4 y del CD124, se aprecia que la primera se encuentra elevada en los atópicos no tratados ($p < 0,02$) y se normaliza al cabo de los 3 años; el CD124, muy elevado en los atópicos no tratados ($p < 0,001$) también desciende hasta niveles casi iguales a los normales ($p < 0,2$) (**Tabla 6**).

Con estos datos, se destacan los cambios de la actividad linfocitaria durante los 3 años de inmunoterapia con una notable "normalización" de las citoquinas pro-inflamatorias TH2.

Más prudente debe ser el análisis y la interpretación de las mejorías clínicas objetivadas. En algunos casos, en que se decidió descartar la información aportada por irregularidades en las planillas e inadecuada transcripción de los datos, la subjetividad de los pacientes conspiró contra la apropiada anotación de los signos y síntomas (**Tabla 7**).

De los 17 pacientes valorados, se apreciaron modificaciones significativas en las crisis de estornudos, la rinohidrorrea y la obstrucción nasal recién a partir del segundo año de vacunoterapia ($p < 0,01$; $p = 0,01$ y $p = 0,01$ respectivamente), pues al finalizar el primer año los hallazgos no eran muy distintos a los basales aunque los pacientes expresaban una "mejoría" sostenida.

Estos valores se acentuaron al finalizar el tercer año y la significación llegó a cifras de $p = 0,001$ para las crisis de estornudos y la obstrucción nasal y de $p < 0,001$ para la rinohidrorrea.

La inmunoterapia con aero-alergenos es un procedimiento médico que se inició en 1911 en Inglaterra para evitar y tratar la rinoconjuntivitis estacional debida a los pólenes del ambiente [31,33,34].

Su éxito fue tan notorio y excluyente para la época, que atrajo la atención de los investigadores. Este optimismo cruzó el océano Atlántico y se instaló en los Estados Unidos, y, desde allí migró a nuestro país donde se enraizó fuerte y exageradamente [35,36,39].

Su empirismo inicial, amparado en las concepciones medievales del veneno-anti-veneno, toxina-anti-toxina, Mitridatismo, taquifilaxis y teoría de receptores o de las cadenas laterales de Erlich, trató de explicar racionalmente sus resultados positivos [40-43].

Su empleo desmedido contribuyó a desjerarquizarla; cualquier sustancia pasó a ser antigénica y luego se justificó de sensibilizar contra ella [45].

Los verdaderos éxitos fueron salpicados por la inescrupulosidad de muchos improvisados; más allá de algún modelo experimental realizado críticamente, recién en la década del 80, los

estudios controlados empezaron a ser la regla y no la excepción. En 1995, un meta-análisis de 20 publicaciones realizadas entre 1960 y 1990 con placebo, grupos controles y valoración estadística de los hallazgos, ratificó su efectividad en la disminución de la hiperreactividad bronquial, la reducción de la medicación y la mejoría sintomática.

Además de los antígenos polínicos, el ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* se incorporó a la lista de los alérgenos útiles en la vacunoterapia de niños, jóvenes y adultos [51-56].

En este trabajo, se presentan los datos que avalan la utilidad de la inmunoterapia con antígenos de la cucaracha común (*Periplaneta americana*) en sujetos atópicos respiratorios, que, demostraron por diversas técnicas la hipersensibilidad a los mismos.

Los dosajes de los principales parámetros humorales y celulares demuestran que podrían correlacionarse con la mejoría sintomática obtenida.

Queda mucho por hacer en este campo de la investigación donde las patologías por

hipersensibilidad y por autoinmunidad, se vieron benéficamente jaqueadas por la administración crónica de antígenos, por la vía parenteral la primera y por la vía oral la segunda [57].

5. Conclusiones

1) La participación de glucoproteínas provenientes de las cucarachas en los fenómenos de hipersensibilidad respiratoria de los atópicos, está fehacientemente probada;

2) la presencia de anticuerpos específicos de los isotipos IgE e IgG anti-cucaracha es un hecho demostrado en los atópicos vírgenes de tratamiento desensibilizante, y posiblemente, estén relacionados con su síndrome rinitis/asma;

3) la administración sostenida a lo largo del tiempo (3 años) de estas glucoproteínas por la vía parenteral induce modificaciones significativas en los niveles de los anticuerpos específicos del isotipo IgG;

4) los valores de las citoquinas involucradas en la activación linfocitaria de estos mecanismos atópicos, también sufren cambios notables con la inmunoterapia sostenida, generando nuevos valores cercanos a los del grupo control no atópico;

5) la sintomatología de la rinitis perenne evidencia cambios favorables después del segundo año de inmunoterapia con disminución estadísticamente probada;

6) de lo expuesto, se asume que la administración crónica de los antígenos de la cucaracha por la vía parenteral, produce cambios inmunológicos y clínicos en los atópicos respiratorios sensibles a ellos.

Referencias

1. Abramson M.J., Puy R.M. Allergen immunotherapy effective in asthma? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995; 151: 969-974.
2. Alonso A., Albónico J.P., Scavini L.M., Mouchián K., Pionetti C.H. Immunochemical properties of the antigens of *Blattaria americana*. *Allergol. Immunopathol.* 1987; 15 (2): 109-114.
3. Alonso A., Albónico J.F., Mouchián K., Scavini L.M. Immune response to the antigens of *Periplaneta americana* in animals and in humans. *Ann. Allergy (Abst.)* 1995; 74: 78.
4. Alonso A., Albónico J.F., Mouchián K., Pionetti C.H. Producción de anticuerpos IgE-anti-*Periplaneta americana* en cobayos por la vía inhalatoria. *Prensa Méd. Argent.* 1993; 80: 100-105.
5. Alonso A., Albónico J.P., Mouchián K., Pionetti C.H. Hipersensibilidad a los antígenos de la cucaracha en los humanos atópicos. *Prensa Méd. Argent.* 1993; 80: 589-593.
6. Alonso A., Albónico J.F., Mouchián K., Pionetti C.H. Interstitial pneumonitis induced in guinea pigs by the antigens of *Periplaneta americana*. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 1992; 2: 263-271.
7. Alonso A., Albónico J.F., Mouchián K., Scavini L.M. Cross-reactivity between the antigens of *Periplaneta americana* and *Triatoma infestans*. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 1996; 6: 301-306.
8. Alvarez-Cuesta E., Cuesta-Herranz J. Monoclonal antibody standardized cat extract immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1994; 93: 556-566.
9. Bernton H., Mc Mahon T.F. Cockroach asthma. *Br. J. Dis. Chest* 1972; 66: 611-613.
10. Berrens L., Young E. Purification and properties of house dust allergens. *Int. Arch. Allergy* 1961; 19: 341-345.
11. Boatner A., Efron M., Dorfman L. Preparation of purified house-dust extracts. *Science* 1940; 91: 38-40.
12. Bousquet J., Michel F. Specific immunotherapy in asthma: is it effective? *J. Allergy Clin. Immunol.* 1994; 94: 1-11.
13. Bousquet J. Specific immunotherapy in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1990; 86: 292-306.
14. Bousquet J., Hejjaoui A., Clauzel A. Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1988; 82: 971-977.
15. Bush R., Huftel M., Busse W. En: *Allergen Immunotherapy*. Eds. Lockey R., Bukantz S., Marcel Dekker, Inc., New York, 1991, p. 25-50.
16. Ceska M., Erikson R. Radio-immunosorbent assay of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1972; 49: 1-9.
17. Chang J.L., Kang B. Comparison of diagnostic tests for cockroach sensitivity among asthmatics. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1984; 73: 153-159.
18. Cooke R. On the constitutional reaction dangers of the diagnostic cutaneous tests and therapeutic injections of allergens. *J. Immunol.* 1922; 7: 119-121.
19. Dische Z. En: *Methods of Biochemical Analysis*. Ed. Glick, New York, 2, 200, 1958.
20. Elias R. On the purification of house-dust allergen. *Review of Allergy* 1965; 19: 129-131.
21. Frugoni C. En: *Alergia Clínica* de Hansen K. y Werner M., Ed. Salvat, 586, 1970.
22. Helm R., Jones R., Brenner R. Shared allergenic activity in asian (*Blattella asahinai*), german (*Blattella germanica*), american (*Periplaneta americana*) and oriental (*Blatta orientalis*) cockroach species. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1990; 92: 154-159.
23. Kang B. Study on cockroach antigen as a probable causative agent in bronchial asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1976; 58: 357-362.
24. Kang B., Sulit N. A comparative study of prevalence of skin hypersensitivity to cockroach and house-dust antigens. *Ann. Allerg.* 1978; 41: 333-336.
25. Kang B., Yunginger J. Cockroach cause of allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1979; 63: 80-85.

26. Kang B., Wilson M. Cockroach allergen study: allergen patterns of three common cockroach species proved by allergic sera collected in two cities. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1991; 87: 1073-1080.
27. Khan A., Richman P. Comparison of allergenicity of whole body and body parts of german and american cockroaches. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1984; 73: 144-149.
28. Leach A., O'Shea P. The determination of protein molecular weights of up to 225.000 by gel filtration on a column of Sephadex G-200 at 25°C. *J.Chromatogr.* 1965; 17: 245-251.
29. Lehrer S., Menon P. Comparison of cockroach allergenic activity in whole body and fecal extracts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1991; 87: 574-579.
30. Lehrer S., Horner E. Cockroach allergenic activity: analysis of commercial cockroaches extracts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1992; 88: 895-900.
31. Lichtenstein L., Valentine M. A re-evaluation of immunotherapy for asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1984; 129: 657-659.
32. Lowry G.H. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-269.
33. Machiels J., Somville M. Allergic bronchial asthma due to *Dermatophagoides pteronyssinus* can be effectively treated by inoculation of allergen-antibody complexes. *J.Clin. Invest.* 1990; 85: 1024-1035.
34. Malling H. Position paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology Specific immunotherapy. *Allergy* 1988; Suppl. 6: 1-33.
35. Mazer B., Harbeck R. Cockroach as a potential agent in allergic bronchopulmonary disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1989; 83: 182-186.
36. Mc Grath C.M. Immunotherapy in the treatment of asthma. *Pediatr. Asthma Allergy Immunol.* 1996; 10: 47-57.
37. Menon P., Menon V. Skin test reactivity to whole body and fecal extracts of american and german cockroaches. *Ann. Allergy* 1991; 67: 573-577.
38. Mitchell W., Larson D. House dust, mites and insects. *Ann. Allergy* 1969; 27: 93-96.
39. Mouchián K., Albónico J.P., Pionetti C.H., Alonso A. Cockroaches antigens and hypersensitivity pneumonitis. *Fifth Armenian Medical World Congress* 16/7/92, p.27, Paris.
40. Ohman J.L. Clinical and immunological responses to immunotherapy. En: *Allergen Immunotherapy*. Eds. Lockey R., Bukantz S. Marcel Dekker, Inc., New York, 1991, p. 209-232.
41. Platts-Mills T. Ragweed immunotherapy in adult asthma. *Engl. J. Med.* 1996; 335: 203-206.
42. Pola J., Valdivieso R., Losada E. Cockroach hypersensitivity in asthmatic patients. *Allergol. Immunopathol.* 1988; 16: 105-110.
43. Pollart S., Smith T. Environmental evidence of cockroach allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1991; 87: 505-509.
44. Pollart S., Hayden M., Platts-Mills T. Identification, quantification and purification of cockroach allergens using monoclonal antibodies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1991; 87: 511-515.
45. Rak S. The effect of immunotherapy on bronchial hyperresponsiveness and eosinophil cationic protein in pollen allergic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1988; 82: 470-480.
46. Reinberg A. Circadian reactivity rythm of human skin to house dust. *Lancet* 1968; i: 1270-1273.
47. Richman P., Khan A. The important sources of german cockroach allergens as determined by RAST analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1984; 73: 590-597.
48. Roth L., Willis E. The medical and veterinary importance of cockroach. *Miscellaneous Smithsonian Collections* 1951; 134: 1-139.
49. Schou C., Fernández Caldas E. Identification and purification of important cross-reactive allergen from american and german cockroaches. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1990; 86: 935-940.
50. Stankus R., Lehrer S. Identification and characterization of cockroach allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1990; 86: 781-787.

51. Sundin B. Immunotherapy with partially purified and standardized animal dander extracts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1986; 77: 478-487.
52. Twarog F. Immediate hypersensitivity to cockroach. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1977; 59: 154-159.
53. Van Metre T., Marsh D. Immunotherapy for cat asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1988; 82: 1055-1068.
54. Weiner J. Ragweed immunotherapy in adult asthma. *Engl. J. Med.* 1996; 335: 203 (Letter).
55. Zwick H. Allergenic structures in cockroach hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1991; 87: 626-632.
56. Battista S.M., Rodríguez S.R., Alonso A., Pomilio A.B. Whole bodies of the argentinian cockroach *Periplaneta americana*: non comercial extract. Fractionation/characterization, cross-reactivity and vaccine therapy. *An. Asoc. Quím. Argent.* 2020; 107 (1): 43-63.
57. Alonso A., Albónico J.F., Mouchián K., Pionetti C.H., Scavini L.M., Rodríguez S.R., Irañeta S.G., Potenza M. Las cucarachas y la alergia: 40 años de investigación. *An. Soc. Cientif. Argent.* 2018; 261 (1): 5-44.

***ILEX PARAGUARIENSIS*: EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GLICOPROTEÍNA P INTESTINAL**

Silvia Adriana Neirotti^{1*}

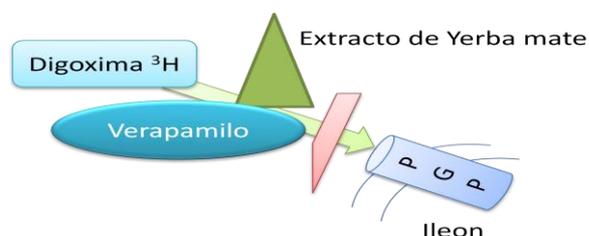
¹ Centro de Salud y Acción Comunitaria (CeSAC) N°7, Hospital Donación Francisco Santojanni, Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires. 2 de Abril de 1982 6850, 1439, Buenos Aires, Argentina.

*Autor Corresponsal: silneirotti@gmail.com

Recibido: 12 de septiembre de 2023

Aceptado: 31 de octubre de 2023

Resumen gráfico



Resumen

La glicoproteína P intestinal (Pgp), actúa como una bomba activa de secreción activa de múltiples fármacos dependiente de ATP, o como barrera de absorción al transportarlos desde las células intestinales hacia la luz. Pgp interactúa con varias sustancias, limita la absorción oral de fármacos, y es modulada por flavonoides. El objetivo de este trabajo fue analizar la influencia de las decocciones e infusiones de mate sobre la actividad de la Pgp intestinal en la variabilidad cinética de fármacos sustratos de este transportador. Se tomó como modelo el saco intestinal de rata aislado y evertido, validado con ³H-digoxina (0,2 µCi-50 µM) como sustrato e inhibidores como verapamilo. Los tejidos se incubaron con el sustrato y se analizó la cinética de eflujo durante 1 hora. El transporte lineal se verificó por contador de centelleo líquido. El verapamilo (100 µM) inhibió el eflujo de ³H-digoxina (44%, $p<0,001$). Las decocciones de mate (2% P/V) inhibieron la actividad de Pgp del 44% ($p<0,001$) y del 35% ($p<0,01$) en relación con la infusión de mate, lo que sugiere que las decocciones y la infusión podrían contribuir a la variabilidad de la biodisponibilidad de los fármacos que se encuentran en sustratos de esta bomba de eflujo.

Palabras clave: Glicoproteína P; mate; *Ilex paraguariensis*; verapamilo; función intestinal.

***Ilex paraguariensis*: effect on the activity of intestinal P-glycoprotein**

Abstract

Intestinal P-glycoprotein (Pgp) can act as an active pump for the ATP-dependent secretion of multiple drugs, or as an absorption barrier by transporting drugs from intestinal cells into the lumen. Pgp interacts with various substances, limits the oral absorption of drugs, and is modulated by flavonoids. The objective of this work was to analyze the influence of decoctions and infusions of mate on the activity of intestinal Pgp in the kinetic variability of drugs that are substrates of this transporter. The isolated and everted rat intestinal sac was taken as a model, validated with one of its recognized substrates (^3H -digoxin, 0.2 μCi -50 μM) and inhibitors such as verapamil. The isolated tissues were incubated with the substrate and analyzed for efflux kinetics for 1 hour. Linear transport was verified by liquid scintillation counter. Verapamil (100 μM) inhibited ^3H -digoxin efflux by 44.3% ($p<0.001$). When evaluating the effect of mate decoctions (2% P/V), an inhibition of Pgp activity of 44% ($p<0.001$) and 35.2% ($p<0.01$) was observed in relation to the mate infusion experiments, suggesting that mate decoctions and infusion could contribute to the variability of bioavailability of drugs found in the substrates of this efflux pump.

Keywords: *P-glycoprotein; mate; Ilex paraguariensis; verapamil; intestinal function.*

1. Introducción

Ilex paraguariensis (Figura 1) comúnmente llamada yerba mate, conocida también como “té de jesuitas”, “té Paraguayo” o “té de mate”, fue adoptada de los habitantes indígenas de región (guaraníes) que la utilizaban para preparar una bebida ligeramente estimulante.



Figura 1. *Ilex paraguariensis* St. Hilaire

La costumbre de utilizar yerba mate para preparar bebidas similares al té (infusiones o decocción), está ampliamente distribuida en América del Sur [1], y ya en el siglo XVIII se había impuesto en todos los estratos sociales del Virreinato del Río de la Plata. El archivo Bonpland registra científicamente el conocimiento de la planta de yerba mate en Europa a fines del siglo XIX con la denominación de “*Ilex theazans*”. Posteriormente, en las “Memoires du Muséum

d'Histoire naturelle" Saint Hilaire la denominó "*Ilex paraguariensis*", tal denominación ha prevalecido sobre todas las conocidas [2].

La glicoproteína P (Pgp) es una proteína asociada a la membrana celular que transporta una serie de drogas que son sustratos de la misma. Básicamente la Pgp funciona como una bomba de eflujo de diversas drogas. El gen de resistencia múltiple a drogas MDR1 codifica la Pgp, clasificada como miembro de la superfamilia de los transportadores ABC (ATP-binding cassette) [3]. La Pgp está constituida por una secuencia de 1280 aminoácidos con 12 dominios transmembrana, y consiste en dos partes homólogas, cada mitad contiene un dominio citoplasmático que fija el ATP.

La actividad de la Pgp intestinal interviene en la biodisponibilidad oral de diferentes fármacos como quimioterápicos, antibióticos, antiparasitarios, drogas activas sobre el SNC, medicamentos cardiovasculares e inhibidores HIV. De esta manera, numerosas drogas actúan como moduladores de la actividad de la Pgp intestinal, pueden funcionar como sustratos alternativos, inhibidores o inductores de esta proteína.

Para los estudios de la función de esta proteína se utiliza tejido de íleon de rata como modelo experimental, principalmente porque este segmento del intestino delgado muestra que el transporte de sustrato mediado por Pgp es mayor. En el íleon evertido de rata se observa el transporte de sustratos desde la membrana serosa hacia la mucosa (basal-apical) [4]. La glicoproteína P media el transporte de la digoxina³H fuera del enterocito en la dirección basal-apical luego de haber entrado a la célula a través de un mecanismo transcelular, bombeando el sustrato nuevamente hacia el lumen intestinal.

Digoxina³H es un reconocido sustrato de la Pgp, y ha sido usado como marcador para estudiar la función de la Pgp en distintos tipos de células resistente a múltiples drogas y a distintos tejidos normales, incluyendo el intestino.

Diversos estudios analizan el efecto de inhibidores de la Pgp intestinal sobre el transporte de dichos sustratos en el intestino de rata, observándose una relación lineal de los inhibidores de Pgp sobre el transporte de dichos sustratos. Uno de los inhibidores de Pgp más utilizado es el verapamilo, el cual inhibe significativamente el transporte de sustratos desde la membrana serosa hacia la mucosa (basal-apical) [5].

Los flavonoides y flavonoles, principios activos de origen vegetal, han sido reportados como moduladores de este transportador, principalmente las catequinas del té verde y otros flavonoles de la hierba de San Juan [6]. Específicamente, *Ilex paraguariensis var. paraguariensis* tiene un alto contenido de flavonoides (rutina, quercetina y canferol) y cafeoíl derivados (ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido-3,4-dicafeoilquínico, ácido-3,5-dicafeoilquínico y ácido-4,5-dicafeoilquínico) [7].

Con el paso de los años, y las distintas culturas, y a pesar de los intentos de prohibición durante los tiempos de la conquista de este ritual de la infusión practicado por los nativos, hoy en día esta costumbre perdura, y hay varias formas de utilización de la yerba mate que reciben distintos nombres. La forma más común es el mate, una infusión que se prepara en un recipiente denominado mate en donde se vierte agua caliente entre 75 y 82 °C, y se succiona por intermedio de una bombilla. Otra forma de bebida del mate es el mate cocido, una infusión que para prepararlo requiere primero hervir la yerba mate en agua, posteriormente de cuela y se sirve en taza. Finalmente, otra forma de preparación es el tereré, que es similar al mate, pero se prepara con agua helada a la cual se le suele agregar el jugo, pulpa y cáscara de limón, pomelo o naranja [2].

Considerando la amplia utilización del mate en la sociedad Argentina, el objetivo de este trabajo fue analizar la influencia del extracto de yerba mate sobre la actividad de la proteína transportadora Pgp y la posible importancia que tendría en la variabilidad cinética que se observa en distintas drogas que son sustrato de este transportador.

2. Materiales y Métodos

Modelo *in vitro* de saco intestinal aislado

El saco intestinal aislado de rata ha sido utilizado para determinar una serie de parámetros cinéticos del transporte de drogas a través de este segmento del intestino delgado aislado de un animal [8-11].

Los animales (12 ratas Wistar) se mantuvieron en ayuno entre 8 a 12 horas anteriores al experimento, permitiéndoles la ingesta de agua *ad libitum*. Se anestesiaron con solución de uretano (1,2 g/kg, ip) y de cada animal, se aisló un segmento de 10 cm de longitud de intestino delgado a una distancia de 1 cm de la unión íleo-cecal. El segmento intestinal fue evertido y se introdujo una cánula en un extremo. Inmediatamente el tejido se sumergió en una cuba de vidrio conteniendo 5 mL de solución de Krebs preoxigenado con carbógeno (5% CO₂ y 95% O₂), colocándose la solución a estudiar en el interior del segmento intestinal. Las cubas de vidrio se mantuvieron sumergidas en un baño termostatzado a 37 °C. Posteriormente se recolectaron muestras del medio de incubación en el cual se encontraba sumergido el segmento intestinal, cada 5 minutos durante un tiempo total de una hora. (basal-apical).

Preparación de los extractos:

Extracto de yerba mate 2%P/V (decocción): El extracto de yerba mate se preparó por decocción durante 10 minutos (10 gramos de yerba mate con 100 ml de agua).

Extracto de yerba mate (infusión): El extracto de yerba mate se preparo por “cebado” (20,9 g de yerba mate con 37 mL de agua a 80 °C), utilizándose para la obtención del extracto de yerba mate un dispositivo diseñado para tal fin.

Permeación de digoxina³H a través del íleon aislado de rata El transporte *in vitro* a través del saco intestinal evertido se estudió de acuerdo a la técnica de Yumoto y col. [5]. Luego de la preincubación del saco intestinal en 5 mL de solución de Krebs, se introdujeron en el interior del saco 1 mL de solución de digoxina³H a través de la cánula. Luego, se lavó el saco con 30 mL de solución de Krebs termostatzado y se colocó el intestino en 5 mL del medio de Krebs.

La digoxina³H (0,2 µCi - 50 µM) fue cuantificada por centellografía líquida [12].

En el caso de los experimentos realizados con el inhibidor de Pgp, los sacos intestinales de 3 ratas se preincubaron durante 10 minutos sumergidos en solución de verapamilo (100 µM), previa a la introducción de la solución de digoxina³H. Se compararon con el grupo control (n=3).

Permeación de digoxina³H a través del íleon aislado de rata en presencia de extracto de yerba mate 2% P/V (decocción)

En el experimento realizado con extracto de yerba mate (decocción) 2% P/V, los sacos intestinales de 3 ratas se preincubaron durante 10 minutos sumergidos en dicha solución, previa a la introducción de la solución de digoxina³H (0,2 µCi - 50 µM). Posteriormente se identificó la digoxina³H, por centellografía líquida [12]. Se compararon con el grupo control (n=3).

Permeación de digoxina³H a través del íleon aislado de rata en presencia de extracto de yerba mate (infusión)

En el experimento realizado con extracto de yerba mate (infusión) 2% P/V, los sacos intestinales de 3 ratas se preincubaron durante 10 minutos sumergidos en dicha solución, previa a la introducción de la solución de digoxina³H (0,2 µCi - 50 µM). Posteriormente se identificó la digoxina³H, por centellografía líquida [12]. Se compararon con el grupo control (n=3).

3. Resultados y Discusión

En los experimentos realizados en presencia del verapamilo se observó una disminución del transporte de digoxina³H del 44 % en la dirección basal–apical. Se produce una disminución de la velocidad de transporte de digoxina³H en la dirección basal-apical por bloqueo de la Pgp en presencia de un inhibidor del transportador. Este resultado es un indicativo de la secreción polarizada del sustrato bajo las condiciones experimentales de trabajo. El transporte de digoxina³H a través del íleon aislado evertido de rata mantuvo una relación lineal en el tiempo

durante los 60 minutos de duración del experimento. De la misma forma, el transporte de digoxina³H en presencia del inhibidor de la Pgp sostiene una relación lineal en el tiempo.

La comparación de las pendientes de las rectas, equivalente a la comparación de las velocidades de transporte de la droga en el íleon evertido, mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$). Las velocidades de transporte medidas a través del saco intestinal evertido (basal-apical) fueron de $105,90 \pm 0,99$ dpm/min para el grupo control y $58,50 \pm 0,97$ dpm/min para el grupo tratado en presencia de verapamilo $100 \mu\text{M}$ en el medio de incubación. Los resultados discutidos se reportan en la Figura 1.

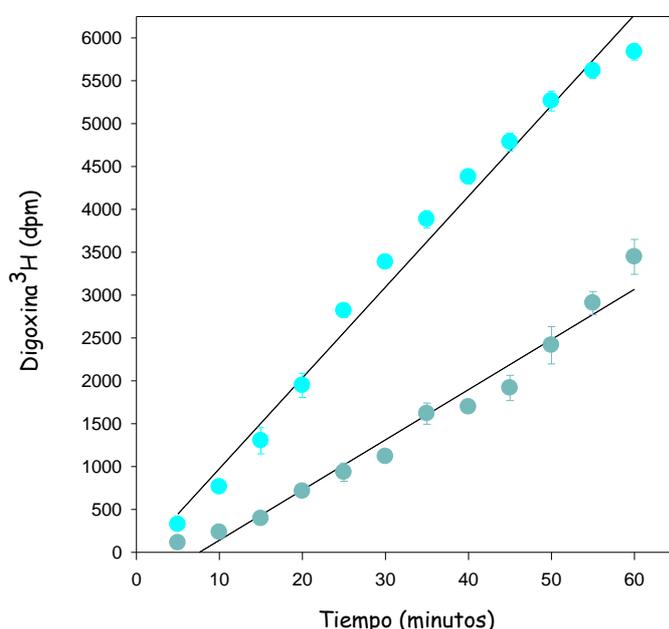


Figura 1. Transporte de digoxina³H a través del saco intestinal en dirección basal-apical, en ● ausencia y en ● presencia de verapamilo $100 \mu\text{M}$. Grupo control (●) $y = 105,9 \cdot x - 83,4$, $r^2 = 0,985$; grupo tratado (●) $y = 58,5 \cdot x - 444,1$, $r^2 = 0,968$. Diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0,001$).

Al analizar los resultados obtenidos en los experimentos realizados con el extracto de yerba mate, decocción o infusión, se comprueba que el transporte de digoxina³H en presencia del extracto de yerba mate (decocción o infusión) mantiene una relación lineal en el tiempo.

Como muestra la Figura 2, las velocidades de transporte de digoxina³H medidas a través del saco intestinal evertido fueron de $75,40 \pm 0,99$ dpm/min para el grupo control y $42,20 \pm 0,99$ dpm/min para el grupo tratado con extracto de yerba mate 2% P/V.

La disminución del transporte de digoxina³H en presencia del extracto de yerba mate obtenido por decocción en el medio de incubación fue del 44% en la dirección basal-apical. La comparación de las pendientes de las rectas, equivalente a la comparación de las velocidades de

transporte de la droga en el íleon evertido, mostró una diferencia significativa respecto al grupo control ($p < 0,001$) (Figura 2).

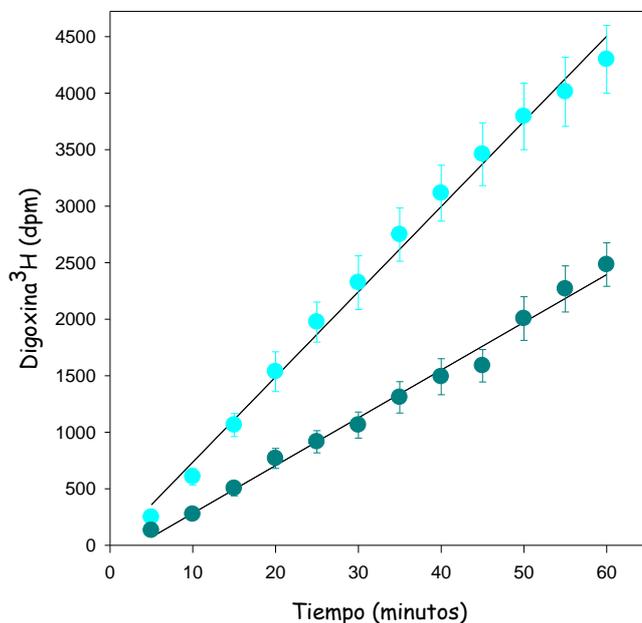


Figura 2. Transporte de digoxina³H a través del saco intestinal en dirección basal-apical, en ● ausencia y en ● presencia del extracto de yerba mate 2% P/V (decocción). Grupo control (● cian) $y = 75,4.x - 17,9$, $r^2 = 0,993$; grupo tratado con extracto de yerba mate (● verde) $y = 42,2.x - 139,4$, $r^2 = 0,990$. Diferencia significativa respecto del valor control ($p < 0,001$).

En la Figura 3 se muestran las velocidades de transporte de digoxina³H medidas a través del saco intestinal basal-apical, cuyos valores correspondieron a $92,90 \pm 0,98$ dpm/min para el grupo control y $69,30 \pm 0,99$ dpm/min para el grupo tratado en presencia del extracto de yerba mate “cebado”.

Trabajando en estas condiciones, o sea en presencia del extracto de yerba mate obtenido por infusión se observó una disminución del transporte de digoxina³H del 35% en la dirección basal-apical.

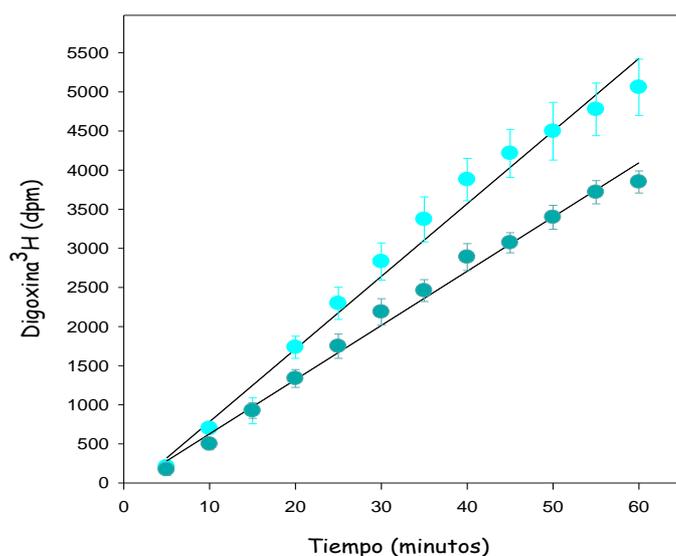


Figura 3. Transporte de digoxina³H a través del saco intestinal en dirección basal-apical, en ● ausencia y en ● presencia del extracto de yerba mate (infusión). Grupo control (●) $y = 92,9.x - 144,2$, $r^2 = 0,983$; grupo tratado con extracto de yerba mate (●) $y = 69,3.x - 65,2$, $r^2 = 0,990$. Diferencia significativa respecto del valor control ($p < 0,01$).

4. Conclusiones

Del análisis de los resultados, se puede observar que el extracto de yerba mate “mate cocido” o “mate cebado” presenta actividad inhibitoria sobre la actividad de la Pgp. La inhibición del transporte de digoxina³H en la dirección basal–apical del extracto de yerba mate (decocción) muestra un perfil similar a la producida por el inhibidor verapamilo, conocido inhibidor de la Pgp. Sin embargo esta inhibición fue mayor a la observada por el extracto de yerba mate (infusión). Posiblemente se produce una disminución de la velocidad de transporte de digoxina³H en la dirección basal-apical por bloqueo de la Pgp debido a la presencia del extracto de yerba mate “cebado”. De tal manera, podría colaborar en la variabilidad de la biodisponibilidad de los fármacos que son sustrato de la Pgp.

Agradecimientos

Al Dr. Modesto C Rubio por su guía y enseñanza durante mi concurrencia desde Abril de 2003-Diciembre de 2022, ININFA-Instituto de Investigaciones Farmacológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Referencias

1. Vazquez A., Moyna P. J. *Ethnopharmacol.* **1986**; 18, 267-272.
2. Mandrile E. *BIFASE.* **2006**; 19 (3), 69-96.
3. Matheny C.J., Lamb M.W., Brouwer K.L.R., et al. *Pharmacother.* **2001**; 21 (7), 778-796.

4. Wilson T.H., Wiseman G. *J Physiol.* **1954**; 123,116-125.
5. Yumoto R., Murakami T., Nakamoto Y., *et al.* *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**; 289 (1), 149-155.
6. Zhou S., Lim L.Y., Chowbay B. *Drug Metab. Rev.* **2004**; 336 (1), 57-104.
7. Filip R., López P., Giberti G., *et al.* *Fitoterapia* **2001**; 72, 774-778.
8. Artursson P., Ungell A., Lofroth J. *Pharm. Res.* **1993**; 10 (8), 1123-1129.
9. Barthe L., Bessouet M., Woodley J., Houin G. *Int. J. Pharm.* **1998**; 173, 255-258.
10. Barthe L., Woodley J., Houin G. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **1999**; 13,154-168.
11. Carreño-Gómez B., Duncan R. *Anticancer Res.* **2000**; 20, 3157-3162.
12. Stephens R.H., Tanianis-Hughes J., Higgs N.B., *et al.* *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**; 303, 1095-1101.

EVALUACIÓN ELECTROQUÍMICA DE RECUBRIMIENTOS DE CONVERSIÓN DE CE SOBRE ACERO EN AMBIENTE MARINO CON POST TRATAMIENTO DE ZN Y RESINA EPOXI

Gabriela P. Cicileo^{1*}; Sergio E. Chichizola¹

¹ *Departamento de Materiales Avanzados y Procesos Estratégicos (DEMAPE), UNIDEF (MINDEF-CONICET), CITEDEF, J. B. de La Salle 4397, 1603 Villa Martelli, Pcia. de Buenos Aires, Argentina.*

*gicileo@citedef.gob.ar

Recibido: 1º de junio de 2023

Aceptado: 28 de julio de 2023

Resumen

Como resultado de una colaboración con el Servicio de Hidrografía Naval (SHN) del Ministerio de Defensa para la protección contra la corrosión atmosférica marina de faros construidos con aleaciones ferrosas, se estudió la resistencia a la corrosión de recubrimientos de conversión sobre acero en presencia de solución de NaCl 0,6 M. Las propiedades y eficacia de los recubrimientos fueron evaluadas mediante distintas técnicas electroquímicas y su morfología superficial fue observada y registrada fotográficamente con una lupa estereoscópica.

Primeramente, se obtuvieron recubrimientos basados en sales de Ce, que resultaron porosos y poco adherentes. Por lo tanto, se optimizó el tratamiento de conversión para obtener películas más compactas, lo cual resultó determinante en la protección del acero base con los tratamientos posteriores. Luego, se aplicó un post-tratamiento de fosfato de Zn sobre las muestras tratadas con Ce que redujo la porosidad, formando un recubrimiento de Ce-Zn más protector del metal base. Finalmente, teniendo en cuenta los largos tiempos de exposición a los que están sometidas las aleaciones constituyentes de los faros, se aplicó resina epoxi (RE) formando un recubrimiento de Ce-Zn-RE, que aumentó la resistencia a la corrosión del acero hasta tiempos prolongados. Las muestras con triple recubrimiento presentaron mayor estabilidad que otras muestras sólo recubiertas con resina, debido a la acción inhibitoria de los óxidos de Ce y Zn que forman una capa pasiva sobre la superficie del acero, por debajo de la resina epoxi, aumentando el efecto barrera del recubrimiento a largos tiempos de exposición.

Palabras clave: *Corrosión; recubrimientos; conversión química; EIS.*

Electrochemical Evaluation of Ce Conversion Coatings on Steel in Marine Environments with Zn Post Treatment and Epoxy Resin

Abstract

As a result of a collaboration with the Servicio de Hidrografía Naval (SHN) of Ministerio de Defensa for the protection against marine atmospheric corrosion of lighthouses built with ferrous alloys, the corrosion resistance of conversion coatings on steel in the presence of NaCl 0.6 M solution was studied. The properties and effectiveness of the coatings were evaluated using different electrochemical techniques. Its surface morphology was observed and recorded photographically by a stereoscopic microscope.

At first, coatings based on Ce salts were obtained, which were porous and poorly adherent. Therefore, the conversion treatment was optimized to obtain more compact films, which was decisive in protecting the base steel with subsequent treatments. Then, a Zn phosphate post-treatment was applied on the Ce coated samples, forming a double coating Ce-Zn, which reduced the porosity, providing greater protection to the material. Finally, taking into account the long exposure times at which the alloys constituting the structure of lighthouses are subjected, epoxy resin (RE) was applied forming a triple coating of Ce-Zn-RE, which increased the steel corrosion resistance, maintaining it for long periods of time. The samples with the triple coating presented greater stability than other samples only coated with resin, due to the inhibitory action of Ce and Zn oxides that form a passive layer on the steel surface, below the epoxy resin, increasing the coating barrier effect at long exposure times.

Keywords: *corrosion; coatings; chemical conversion; EIS.*

1. Introducción

Los recubrimientos de conversión química basados en sales de elementos lantánidos son uno de los tratamientos más prometedores para modificar las propiedades de la superficie del metal y mejorar la resistencia a la corrosión.

En las últimas décadas, ha habido un interés creciente en la investigación de nuevas alternativas para reemplazar a los recubrimientos de conversión basados en cromato, ampliamente utilizados en el pasado por ser muy eficientes para la protección contra la corrosión. El uso de estos recubrimientos debió restringirse, a pesar de su eficiencia, a causa de su contenido de cromo hexavalente (Cr^{6+}), tóxico y carcinogénico [1-3].

Actualmente, se busca reemplazarlos por otro tipo de compuestos, más amigables con el medio ambiente [4-9].

Entre las nuevas posibilidades, se han investigado películas de conversión basadas en cromo trivalente, en elementos de transición como el molibdeno, en fosfatos y en sales de elementos de la serie de los lantánidos como cerio (Ce), neodimio (Nd), praseodimio (Pr), lantano (La), itrio (Y) o samario (Sm). En cuanto a estos últimos, los estudios pioneros fueron los de Arnott y Hinton [10,11], quienes informaron que la adición de cloruros de Ce, Nd y Pr a una solución de NaCl 0,1 M induce a una disminución de la velocidad de corrosión de la aleación de AA 7075 en más de un factor de 10, a través de la formación de películas protectoras sobre el metal. El mecanismo de protección de estos recubrimientos se atribuye a su capacidad de inhibición catódica, que suprime la reacción de reducción de oxígeno y conduce a la formación de óxidos e hidróxidos insolubles a partir de los iones lantánidos.

A partir de estos estudios, diversas publicaciones han investigado este tipo de recubrimientos sobre distintas aleaciones metálicas, con el objetivo de conocer cuáles de ellos brindan mayor efectividad en la protección frente a la corrosión [12-43]. Los recubrimientos a base de Ce han sido los que demostraron mayor efectividad sobre aleaciones de aluminio [14-26], cinc [27], magnesio [28-32] y acero [14,33-43].

Uno de los procedimientos más estudiados para la obtención de recubrimientos de conversión es la inmersión del metal en una solución de una sal del elemento lantánido [13-15,18-21,29-40]. En el caso de los recubrimientos a base de cerio, este proceso de conversión se puede acelerar mediante el agregado de compuestos químicos que catalicen la oxidación del cerio para la formación de capas protectoras más adherentes y resistentes a la corrosión. El agua oxigenada (H_2O_2) es uno de los compuestos que más se han utilizado con ese fin. Su adición, en pequeñas cantidades, provoca una disminución del pH que favorece que los iones Ce^{3+} se oxiden a Ce^{4+} y precipiten en forma de óxidos de Ce (IV), que al incorporarse en el recubrimiento son los responsables de la generación de una película de color amarillento [19-21,30,31,33,34].

La formación y las propiedades anticorrosivas de la película de conversión están fuertemente influenciadas por las condiciones del tratamiento, tales como composición de la solución, pH, temperatura del baño de inmersión, tiempo de inmersión, aditivos, etc. Además, se ha demostrado que los aniones de la solución de conversión, tales como Cl^- , NO_3^- o SO_4^{2-} , condicionan el comportamiento anticorrosivo de las películas de conversión basadas en cerio [26,30,39,40]. Según Kobayashi y Fujiwara [40], la adición

de sulfato a la solución de recubrimiento mejora considerablemente la resistencia a la corrosión, ya que los iones sulfato se incorporan en la película y dan origen a recubrimientos con menor tamaño cristalino

Si bien la protección mediante recubrimientos a base de cerio mejora la resistencia a la corrosión del acero, se ha informado frecuentemente sobre las características poco compactas y la porosidad de estos recubrimientos, que crean vías para la difusión del electrolito. Por este motivo, varios autores han estudiado el uso de post-tratamientos sobre las capas de cerio, como agentes de sellado [20,41-45]. Se ha informado que, en particular, la post-deposición de fosfato de cinc mejora el comportamiento anticorrosivo, tanto en recubrimientos de conversión sobre aluminio [20,41,42] como sobre acero [43-45], ya que favorece la formación de una capa más densa y con menos microgrietas.

Por otra parte, para proteger las aleaciones ferrosas frente a la corrosión de atmósferas agresivas los recubrimientos poliméricos orgánicos son ampliamente utilizados. Entre ellos, los recubrimientos epóxicos se encuentran entre los más empleados, ya que la resina ejerce un efecto barrera, separando al metal del medio corrosivo. Sin embargo, las propiedades de barrera a menudo son insuficientes, ya que este recubrimiento es permeable para algunas especies corrosivas, como resultado de la degradación del recubrimiento en tiempos prolongados de exposición. De este modo, los iones agresivos pueden difundir a través de sus poros, iniciando el proceso corrosivo.

Teniendo en cuenta esto, uno de los métodos que han sido más usados en las últimas décadas para mejorar la resistencia a la corrosión del acero son los recubrimientos en los cuales se incorporan partículas inorgánicas en la resina epoxi para retrasar el fenómeno de corrosión, denominados a menudo como pinturas [45-48], o bien aquellos formados por una resina epoxi aplicada como post-tratamiento sobre muestras ya tratadas con compuestos pasivantes [44,45,49,50]. Tanto los compuestos pasivantes como las sustancias inorgánicas incorporadas a la resina tienen un efecto inhibitor, limitando las reacciones anódicas, catódicas o ambas.

En el presente trabajo, a partir de una colaboración con el Servicio de Hidrografía Naval (SHN) del Ministerio de Defensa, para la protección contra la corrosión atmosférica marina de faros costeros construidos con aleaciones ferrosas, se desarrollaron técnicas de aplicación de recubrimientos de conversión sobre acero y se

estudió su eficacia y protección brindadas. Primeramente, se formaron películas a base de sales de Ce. Luego, a algunas de las muestras tratadas con sales de Ce se les aplicó, mediante inmersión, un post-tratamiento de fosfato de Zn, formando un recubrimiento doble. Finalmente, se aplicó resina epoxi sobre muestras con doble recubrimiento, formando un triple recubrimiento de Ce, Zn y resina epoxi. Además, algunas muestras de acero se cubrieron con resina epoxi sola, a fines de ser usadas como comparación.

Para cada uno de los recubrimientos mencionados se llevaron a cabo mediciones, a distintos tiempos de inmersión, a través de técnicas como variación temporal del potencial de corrosión, polarización potenciodinámica, polarización lineal y espectroscopía de impedancia electroquímica, en solución de NaCl 0,6 M. La morfología superficial de las muestras se observó y registró fotográficamente mediante lupa estereoscópica.

2. Materiales y Métodos

Se emplearon muestras de acero comercial, de grano austenítico, cortadas en placas de 40x40 mm, lijadas utilizando pulidora y papel esmeril de distinta granulometría hasta grado 1200 y desengrasadas con alcohol etílico, con el objetivo de obtener una superficie homogénea, libre de óxidos e impurezas. Su composición química se analizó a través de espectrometría de emisión óptica en plasma inductivamente acoplado (ICP-OES), disolviéndolas en HCl 30% v/v y utilizando un espectrómetro Perkin Elmer modelo Óptica 2000.

Se formaron recubrimientos de conversión química sobre las muestras de acero por inmersión en dos sales de Ce, a temperatura ambiente: nitrato de Ce IV y amonio $((\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6)$ y sulfato de Ce III $(\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3)$. Para ello se prepararon dos baños de tratamiento químico, uno de nitrato y otro de sulfato, usando 150 ml de soluciones de $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ 0,03 M y $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$ 0,03 M respectivamente. En ambos baños se agregaron 3 ml de H_2O_2 35% al 2% v/v, observando una disminución del pH a 4 en la solución de nitrato y a 3 en la de sulfato de cerio. Las muestras de acero se mantuvieron en inmersión durante 20 min en nitrato y durante 10 min en sulfato. Por otra parte, algunas muestras tratadas con las sales de Ce y otras sin tratar fueron inmersas en un baño de tratamiento químico de fosfato de cinc $(\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2)$ durante 30 min, el cual consistió en 5 g/l de óxido de cinc (ZnO), 11,3 ml/l de ácido fosfórico y 1 g/l de nitrito de sodio (pH 3). Luego de los tratamientos químicos, todas las muestras se secaron al

aire y se mantuvieron en un recipiente hermético.

Las muestras preparadas inicialmente fueron:

- Acero sin tratar (acero 0)
- Acero tratado con el baño de sulfato de cerio durante 10 minutos (acero 1).
- Acero tratado con el baño de fosfato de zinc durante 30 minutos (acero 2).
- Acero tratado con el baño de sulfato de cerio durante 10 minutos y luego con baño de fosfato de zinc durante 30 minutos (acero 3).
- Acero tratado con el baño de nitrato de cerio y amonio durante 20 minutos y luego con baño de fosfato de zinc durante 30 minutos (acero 4).

Las muestras de acero tratadas con sulfato de Ce y luego con fosfato de Zn (acero 3), resultaron ser las más protectoras. Teniendo en cuenta esto, se aplicó sobre ellas y sobre algunas muestras de acero sin tratar una capa de resina epoxi de alta viscosidad, mezclando 20 ml de resina con 10 ml de endurecedor y dejando secar por cinco días. A estas muestras se les dio la siguiente denominación general:

- Acero sin tratar con resina epoxi (acero RE)
- Acero 3 (Ce-Zn) con resina epoxi (acero Ce-Zn-RE)

Una vez secada la resina epoxi, mediante lijado manual con papel esmeril hasta grados 1200, se redujo su espesor hasta aproximadamente 100 μm , aunque no todas las muestras presentaron el mismo espesor. Se prepararon distintas muestras de aceros RE y Ce-Zn-RE con distintos espesores de recubrimiento, que fueron denominadas desde E hasta E4 y desde CZE hasta CZE4. La medición de los espesores de los recubrimientos se realizó con un medidor Elcometer.

Todas las mediciones electroquímicas se llevaron a cabo en solución de NaCl 0,6 M, a distintos tiempos de inmersión. Antes de cada medición se registró la variación del potencial de corrosión durante la primera hora, frente a un electrodo de referencia de calomel saturado (0,242 V vs ENH), el cual estaba en contacto con el electrodo de trabajo a través de un capilar de Luggin, para disminuir efectos de caída óhmica. Se utilizó un potencióstato de EG&G Princeton Applied Research, modelo Parstat 2273 y la celda Flat, modelo K0235, consistente en un cilindro de vidrio colocado horizontalmente entre 2 placas en los extremos, en una de las cuales se coloca el electrodo de trabajo, permitiendo que un área de 1 cm^2 esté en contacto con la solución,

mientras que la placa del otro extremo contiene al contraelectrodo de platino. Para las curvas de polarización se aplicó un escaneo de desde -1,2 V hasta 1,2 V, con una velocidad de barrido de 1 mV/s. La medida de la resistencia de polarización (R_p) se llevó a cabo mediante la técnica de polarización lineal, haciendo un escaneo de +/- 20 mV con respecto al potencial de corrosión, con una velocidad de barrido de 0,166 mV/s. Las medidas de EIS se realizaron cubriendo el rango de frecuencias desde 100 kHz a 1 mHz, con una amplitud de 10 mV.

Para la observación y registro fotográfico de la morfología de los recubrimientos se empleó una lupa estereoscópica digitalizada Leica S6 D acoplada a una computadora, usando el Software Leica Application Suite, version 4.1.0.

3. Resultados

En la Tabla 1 se presenta la composición química de las muestras de acero, determinada mediante ICP-OES.

Tabla 1. Concentración (Wt. %) de acero y límite de detección (LD), ICP-OES.

Elemento	Cr	Mn	Mg	Cu	Zn	Fe
Conc. (Wt. %)	1.08±0.01	0.74±0.01	< 0.002	0.12±0.01	< 0.02	Balance
LD (Wt. %)	0.003	0.001	0.002	0.004	0.02	0.008

El tratamiento de formación de los recubrimientos de conversión, mediante inmersión de las muestras de acero en los baños de $Ce_2(SO_4)_3$ y de $(NH_4)_2Ce(NO_3)_6$, se fue optimizando con el fin de obtener películas más compactas y adherentes. De este modo, se determinó que el tiempo necesario para cubrir toda la superficie de las muestras era de 10 min en el baño de $Ce_2(SO_4)_3$ y de 20 min en el de $(NH_4)_2Ce(NO_3)_6$.

En la Fig. 1 se muestra, a modo de ejemplo, la imagen de la generación del recubrimiento sobre muestras de acero en el baño de sulfato de cerio III, cerca de los 10 min de tratamiento. Se observa la formación de burbujas por acción del agregado de H_2O_2 y que la superficie de la muestra está completamente cubierta de un recubrimiento ocre amarillento, con manchas marrones. A pesar de esto, al observarla a simple vista y mediante lupa estereoscópica, se pudo apreciar porosidad y pérdida de adhesión en la

película de Ce. Análogamente, se observó para las muestras con baño de nitrato de cerio y amonio la presencia de poros y pérdidas de adhesión.

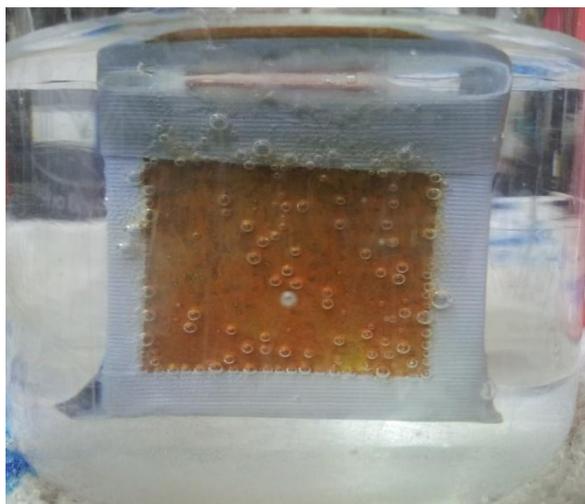


Figura 1. Acero en $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$ con agregado de H_2O_2 .

Sobre las muestras tratadas únicamente con el baño de fosfato de Zn se formaron recubrimientos de un color blanco grisáceo, que resultaron poco protectores del metal base.

Los recubrimientos de Ce con un post-tratamiento de fosfato de Zn, por el contrario, resultaron más parejos y compactos que los de Ce solos, como se puede observar en la Fig. 2, en que se presenta el aspecto sobre la superficie del acero debido al tratamiento con el baño de sulfato de cerio solo (Figs. a y b) y del acero tratado en el baño de sulfato de cerio seguido de un post tratamiento en el baño de fosfato de cinc (Figs. c y d), vistos en lupa estereoscópica.

Se puede apreciar en Fig. 2a la presencia de bandas verticales de color marrón sobre la superficie amarillenta y de depósitos puntuales o pequeños círculos deprimidos distribuidos en todo el área de exposición al tratamiento, que se observan en más detalle en Fig. 2b. En Fig. 2c se observa la modificación superficial debido al post-tratamiento con fosfato de cinc, que produce una capa anaranjada más pareja, aunque aún se continúan observando los pequeños círculos mencionados, que se aprecian en detalle en Fig. 2d.

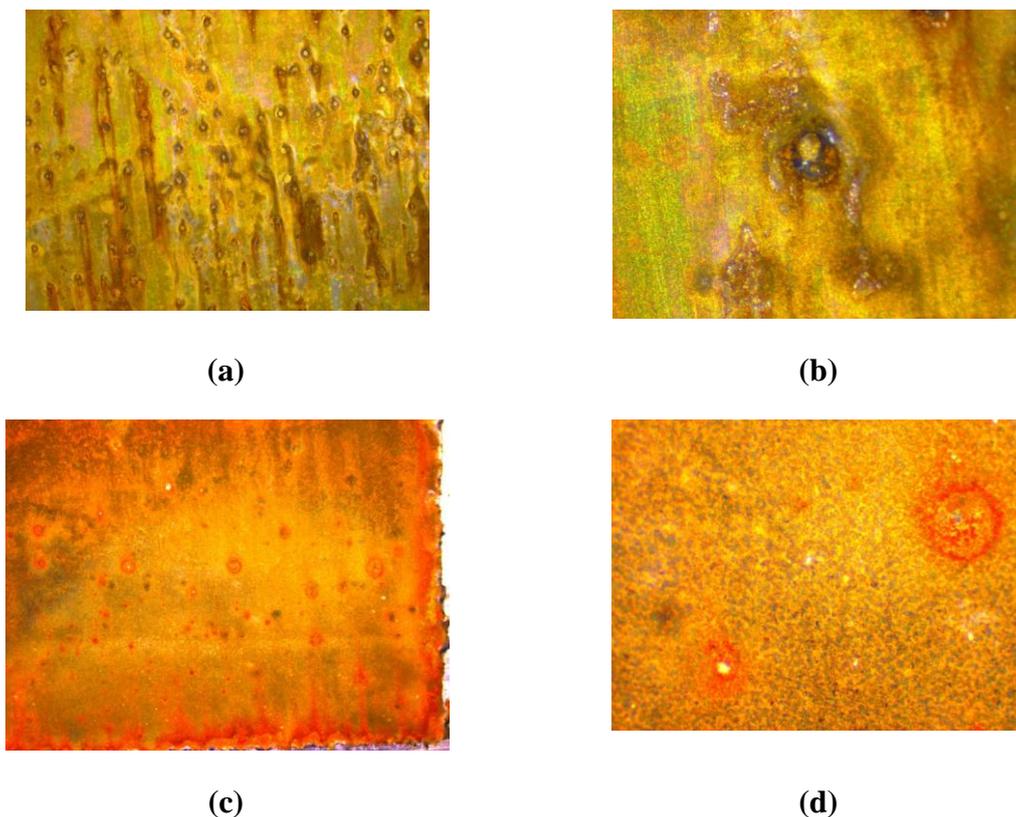


Figura 2. Aspecto en lupa estereoscópica de acero recubierto con: sulfato de Ce (a) panorámica, zoom 0,63, (b) detalle, zoom 4; sulfato de Ce + fosfato de Zn (c) panorámica, zoom 0,63; (d) detalle, zoom 4.

Caracterización electroquímica del comportamiento anticorrosivo de los recubrimientos

Mediante las técnicas de polarización lineal, polarización potenciodinámica y espectroscopía de impedancia electroquímica se pudo determinar que los recubrimientos realizados con sulfato de Ce (III) + fosfato de cinc eran más protectores que los de nitrato de Ce (IV) y amonio + fosfato de cinc.

En la Fig. 3 se presentan las curvas de polarización para acero 0 (sin tratar), acero 3 (sulfato de Ce + fosfato de Zn) y acero 4 (nitrato de Ce y amonio + fosfato de Zn), con una hora de inmersión en NaCl 0,6 M.

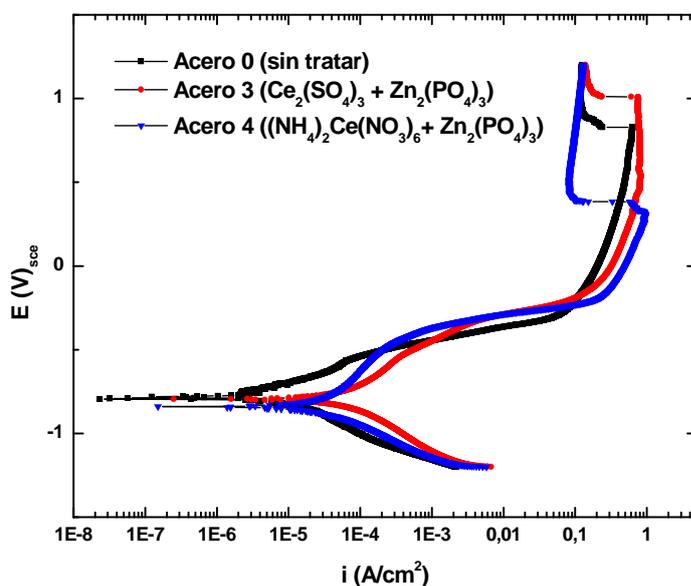
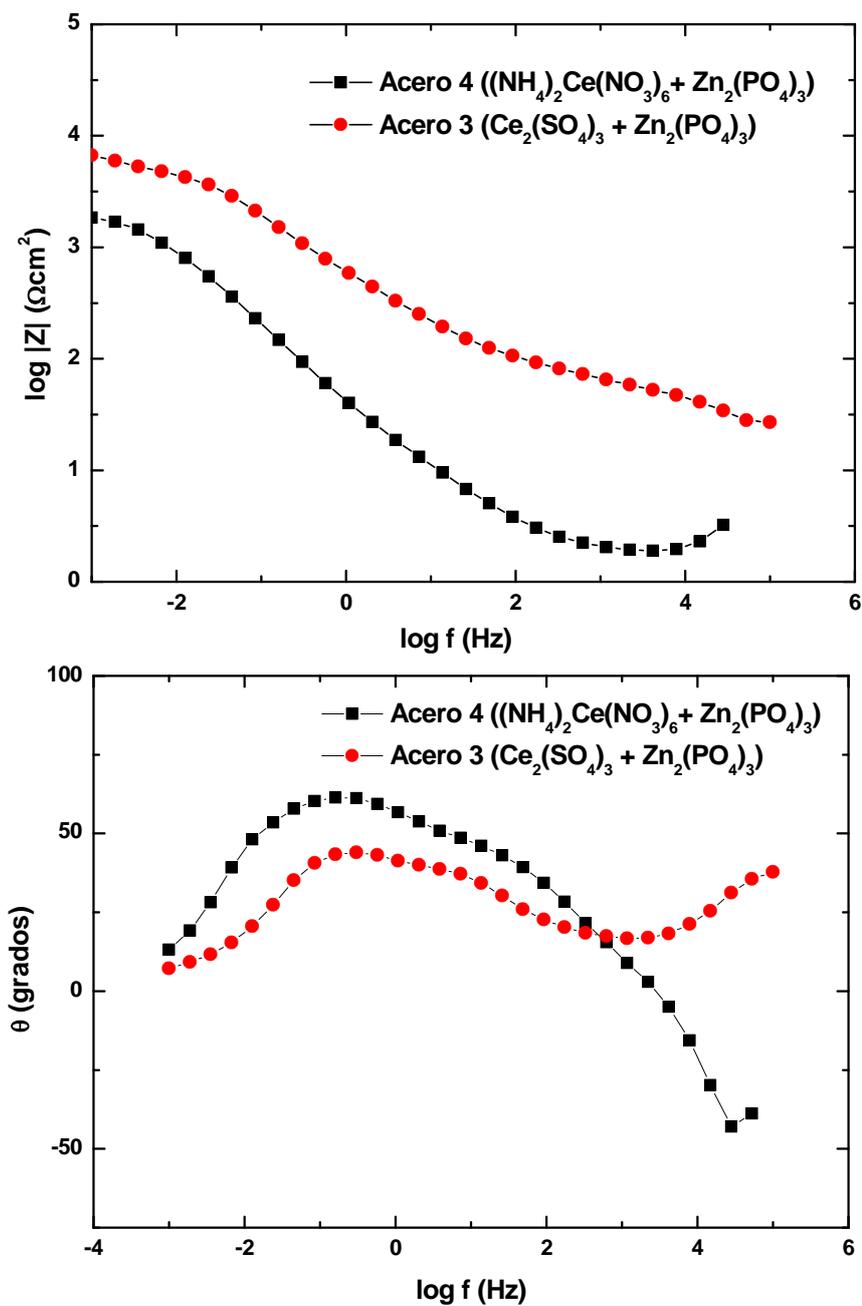


Figura 3. Curvas de polarización para aceros 0, 3 y 4 con 1 h de inmersión en NaCl 0,6 M.

Se puede observar una menor región de pasivación en la muestra recubierta con nitrato con respecto a la recubierta con sulfato.

En las Figs. 4 y 5 se presentan, respectivamente, los diagramas de Bode ((a) módulo y (b) ángulo) y de Nyquist de los espectros de impedancia obtenidos para muestras con recubrimientos de sulfato + fosfato (acero 3) y nitrato + fosfato (acero 4), con 1 h de inmersión en NaCl 0,6 M.

(a)



(b)

Figura 4. Diagramas de Bode para aceros 3 y 4, con 1 h de inmersión en NaCl 0,6 M: (a) módulo; (b) ángulo.

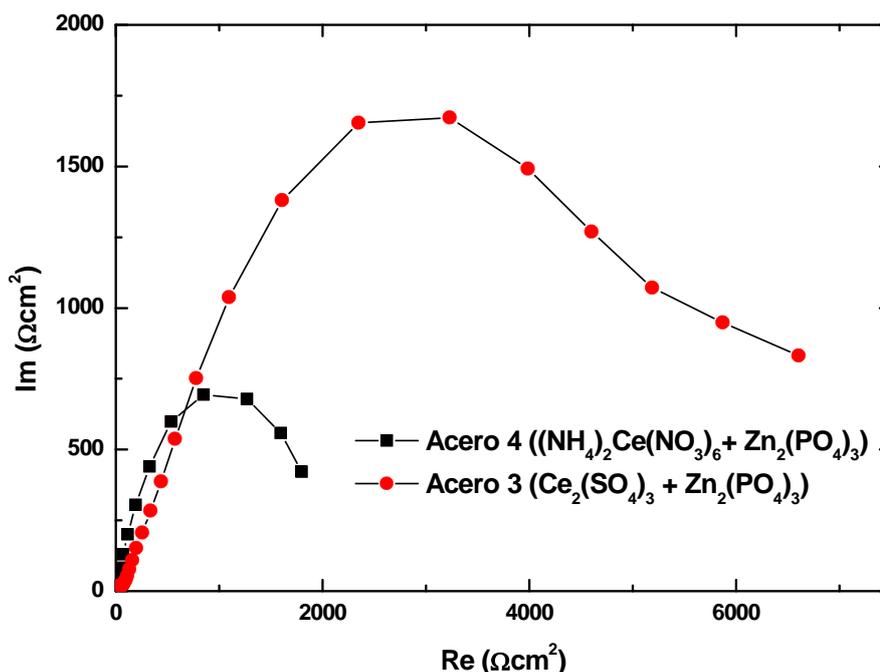


Figura 5. Diagrama de Nyquist para aceros 3 y 4, con 1 h de inmersión en NaCl 0,6 M.

Se observa que los valores de impedancia son mayores en todo momento para el acero 3 (sulfato) que para el acero 4 (nitrato), lo cual puede apreciarse tanto en el gráfico del módulo (Fig. 4a) como en el diagrama de Nyquist (Fig. 5). En este último diagrama se puede notar, además, que el valor de R_p , dado por el valor de Z_{Re} a la frecuencia más baja, es bastante mayor para el recubrimiento de sulfato de cerio. En el diagrama de Bode ángulo (Fig. 4b), el gráfico para sulfato muestra dos constantes de tiempo, características de un metal recubierto. En el nitrato, en cambio, la curva se hace más ancha y hay un corrimiento a bajas frecuencias, lo que es indicativo de una disminución en la resistencia del recubrimiento y un aumento en la absorción de electrolito en la película.

Por otra parte, la magnitud del módulo de impedancia a bajas frecuencias ($|Z|_{0,001}$) ha sido usada a menudo para cuantificar la resistencia a la corrosión brindada por un recubrimiento, obteniéndose mayor resistencia a la corrosión a mayores valores de dicho parámetro [51]. En la Fig. 4a. se observa un valor más alto de $|Z|_{0,001}$ para el recubrimiento de sulfato que para el de nitrato de cerio.

Una posible explicación del comportamiento del nitrato de Ce (IV) y amonio es que esta sal, a una concentración de 10^{-2} M, se hidroliza en medio acuoso, formando

soluciones ácidas. Matter y col. [25] usaron este compuesto como inhibidor de AA2024 en NaCl 0.01 M, observando que la acidificación de la solución debido a la hidrólisis de la sal promovía la corrosión de la aleación.

Otros autores lograron obtener buenos recubrimientos con nitrato de cerio (III) ($\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$) sobre acero, sólo por inmersión a altas temperaturas (50°C) o por deposición electroquímica [33].

En el caso del sulfato de Ce (III), por el contrario, su reactividad es mayor a temperatura ambiente, ya que es uno de los pocos compuestos químicos cuya solubilidad en agua disminuye con la temperatura (a 0°C es de 101 g/l y a 100°C de 2,5 g/l).

A partir de estos resultados, sólo se siguió evaluando la protección ofrecida por el recubrimiento obtenido sobre el acero con sulfato de cerio (III) a temperatura ambiente.

Se llevaron a cabo mediciones en solución de NaCl 0,6 M para acero 0 (sin tratar), acero 1 (recubierto con sulfato de cerio), acero 2 (recubierto con fosfato de cinc) y acero 3 (recubierto con sulfato de cerio + fosfato de cinc), hasta 48 horas de inmersión, empleando las técnicas de variación temporal del potencial de corrosión, polarización lineal y espectroscopía de impedancia electroquímica. Los resultados obtenidos indicaron que el acero con recubrimiento doble (Ce-Zn) dio mejores resultados en todos los casos y, por lo tanto, resultó ser más protector del sustrato metálico en los tiempos estudiados.

En la Fig. 6 se presenta la variación del potencial de corrosión, hasta 48 h de inmersión en NaCl 0,6 M, para acero sin tratar y con recubrimientos. Se puede observar que tanto el acero sin tratar (acero 0) como el recubierto con $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ (acero 2) presentan una marcada disminución del potencial en las primeras 24 horas de inmersión, la cual sigue decreciendo un poco más levemente, hasta las 48 horas en solución. Los aceros con recubrimiento de Ce (aceros 1 y 3), por el contrario, presentan menor variación del potencial en las primeras horas de inmersión, estabilizándose luego de las 24 horas. El acero 3 es el que presenta valores de potencial más nobles y una tendencia levemente creciente a medida que transcurre el tiempo de inmersión, llegando a las 48 horas a un valor de -0,63 V (0,1 V por encima que el del acero sin tratar al mismo tiempo de inmersión).

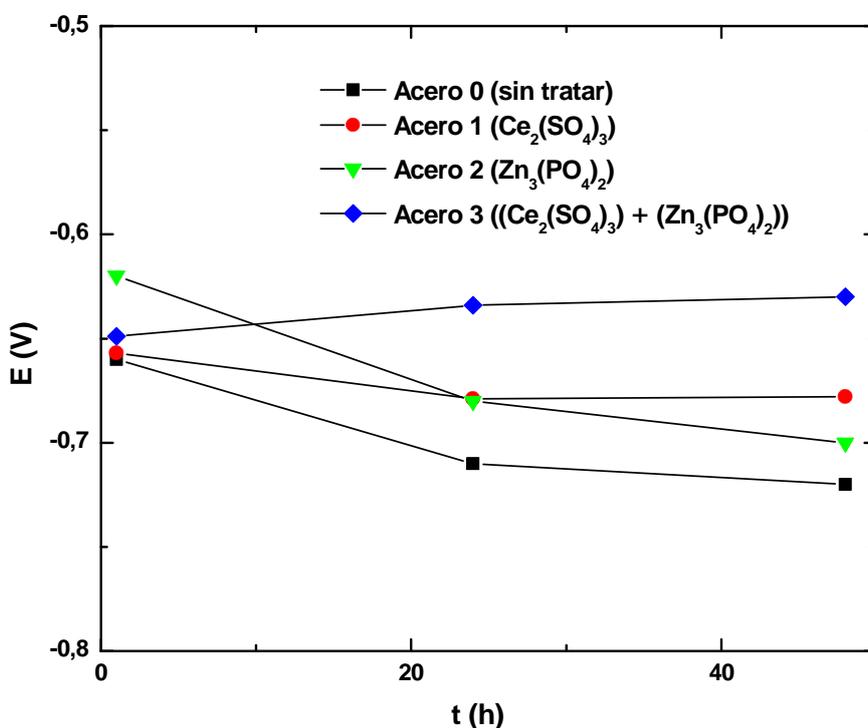


Figura 6. Variación temporal del potencial de corrosión para acero sin tratar y con recubrimientos hasta 48 h de inmersión en NaCl 0,6 M.

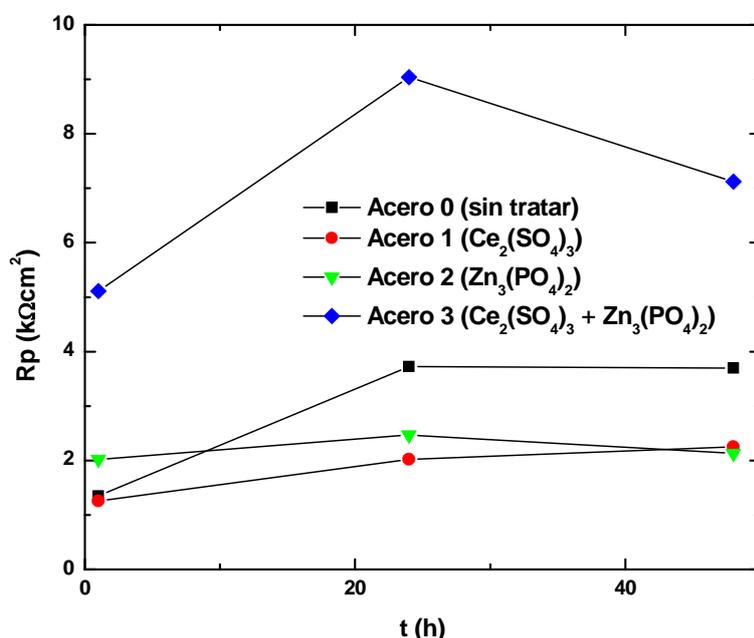
La técnica de polarización lineal o de resistencia a la polarización es un método electroquímico que permite determinar la velocidad de corrosión instantánea, aplicando una señal de voltaje al electrodo de trabajo, muy cercana al valor del potencial de corrosión. Como la diferencia entre el voltaje aplicado y el potencial de corrosión es muy pequeña, la medida no afecta la superficie ensayada y se considera una técnica no destructiva.

La resistencia a la polarización (R_p) se puede medir a partir de la pendiente del gráfico de potencial vs corriente. Según la ecuación de Butler-Volmer (1), R_p es inversamente proporcional a la corriente de corrosión (i_c) y B es una constante de proporcionalidad que puede calcularse a partir de las dos constantes de Tafel (β_a y β_c):

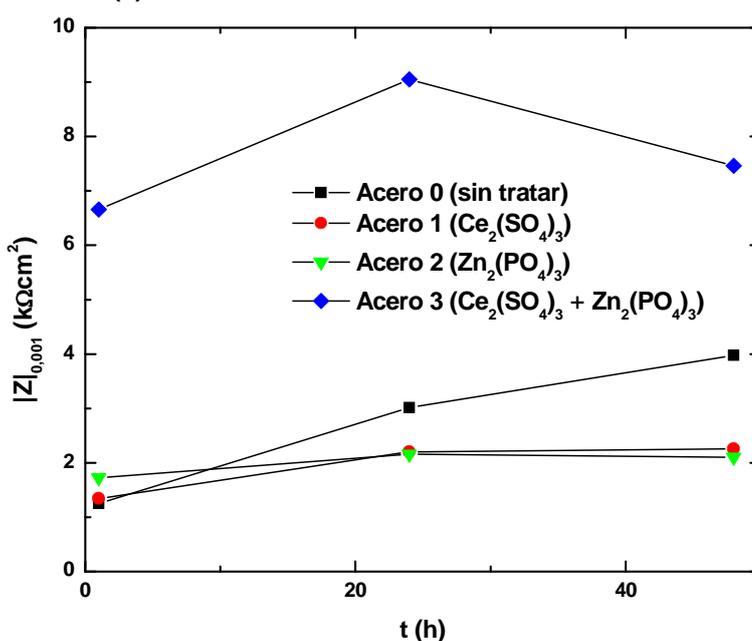
$$R_p = B/i_c \quad (1)$$

En la Fig. 7 se presenta la variación temporal, para acero sin tratar y con recubrimientos, hasta 48 h de inmersión en NaCl 0,6 M, de la resistencia a la polarización (R_p), obtenida mediante fiteos por la técnica de resistencia a la polarización (a) y del módulo de la impedancia a bajas frecuencias ($|Z|_{0,001}$), obtenido mediante EIS (b). Este último valor corresponde a la suma de la resistencia a la polarización (R_p) y la resistencia de la solución (R_s):

$$|Z|_{0,001} = R_p + R_s \quad (2)$$



(a)



(b)

Figura 7. Variación temporal para acero sin tratar y con recubrimientos en NaCl 0,6 M de: (a) R_p ; (b) $|Z|_{0,001}$.

Los resultados de la Fig. 7 muestran valores muy similares para ambos parámetros. Los valores de $|Z|_{0,001}$ son casi iguales o levemente superiores a los de R_p , ya que el valor de la resistencia de la solución (R_s) es, por lo general, bastante bajo. Esta similitud es indicativa, además, de una buena concordancia entre los parámetros obtenidos a partir de ambas técnicas.

La mayor protección se obtiene para el recubrimiento doble Ce-Zn (acero 3), mientras que la protección ofrecida por los recubrimientos de Ce (acero 1) y Zn (acero 2) no llegan a superar a la del acero sin tratar (acero 0).

En la Fig. 8 se presentan los diagramas de Nyquist para acero sin tratar y con los tres recubrimientos estudiados, luego de 48 h de inmersión en NaCl 0,6 M.

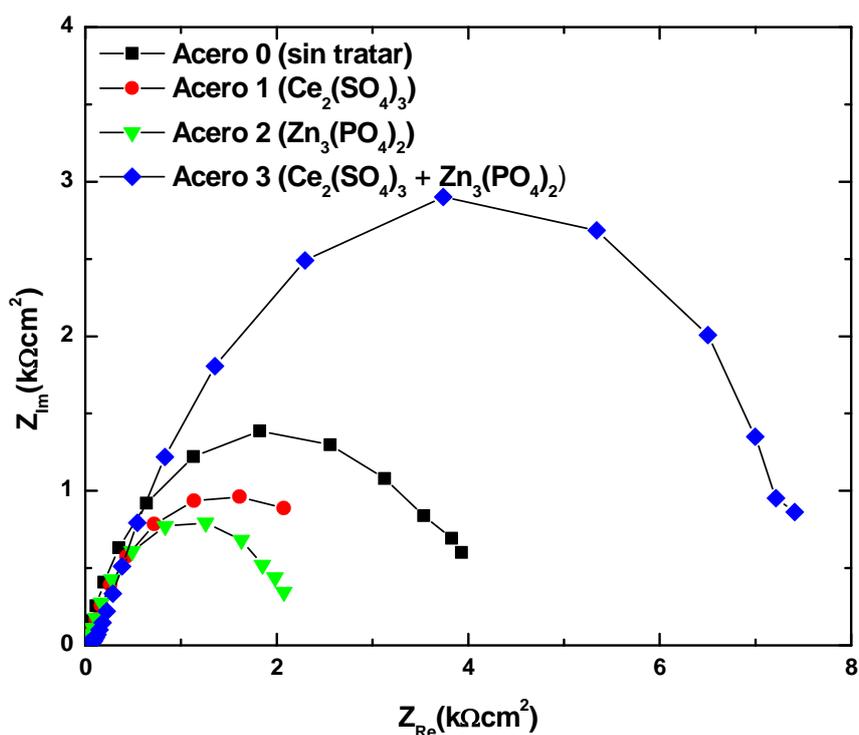


Figura 8. Diagramas de Nyquist para acero sin tratar y con recubrimientos luego de 48 h de inmersión en NaCl 0,6 M.

El módulo de la impedancia en los diagramas de Nyquist, luego de 48 h de inmersión, es mucho mayor para el recubrimiento doble Ce-Zn (acero 3) que para el acero sin tratar

(acero 0), al contrario de lo que sucede para los recubrimientos de Ce o Zn solos (aceros, 1 y 2), cuyos valores de impedancia son menores que los del acero desnudo, indicando que la película es porosa y hay un proceso de corrosión a través de ella. Por otro lado

para el caso del acero 3 se puede apreciar que el valor de R_p , dado por el valor de Z_{Re} a la frecuencia más baja, es casi el doble que el del acero solo (0), lo que denota su buena protección. Estos resultados demuestran que el empleo de los dos baños de conversión química (Ce-Zn) mejora la resistencia a la corrosión.

Por otra parte, se llevaron a cabo mediciones con las mismas técnicas para el acero con recubrimiento de Ce-Zn (acero 3) en NaCl 0,6 M, a tiempos de inmersión prolongados. En la Fig. 9 se presentan los diagramas de Nyquist correspondientes a estas medidas, hasta los 55 días de inmersión.

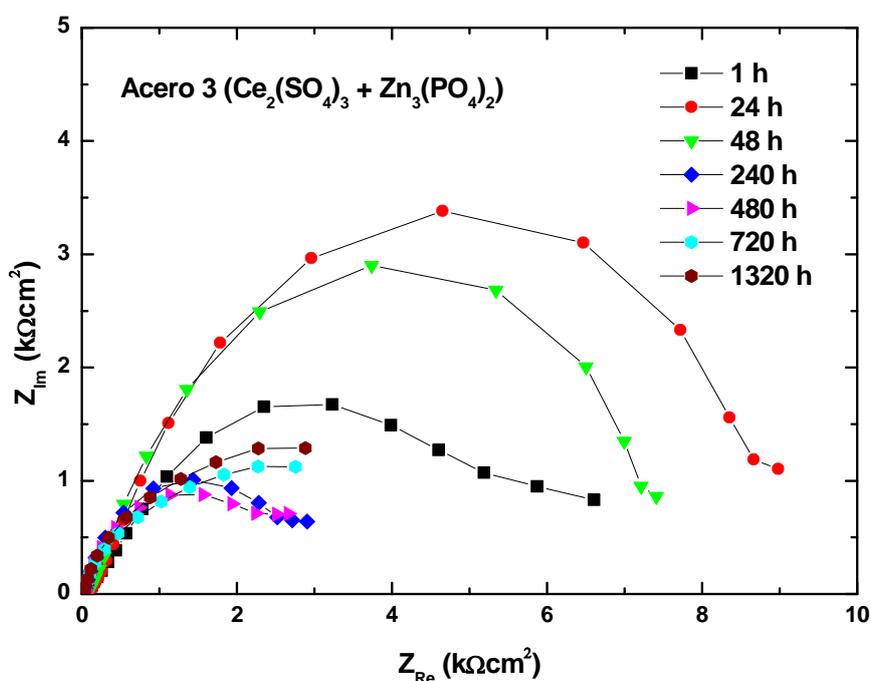


Figura 9. Diagrama de Nyquist para acero 3 en NaCl 0,6 M hasta 55 días de inmersión.

Se puede apreciar que los valores de impedancia van en aumento, pasando por un máximo a las 24 horas de inmersión y se mantienen hasta las 48 horas en solución. A partir de los 10 días de inmersión, los diagramas de Nyquist sufren cambios y los valores de impedancia disminuyen abruptamente por debajo de los que presentaban luego de la primera hora de inmersión. Esto se debería a que la película formada sobre

la superficie de la muestra presenta una capacidad de barrera débil, que permite obstruir el acceso de iones cloruro agresivos sobre el sustrato metálico durante las primeras horas de inmersión. Sin embargo, con el transcurso del tiempo de inmersión la pérdida de adhesión de la película y el aumento de la permeabilidad permiten el paso de los iones agresivos y como consecuencia, la continuidad del proceso de corrosión. Por lo tanto, la protección ofrecida por el acero con recubrimiento doble sólo se mantiene hasta las 48 horas de inmersión.

Finalmente, se evaluó el comportamiento de distintas muestras de acero con recubrimiento triple (Ce-Zn-RE), comparándolas con muestras sólo tratadas con resina epoxi (RE), a tiempos de inmersión de hasta 50 días en NaCl 0,6 M.

En la Fig. 10 se presenta la variación con el tiempo de inmersión de los valores de resistencia de polarización para tres muestras con diferente espesor de recubrimiento de Ce-Zn-RE (CZE, CZE2 y CZE4).

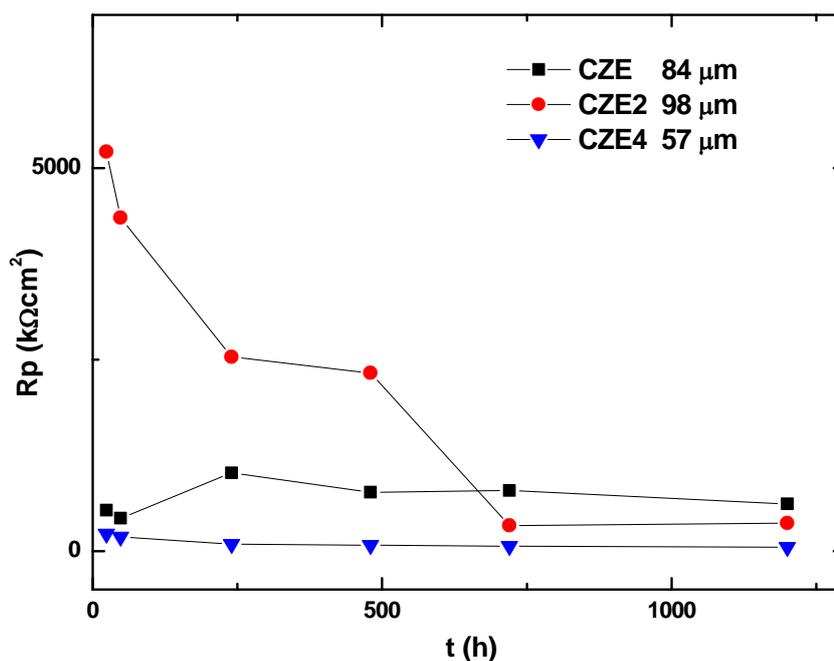


Figura 10. Variación temporal de la resistencia a la polarización (R_p) para tres muestras con diferente espesor de recubrimiento triple (Ce-Zn-RE).

Los valores de R_p graficados van desde las 24 h hasta las 1200 h. No se graficaron los valores de la primera hora, ya que las muestras con resina presentan, por lo general, un alto efecto barrera en los primeros tiempos de inmersión que se traduce en valores de R_p muy altos, que tienden a estabilizarse hacia las 24 horas en solución.

En el caso de la muestra de mayor espesor (CZE2, de 98 μm) los altos valores de R_p que se observan a las 24 h van disminuyendo hasta las 240 h (10 días de inmersión), luego se mantienen estables hasta los 20 días y a partir de ese momento decaen marcadamente. Finalmente, se estabilizan después de los 30 días, en valores cercanos a los 350000 $\text{K}\Omega\text{cm}^2$.

Para la muestra CZE, de 84 μm , se puede observar que la R_p aumenta a los 10 días, disminuye levemente a los 20 días y se mantiene en valores más o menos constantes (cerca de los 700000 $\text{K}\Omega\text{cm}^2$) hasta los 50 días de inmersión.

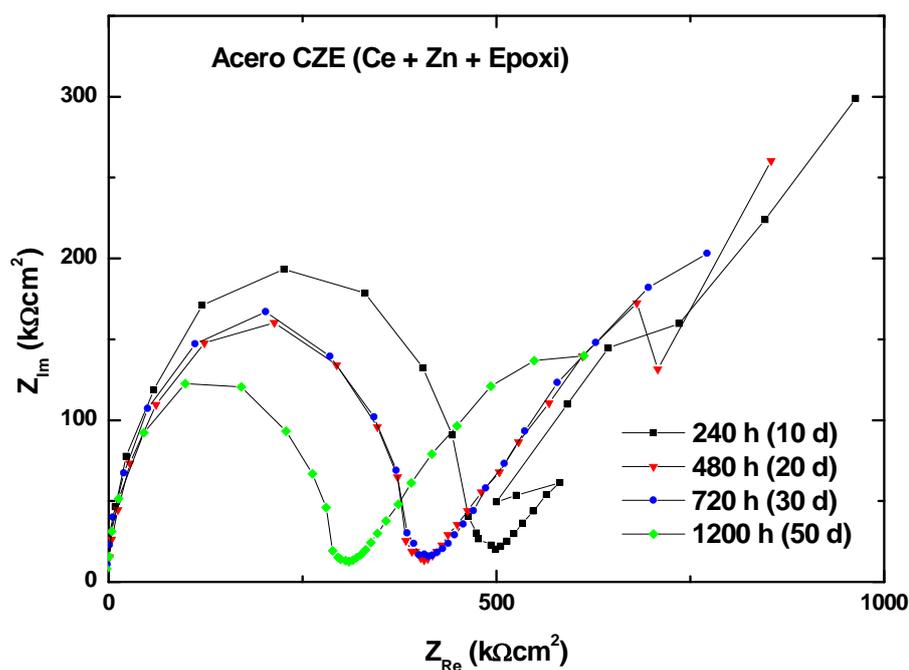


Figura 11. Diagramas de Nyquist para acero CZE a 10, 20, 30 y 50 días de inmersión en NaCl 0,6 M.

En la muestra de menor espesor (CZE4, de 57 μm), los valores de R_p son bastante más bajos y van disminuyendo levemente durante todo el ensayo.

Estos resultados indican que la muestra CZE es la que presenta un espesor de recubrimiento óptimo, con valores de R_p bastante estables y más altos que los de las otras dos muestras a largos tiempos de inmersión.

En la Fig. 11 se presentan los diagramas de Nyquist para el acero CZE, desde 10 a 50 días de inmersión en NaCl 0,6 M.

En primer lugar, se puede apreciar que al comparar los valores de impedancia de la Fig. 11 con aquellos de los recubrimientos sin resina (Fig. 8), los valores de las muestras con recubrimiento triple (Ce-Zn-RE) son casi dos órdenes de magnitud más altos que los de las muestras con recubrimiento doble (Ce-Zn). El efecto barrera del recubrimiento triple es mucho mayor, debido a la incorporación de una tercera capa de resina, con espesores superiores a 50 μm .

Se observa, por otra parte, que los diagramas de Nyquist de la Fig. 11 presentan un semicírculo que disminuye de tamaño a medida que transcurre el tiempo de inmersión y una línea recta ascendente, que indicaría una impedancia difusional, que se hace más definida hacia los 20 días de inmersión. Esto significa que la película se hace más porosa al permanecer mucho tiempo en solución y hay un proceso de difusión de iones a través de ella. Se observa una disminución en los valores de impedancia entre los 10 y 20 días de inmersión. Luego, estos valores se mantienen constantes hasta los 30 días y hacia los 50 días de inmersión, tanto los valores de impedancia como el tamaño del semicírculo decrecen nuevamente, indicando la disminución de la protección ofrecida por el recubrimiento.

Los diagramas de Nyquist de la muestra de mayor espesor (CZE2, de 98 μm) son similares a los de la muestra CZE pero con valores de impedancia bastante superiores. Tanto el tamaño de las semicircunferencias como los valores de R_p -dados por el valor de Z_{Re} a la frecuencia más baja- son mayores para la muestra CZE2, lo que está relacionado al efecto barrera ofrecido por el recubrimiento de resina epoxi de mayor espesor. Sin embargo, se observa una mayor disminución de la protección con el tiempo de inmersión para la muestra CZE2 respecto de la muestra CZE.

Las muestras sólo tratadas con resina epoxi (RE) presentaron valores de impedancia aún mayores que los del recubrimiento triple en las primeras horas de inmersión. Sin embargo, hubo una notoria pérdida de protección del recubrimiento y existió un ciclo de alternancias de mayores y menores valores de impedancia a medida que transcurrían los

días en solución. Además, varias estas muestras dieron valores muy dispersos, con mucho ruido y no se pudieron obtener gráficos ni parámetros de fiteo coherentes.

Por otra parte, las muestras con resina epoxi sola no presentaron una clara evidencia de depender del espesor de la resina, al contrario de lo observado para las muestras con triple recubrimiento (Ce-Zn-RE), en las que se observó un aumento de la resistencia a la corrosión con el incremento del espesor. Este comportamiento se evidenció en los valores de resistencia a la polarización y de impedancia más altos a mayor espesor del recubrimiento de resina.

La mayor estabilidad en el tiempo de las muestras con triple recubrimiento, comparadas con las que contienen sólo resina epoxi, se puede explicar debido a la acción inhibitoria de los óxidos de Ce y Zn que forman una capa pasiva sobre la superficie del acero a proteger, por debajo de la resina epoxi. De este modo, aumenta el efecto barrera del recubrimiento a tiempos de exposición prolongados.

Este tipo de recubrimientos pueden aplicarse a superficies externas. En el caso de las estructuras de acero expuestas a la atmósfera marina, las pinturas podrían contener Ce y/o Zn y ser aplicadas una o más capas sobre la superficie del acero para protegerla de la corrosión. Por ejemplo, se puede utilizar la llamada galvanización en frío, que es un procedimiento que consiste en recubrir una pieza metálica con una capa de pintura con zinc. Y sobre esta pintura, denominada primer, se debería aplicar como terminación una pintura epoxi, que brinde un buen efecto barrera frente a la atmósfera marina.

4. Conclusiones

Las películas de Ce, obtenidas por inmersión, resultaron porosas y poco adherentes y la protección ofrecida no representó una mejora frente a la del acero sin tratar. Sin embargo, la optimización del tratamiento para la formación de una película de cerio lo más pareja y compacta posible, resultó determinante para lograr buenos recubrimientos, protectores del acero base, una vez que se aplicaron los post-tratamientos de cinc y resina epoxi.

El recubrimiento doble (Ce-Zn) dio origen a películas más compactas que las de Ce solo, las cuales evidenciaron, mediante todas las técnicas empleadas, mejores propiedades de protección del sustrato metálico. Sin embargo, esta protección disminuyó luego de las 48 horas de inmersión debido al aumento de porosidad y pérdida

de adhesión de la película.

La aplicación de resina epoxi, formando un recubrimiento triple (Ce-Zn-RE), mejoró la resistencia a la corrosión del material, manteniéndose hasta tiempos de inmersión prolongados. Estas muestras presentaron mayor estabilidad que aquellas recubiertas sólo con resina epoxi (RE), debido a la formación de una capa pasiva de óxidos de Ce y Zn sobre la superficie del acero, por debajo de la resina epoxi, que aumentaría el efecto barrera del recubrimiento a largos tiempos de exposición.

Las técnicas empleadas permitieron hacer una evaluación comparativa de la protección brindada para cada uno de los recubrimientos estudiados, teniendo en cuenta la variación de la misma dependiendo del espesor o de los diferentes tiempos de inmersión en la solución de cloruro de sodio. Sin embargo, sería conveniente en próximas investigaciones, caracterizar mejor los sistemas estudiados haciendo ajustes con circuitos equivalentes y evaluando la variación de otros parámetros, como la capacitancia, relacionada con la porosidad del recubrimiento.

Referencias

1. Lay P., Levina A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**; 120 (27), 6704–6714.
2. Pellerin C., Booker S. *Environ. Health Perspect.* **2000**; 108 (9), 403-407.
3. Gibb H.J., Lees P.S., Pinsky P.F., et al. *Am. J. Ind. Med.* **2000**; 38, 115-126.
4. Twite R.L., Bierwagen G.P. *Prog. Org. Coat.* **1998**; 33, 91-100.
5. Gharbi O., Thomas S., Smith C., et al. *npj Mater. Degrad.* **2018**; 2 (12), doi:10.1038/s41529-018-0034-5.
6. Zhang X., Sloof W.G., Hovestad A., et al. *Surf. Coat. Technol.* **2005**; 197, 168-176.
7. Zhang X., Sloof W.G., Hovestad A., et al. *Surf. Coat. Technol.* **2005**; 199, 92-104.
8. Ferreira M.G.S., Duarte M.F., Montemor M.F., et al. *Electrochim. Acta* **2004**; 49, 2927–2935.
9. Pommiers S., Frayret J., Castetbon A., et al. *Corros. Sci.* **2014**; 84, 135–146.
10. Arnott D.R., Hinton B.R.W., Ryan N.E. *Corrosion* **1989**; 45 (1), 12–18.
11. Hinton B.R.W. *J. Alloys Compd.* **1992**; 180, 15-25.
12. Zhu Y., Zhuang J., Yu Y., et al. *J. Rare Earths* **2013**; 31 (7), 734-740.
13. Zhao D., Zhang D., Liu Y., et al. *Rare Metal Mat. Eng.* **2017**; 46(2), 289-295.
14. Aballe A., Bethencourt M., Botana F.J., et al. *Rev. Metal. Madrid* **1997**; 33 (6), 363-369.
15. Aballe A., Bethencourt M., Botana F.J., et al. *Rev. Metal. Madrid* **1998**; 34, 47-51.
16. De Damborenea, J., Conde, A., Arenas, M.A. Rare-earth based corrosion inhibitors. 1st Ed., Editors: Forshitt M., Hinton B., Ch. 3, 84-116, **2014**.
17. Hughes A.E., Harvey T.G., Birbilis N., et al. Rare-earth based corrosion inhibitors. 1st Ed., Editors: Forshitt M., Hinton B., Ch. 7, 186-232, **2014**.
18. Brachetti-Sibaja S.B., Domínguez-Crespo M.A., Torres-Huerta M.A., et al. *J. Mex. Chem. Soc.* **2014**; 58(4), 393-410.
19. Decroly A., Petitjean J.P. *Surf. Coat. Technol.* **2005**; 194, 1-9.
20. Kiyota S., Valdez B., Stoytcheva M., et al. *ECS Transactions* **2009**; 19 (29), 115-123.
21. Valdez B., Kiyota S., Stoytcheva M., et al. *Corros. Sci.* **2014**; 87, 141-149.

22. Uhart A., Ledeuil J.B., Gonbeau D., et al. *Appl. Surf. Sci.* **2016**; 390, 751-759.
23. Chen S., Zhang S., Ren X., et al. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2015**; 10, 9073-9088.
24. Andreeva R., Stoyanova E., Tsanev A., et al. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2018**; 13, 5333-5351.
25. Matter E.A., Kozhukharov S., Machkova M., et al. *Corros. Sci.* **2012**; 62, 22-33.
26. Machkova M., Matter E.A., Kozhukharov S., et al. *Corros. Sci.* **2013**; 69, 396-405.
27. Aramaki K. *Corros. Sci.* **2004**; 46, 1565-1579.
28. El-Taib Heakal F., Shehata O.S., Tantawy N.S. *Corros. Sci.* **2012**; 56, 86-95.
29. Reza Fazal B., Moon S. *J. Kor. Inst. Surf. Eng.* **2016**; 49, 1-13.
30. Montemor M., Simoes A., Ferreira M., et al. *Appl. Surf. Sci.* **2008**; 254, 1806-1814.
31. Loperena A.P., Lehr I.L., Saidman S.B. *J. Magnes. Alloy.* **2016**; 4, 278-285.
32. Lehr I., Saidman S. *J. Magnes. Alloy.* **2018**; 6, 356-365.
33. Lehr I., Saidman S. *Proc. SAM-CONAMET/IBEROMAT/MATERIA 2014*, Santa Fe, Argentina, 21-24 de octubre de 2014.
34. Onofre-Bustamante E., Domínguez-Crespo M.A., Torres-Huerta A.M., et al. *J. Solid State Electrochem.* **2009**; 13, 1785-1799.
35. Wang C., Jiang F., Wang F. *Corros. Sci.* **2004**; 46, 75-89.
36. Kahled K.F. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2013**; 8, 3974-3987.
37. Kahled K.F., Ebenso E. *Res. Chem. Intermed.* **2015**; 41, 49-62.
38. Reza Majidi M., Danaee I., Seyyed Afghahib S.S. *Mater. Res.* **2017**; 20 (2), 1-7.
39. Montemor M., Simoes A., Ferreira M. *Prog. Org. Coat.* **2002**; 44, 111-120.
40. Kobayashi Y., Fujiwara Y. *Electrochim. Acta* **2006**; 51, 4236-4242.
41. Zhang H., Zuo Y. *Appl. Surf. Sci.* **2008**; 254, 4930-4935.
42. Heller D.K., Fahrenholtz W.G. *ECS Transactions* **2009**; 16 (43), 47-60.
43. Ramezanzadeh B., Vakili H., Amini R. *J. Ind. Eng. Chem.* **2015**; 30, 225-233.
44. Vakili H., Ramezanzadeh B., Amini R. *Corros. Sci.* **2015**; 94, 466-475.
45. Mahidashti Z., Ramezanzadeh B. *J. Rare Earths* **2018**; 36, 1112-1120.
46. Ramezanzadeh B., Attar M.M. *Mater. Chem. Phys.* **2011**; 130, 1208-1219.
47. Ramezanzadeh B., Attar M.M. *Prog. Org. Coat.* **2011**; 71 (3), 314-328.
48. Herme C.A., Cicileo G.P., Bercoff P.G., et al. *Procedia Mat. Sci.* **2015**; 9, 150-155.
49. Rezaee N., Attar M.M., Ramezanzadeh B. *Surf. Coat. Technol.* **2013**; 236, 361-367.
50. Majd M.T., Shahrabi T., Ramezanzadeh B. *Appl. Surf. Sci.* **2019**; 464, 516-533.
51. Chhetri S., Samanta P., Chandra Murmu N., et al. *J. Compos. Sci.* **2019**; 3(11), doi:10.3390/jcs3010011.

Optimización Multiobjetivo utilizando GAMS para el estudio de caso del proceso de Absorción de Amoníaco en Aire

Federico Durán Junger¹, Alejandra M. Manzur², María F. Laborde*^{1,3}

¹Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Facultad de Ingeniería, TECSE, Olavarría, Buenos Aires, Argentina.

²Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Facultad de Ingeniería, LABYMA, INTELYMEC, Olavarría, Buenos Aires, Argentina.

³CONICET, CCT-Tandil, Buenos Aires, Argentina.

*María Fernanda Laborde, mfernandalaborde@gmail.com

Recibido: 9 de mayo de 2023

Aceptado: 15 de junio de 2023

Resumen

En este trabajo se realizó la optimización de la eficiencia del proceso de descontaminación de aire con amoníaco a partir de un proceso de absorción líquida con agua en una torre empacada a contracorriente a escala piloto. La optimización se realizó generando la curva de Pareto a partir de la metodología de la restricción- ϵ y utilizando para su generación el software GAMS. Los resultados mostraron la eficiencia de la metodología de optimización multiobjetivo en relación a la metodología más usual, que son seleccionar un caudal de flujo que genere una recta de operación lo más paralela posible a la curva de equilibrio.

Palabras clave: Curva de Pareto; GAMS; Multiobjetivo; Absorción; Amoníaco.

Multi-objective optimization using GAMS for the case study of the Ammonia Absorption in Air process

Abstract

In this work, the optimization of the efficiency of the air decontamination process with ammonia from a liquid absorption process with water in a countercurrent packed tower on a pilot scale was carried out. The optimization was performed by generating the Pareto curve from the ϵ -restriction methodology and using the GAMS software for its generation. The results showed the efficiency of the multi-objective optimization methodology in relation to the usual methodology, which are selecting a flow rate that generates an operating line as parallel as possible to the equilibrium curve.

Keywords: Pareto curve; GAMS; Multi-objective; Absorption, Ammonia.

1. Introducción

En la actualidad, la exigencia de mantener las condiciones ambientales dentro de los límites establecidos por la legislación vigente, reclama asegurar la calidad de los procesos y la optimización en el uso del equipamiento asociado. Existen múltiples procesos en los cuales se generan emisiones de amoníaco siendo los residuos animales, la producción de fertilizantes sintéticos y la quema de biomasa las principales fuentes [1–3]. En el caso del proceso de obtención de fertilizantes es posible que la composición de amoníaco en los gases emitidos durante la puesta en marcha de la producción sea mayor a lo permitido [4]. La selección de la operación de absorción es una alternativa tecnológica para reducir la cantidad de amoníaco emitido a la atmósfera [4]. Santalla [5] estudio la performance de una torre empacada a escala piloto apto para llevar a cabo la descontaminación de aire con amoníaco a través de la absorción del mismo en una corriente de agua, encontrando que el relleno de anillos Pall de polipropileno ofrece una mínima pérdida de carga de los flujos, que no se tiene variación del coeficiente global de transferencia de materia a diferentes alturas del relleno por lo que permite la operación del equipo en un amplio rango de caudales sin correr riesgos de inundación, y que para operaciones continuas disminuye los costos del consumo de energía.

En la última década ha ganado relevancia la optimización multi-objetivo, esta metodología permite integrar objetivos sociales, ambientales y económicos para la toma de decisiones [6-8]. Lugmaña Mendoza [9] en su tesis planteo un modelo matemático de optimización multiobjetivo para la planificación óptima de la expansión del parque generador, aplicando dos funciones objetivo, una asociada con los costos de inversión y producción de las centrales de generación valorados en valor presente; y la otra relacionada con la emisión de gases de CO₂. Aplicando el método de la curva de Pareto determinó satisfactoriamente el óptimo entre estos objetivos contrapuestos. Recientemente, Srivastava y Padhiyar [10] en su trabajo utilizaron la metodología de curva de Pareto para realizar un estudio comparativo de un reactor cromatográfico de flujo inverso (RFCR) y un reactor de lecho fijo (FBR) basando la optimización multiobjetivo en máxima conversión, selectividad y rendimiento, elaboró frentes de Pareto bi-objetivos y tri-objetivos, llegando a la conclusión de la superioridad del RFCR sobre FBR.

Por otra parte, esta metodología es ampliamente utilizada en otras temáticas como optimización de cadenas de valor, localización de plantas, optimización de biorrefinerías seleccionando rutas de procesamientos, etc. [11-13].

Este trabajo propone realizar la optimización del funcionamiento de una torre empacada para realizar la absorción de amoníaco en agua, enfocada en los objetivos de maximizar la eficiencia en términos del número de unidades de transferencia y minimizar el caudal de agua requerido para la absorción.

2. Metodología

Se plantea una optimización multiobjetivo simultánea de dos o más funciones objetivo sobre un conjunto factible de soluciones [7,8], según la siguiente ecuación:

$$\text{Min } F(x) = [F_1(x), F_2(x), \dots, F_k(x)] \text{ sujeto a } x \in X \quad (1)$$

donde k es el número de funciones objetivo, x es el vector de variables de decisión y X el espacio de decisión factible o espacio delimitado por el conjunto de restricciones.

Se estableció para k el valor 2, siendo las funciones objetivo seleccionadas la maximización de la eficiencia de absorción y la minimización del caudal de agua a emplear. Se trabajó sobre datos experimentales obtenidos a partir de la operación de una torre empacada con anillos Pall, en la cual circula a contracorriente el gas contaminado con amoníaco con agua a temperatura ambiente y presión atmosférica. El equipo es un diseño a escala piloto [5]. Dado que los dos objetivos simultáneos son contrapuestos, no hay una solución global única, sino que es necesario determinar un conjunto de puntos que correspondan a las mejores soluciones. Una de las metodologías para llevar adelante una optimización multiobjetivo como el de esta propuesta es la curva de Pareto [8,16]. Esta es una herramienta sistemática para negociar los objetivos, a fin de determinar la solución que mejor satisfaga al tomador de decisiones. Existen múltiples metodologías para encontrar aquellos vectores solución que originen la curva. Para este trabajo se utiliza el método de la restricción- ϵ [17-19], en el que a través de distintas iteraciones se convierte a una de las funciones objetivo en una restricción, cuyo valor está optimizado. Por convención, se optimiza mediante una minimización, por lo que, si hay objetivos a maximizar, se minimizará su valor en negativo [20].

En el proceso de absorción gaseosa se debe tener en cuenta que cuando la recta de operación se aproxima a la curva de equilibrio, disminuyen las fuerzas motrices para la difusión dificultando la absorción del gas en el líquido, lo que requiere mayor altura de contacto (empaquete) para asegurar mayor número de etapas [21]. Si para un determinado caudal de líquido la recta de operación llegase a tocar a la curva de equilibrio, se requerirían infinitas etapas para llevar a cabo la transferencia, dado que la fuerza motriz de la transferencia es nula, por lo tanto, dicho caudal representa el mínimo para la operación. De esta manera, conociendo el valor mínimo se puede determinar el caudal óptimo, teniendo además en cuenta que mayor valor requiere mayor capacidad de bombeo, incrementando el consumo de energía y de la capacidad de los equipos. Usualmente se suele considerar que, si la recta de operación es paralela a la curva de equilibrio, las fuerzas impulsoras serán constantes y por lo tanto se tendría un valor económicamente óptimo, teniendo una compensación entre la eficiencia y los costos operativos.

Para realizar la optimización del proceso se partió de un conjunto de datos experimentales representados por las concentraciones de amoníaco en la corriente gaseosa de entrada (y_1), y de salida (y_2), en la corriente líquida de entrada (x_2) y por el flujo de aire (G_s). Este conjunto corresponde a una corrida experimental cuya eficiencia, en términos de la concentración de amoníaco en la corriente de aire a la salida de la torre, resultó de 41%, donde las variables y_1 , y_2 , x_2 fueron $8,31 \cdot 10^{-3}$, $5,87 \cdot 10^{-3}$ y 0 mol NH_3/mol total respectivamente y G_s $682,14$ mol NH_3/m^2 . Se definió como capacidad máxima de flujo de líquido el mayor caudal de agua (Q) utilizado durante la experiencia en planta piloto ($100 \text{ cm}^3/\text{s}$) siendo esta una cota superior. Debido a que se trabaja en una zona con alta disolución se puede aplicar la ley de Henry y los datos de equilibrio responden a una recta.

Por otro lado, la performance de la operación de absorción se puede estimar a partir del número de unidades de transferencia (N_{tog}), el cual es una medida de la dificultad de la absorción; como se trabajó con soluciones diluidas, se puede aplicar el método Colburn [22]. El procedimiento de cálculo se basó en estimar el mínimo caudal posible que define la cota inferior para el flujo de agua a partir de la pendiente mínima de la recta de operación del sistema, obtenida para las condiciones experimentales descritas y los datos de equilibrio correspondientes al sistema NH_3 -aire-agua [22], obteniendo un

valor de 0,1336 mol disolvente/mol de gas (Pmin), como se observa en la Fig. 1.

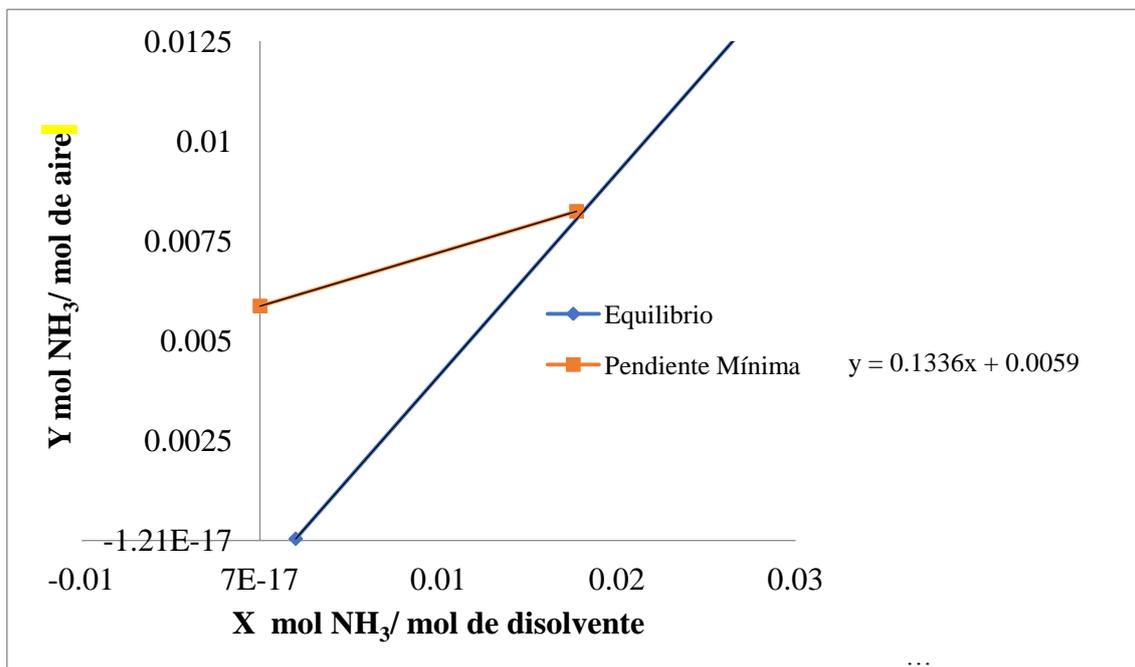


Figura 1. Obtención del mínimo caudal de agua (pendiente mínima)

2.1. Procedimiento en Planta Piloto

El equipo consiste en una torre empacada de tiro forzado, de 360 mm de diámetro interno rellena con anillos Pall de polipropileno, cilíndricos con paredes ranuradas y costillas internas, de diámetro igual a altura, Fig. 2. Sus datos de fabricación son tamaño nominal 1 in, superficie geométrica $65 \text{ ft}^2/\text{ft}^3$, espacio libre 94%, factor de relleno 45 y densidad volumétrica $5,5 \text{ lb}/\text{ft}^3$.



Figura 2: Torre empacada rellena con anillos Pall.

El equipo está provisto de un ventilador centrífugo (caudal 6 m³/min, presión estática 650 mmca, frecuencia 2800 rpm) y para la medición del caudal de gas se dispone de una placa orificio de 0.043 m de diámetro, cuya ecuación de diseño es presentada en la ecuación (2).

$$Q \text{ (m}^3\text{/min)} = 0.265 \sqrt{\Delta H_{\text{placa}} \text{ (mmca)}} \quad (2)$$

La presión estática se mide a través de un manómetro de columna de agua. La entrada del amoníaco (soluto contaminante del aire) se realiza por la parte inferior de la torre y está abastecido desde un tanque auxiliar externo provisto de instrumentos de medición de caudal y presión.

2.2. Optimización Multiobjetivo

2.2.1 Modelo Matemático

Los objetivos establecidos de maximizar la eficiencia en términos del número de unidades de transferencia y minimizar el caudal de agua, que tiene una relación directamente proporcional con el caudal molar de agua (L), se plantearon a través del modelo matemático multiobjetivo representado por las ecuaciones 3 a 8.

$$N_{tOG} = \frac{1}{1 - \frac{1}{A}} \ln \left[\left(1 - \frac{1}{A} \right) \frac{(y_1 - mx_2)}{(y_2 - mx_2)} + \frac{1}{A} \right] \quad (3)$$

$$A = \frac{L}{mG} \quad (4)$$

$$L = 0,06 \frac{Q * \rho_{\text{agua}}}{PM_{\text{agua}} A_T} \quad (5)$$

$$y_2 = y_1 - \frac{L}{G} x_1 \quad (6)$$

$$L \geq P_{\text{min}} * G \quad (7)$$

$$Q \leq Q_{\text{máx}} \quad (8)$$

Donde:

N_{TOG} : número de unidades globales de transferencia de la fase gaseosa

m : constante de Henry.

A : Factor de absorción

Q : Flujo de agua, cm^3/s

L : Caudal molar de agua por unidad de área, $\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ min})$

G : flujo molar de aire por unidad de área, $\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ min})$

ρ_{agua} : $998.2 \text{ kg}/\text{m}^3$

PM_{agua} : $18 \text{ g}/\text{mol}$

A_T , área transversal: $0,102 \text{ m}^2$

y_1 : concentración molar de amoniaco a la entrada (moles de NH_3 /moles aire)

y_2 : concentración molar de amoniaco a la salida (moles de NH_3 /moles aire)

x_1 : concentración molar de amoniaco en agua a la salida (moles de NH_3 /moles agua)

P_{min} : pendiente mínima, Fig. 2.

El modelo incluye las ecuaciones 3 y 4 que se corresponden con los objetivos de optimización donde se observa que el número de unidades de transferencia (N_{tog}) y el flujo molar de líquido (L) son inversamente proporcionales, de manera que la optimización se centrará en buscar el resultado que compense ambos objetivos; la ecuación 5 presenta la relación directa entre L y Q , la ecuación 6 indica la recta de operación obtenida a partir del balance de materia del sistema, la ecuación 7 representa la restricción referida a la pendiente mínima (Fig. 1), y, por último, la ecuación 8 establece la restricción relacionada a la capacidad máxima establecida para el caudal de agua.

2.2.2 Software

Para la resolución del estudio de caso se empleó el software GAMS (General Algebraic Modeling System), el cual es utilizado en la programación y optimización matemática de diversos casos [23-27]. Se empleó el solver CONOPT debido a que es adecuado para modelos y restricciones no lineales, y tiene un método rápido para encontrar una primera solución factible que es particularmente adecuado para modelos

con pocos grados de libertad como en este caso [28]. Se utilizó un equipo con AMD Athlon(tm) II X4 645 Processor.

3. Resultados y Discusión

La curva Pareto Optimal de Nt_{og} vs Q se obtuvo utilizando método de la restricción- ϵ , se programó el modelo matemático en el software GAMS y haciendo uso del comando LOOP se determinan los puntos que se presentan en la Fig. 3.

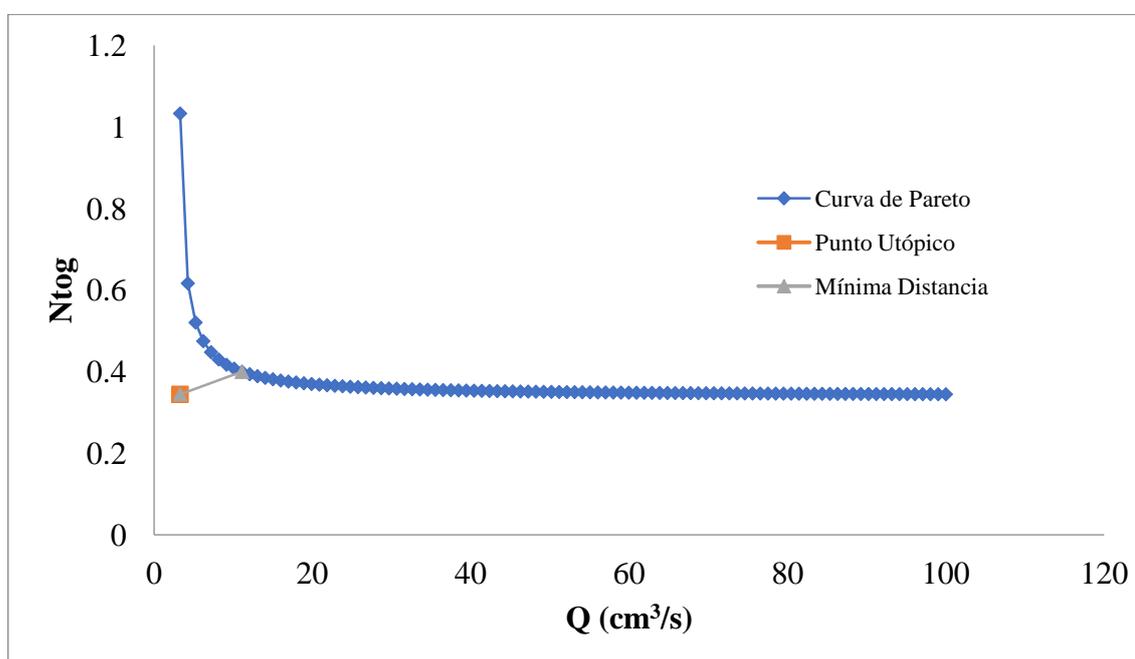


Figura 3. Curva de Pareto Optimal.

Se observa el punto utópico y a partir de este, mediante la distancia mínima a la curva, se localiza el punto óptimo que corresponde a un valor de Nt_{og} de 0,399 y $Q = 11,086 \text{ cm}^3/\text{s}$. Los resultados experimentales obtenidos para un caudal Q de $100 \text{ cm}^3/\text{s}$ resultaron en un valor de Nt_{og} de 0,35, valores que conforman uno de los extremos de la curva de Pareto. Del análisis de la Fig. 3 se observa que, con el aumento del caudal, disminuye significativamente el número de unidades de transferencia hasta un valor de Q de $10 \text{ cm}^3/\text{s}$ para luego permanecer sin cambios, a partir de $15 \text{ cm}^3/\text{s}$. Esta información resulta muy interesante al momento de realizar un diseño de equipo ya que Nt_{og}, número de unidades de transferencia, está relacionado directamente con Z, altura del relleno [22].

El valor de la pendiente de la recta de operación (L/G) obtenido a partir de la optimización multiobjetivo es de 0,53 mol disolvente/mol de gas ($L=387\text{ mol/min m}^2$), este valor comparado con la pendiente de la recta de equilibrio, 0,505 mol disolvente/mol de gas ($L = 344,48\text{ mol/ min m}^2$), difieren en un 3,7%, lo que coincide con la metodología usual de utilizar la recta de operación lo más paralela posible al equilibrio.

4. Conclusiones

La optimización multiobjetivo planteada permitió encontrar un valor para el caudal óptimo de líquido que ofrece la mejor compensación con la eficiencia de la operación. Por otra parte, se concluyó, que la velocidad del flujo de líquido luego de alcanzar los $15\text{ cm}^3/\text{s}$ no genera una disminución significativa del número de etapas, debido a que las fuerzas impulsoras no aumentan luego de haber alcanzado ese caudal.

En este trabajo se puede observar que mediante la optimización multiobjetivo se puede localizar el caudal óptimo. Y se puede mencionar que el método gráfico que corresponde a hacer una recta de operación lo más paralela posible al equilibrio es un método que ofrece resultados muy similares al de la optimización multiobjetivo.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNICEN), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Referencias

1. Behera S.N., Sharma M., Aneja V.P., *et al.* Ammonia in the atmosphere: A review on emission sources, atmospheric chemistry and deposition on terrestrial bodies. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2013; 20 (11): 8092–8131. doi: 10.1007/s11356-013-2051-9.
2. Andersson K., Delin S., Pedersen J., *et al.* Ammonia emissions from untreated, separated and digested cattle slurry – Effects of slurry type and application strategy on a Swedish clay soil. *Biosyst. Eng.* 2023; 226: 194–208. doi: 10.1016/j.biosystemseng.2023.01.012.
3. Castesana P.S., Dawidowski L.E., Finster L., *et al.* Ammonia emissions from the agriculture sector in Argentina; 2000–2012. *Atmos. Environ.* 2018; 178 (February): 293–304. doi: 10.1016/j.atmosenv.2018.02.003.
4. Ruiz Pujalte L.Á. *Diseño de un sistema para la recuperación de vapores amoniacales de una corriente gaseosa procedente de una fábrica de fertilizantes químicos.* Universidad Politécnica de Valencia, 2015.
5. Santalla E.M. *Performance de un Equipo Piloto Para la Purificación de Aire Contaminado Con Amoniac.* IXIII Congreso Chileno de Ingeniería Química, II Congreso Latinoamericano de Ingeniería Química, 1998, pp. 61–62.

6. Aranda Pinilla J.A., Orjuela Castro J.A. Optimización multiobjetivo en la gestión de cadenas de suministro de biocombustibles TT - Una revisión de la literatura Multiobjective optimization in biofuel supply chain management. A review of the literature. *Ingeniería* 2015; 20 (1): 21–47. [Online]. Available: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-750X2015000100004&lang=pt
7. Ewees A.A., Elaziz M.A., Oliva D. A new multi-objective optimization algorithm combined with opposition-based learning. *Expert Syst. Appl.* 2020; 113844. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2020.113844>.
8. El-Halwagi A.M., Rosas C., Ponce-Ortega J.M., *et al.* Multiobjective optimization of biorefineries with economic and safety objectives. *AIChE J.* 2013; 59 (7): 2427–2434. doi: 10.1002/aic.14030.
9. Lugmaña-Mendoza E.L. *Modelo multiobjetivo para la expansión dinámica del sistema de generación.* 2022. [Online]. Available: <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/21695>.
10. Srivastava S., Padhiyar N.U. A comparative study of reverse flow chromatographic reactor and fixed bed reactor: a multi-objective optimization approach. *Chem. Eng. Res. Des.* 2023; 193: 294–305. doi: 10.1016/j.cherd.2023.03.022.
11. Santibañez-Aguilar J.E., Flores-Tlacuahuac A., Betancourt-Galvan F., *et al.* Facilities location for residual biomass production system using geographic information system under uncertainty. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2018; 6 (3): 3331–3348. doi: 10.1021/acssuschemeng.7b03303.
12. Santibañez-Aguilar J.E., González-Campos J.B., Ponce-Ortega J.M., *et al.* Optimal planning of a biomass conversion system considering economic and environmental aspects. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2011; 50 (14): 8558–8570. doi: 10.1021/ie102195g.
13. Haghpanah T., Sobati M.A., Pishvae M.S. Multi-objective superstructure optimization of a microalgae biorefinery considering economic and environmental aspects. *Comput. Chem. Eng.* 2022; 164: 107894. doi: 10.1016/j.compchemeng.2022.107894.
14. Ehrgott M., Wiecek M.M. Multiobjective programming. *Int. Ser. Oper. Res. Manag. Sci.* 2005; 78: 667–722. doi: 10.1007/0-387-23081-5_17.
15. Diwekar U.M. *Introduction to Applied Optimization.* Springer, 2020.
16. Diwekar U. *Introduction to applied optimization.* Segunda. Springer, 2008.
17. Aranda Pinilla J.A., Orjuela Castro J.A. Multiobjective optimization in biofuel supply chain management. A review of the literature. *Ingeniería* 2015; 20 (1): 21–47. [Online]. Available: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-750X2015000100004&lang=pt.
18. He L., Zhang L. A bi-objective optimization of energy consumption and investment cost for public building envelope design based on the ϵ -constraint method. *Energy Build.* 2022; 266: 112133. doi: 10.1016/j.enbuild.2022.112133.
19. Lee Y., Ramaswamy S., Pinto J.M., Papageorgiou L.G. Supply chain planning with vehicle allocation for gas industry. *Comput. Aided Chem. Eng.* 2021; 50: 1803–1808. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-88506-5.50279-5>.
20. Diwekar U. *Introduction to Applied Optimization.* Second Edition, Springer Optimization and Its Applications, 2008.
21. Alibardi L., Astrup T.F., Asunis F., *et al.* Organic waste biorefineries: looking towards implementation. *Waste Manag.* 2020; 114: 274–286. doi: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.07.010>.
22. Treybal R.E. *Operaciones de Transferencia de Masa.* Segunda Ed., 1968.
23. Santos L.F., Costa C.B.B., Caballero J.A., Ravagnani M.A.S.S. Multi-objective simulation–optimization via kriging surrogate models applied to natural gas liquefaction process design. *Energy* 2023; 262 (PB): 125271. doi: 10.1016/j.energy.2022.125271.
24. Lach Ł. Optimization based structural decomposition analysis as a tool for supporting environmental policymaking. *Energy Econ.* 2022; 115 (September): 106332. doi: 10.1016/j.eneco.2022.106332.

25. Giral Ramírez D.A., Montoya Giraldo O.D., Vargas Robayo C.Y., Blanco Valbuena D.F. Evaluación de modelos de programación lineal y no lineal para la planeación de sistemas de transmisión en el software GAMS. *Tecnura* 2021; 25 (69): 16–50. doi: 10.14483/22487638.17957.
26. Campo E.A., Cano J.A., Gómez-Montoya R.A. Optimización de costos de producción agregada en empresas del sector textil. *Ingeniare. Rev. Chil. Ing.* 2020; 28 (3): 461–475. doi: 10.4067/s0718-33052020000300461.
27. Amosa M.K., Majozi T. GAMS supported optimization and predictability study of a multi-objective adsorption process with conflicting regions of optimal operating conditions. *Comput. Chem. Eng.* 2016; 94: 354–361. doi: 10.1016/j.compchemeng.2016.08.014.
28. Bussieck M., Nelißen F. GAMS Development Corporation, General Algebraic Modeling System (GAMS) Release 33.1.0, Fairfax, VA, USA, 2021.

CICLOPÉPTIDOS TÓXICOS DE *AMANITA PHALLOIDES* QUE CRECE EN ARGENTINA: EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AMATOXINAS Y FALOTOXINAS. PRESENCIA DE OTROS COMPUESTOS TÓXICOS

Stella M. Battista^{1,2}, Arturo A. Vitale², Ángel Alonso¹, Alicia B. Pomilio^{2*}

1 División Alergia e Inmunología, Hospital de Clínicas “José de San Martín”, Universidad de Buenos Aires, Av. Córdoba 2351, C1120AAF Buenos Aires, Argentina. aalonsomed@gmail.com.

2 Departamento de Bioquímica Clínica, Área Hematología, Hospital de Clínicas “José de San Martín”, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. aavitale@sinectis.com.ar; avitale@ffyb.uba.ar; abpomilio@sinectis.com.ar; pomilio@ffyb.uba.ar.

* Alicia B. Pomilio abpomilio@sinectis.com.ar; pomilio@ffyb.uba.ar

Recibido: 23 de mayo de 2023

Aceptado: 11 de julio de 2023

Resumen

Amanita phalloides es un hongo superior Basidiomicete, procedente de Europa, que crece en Argentina y provoca un micetismo que es con frecuencia mortal. En esta investigación se aislaron los compuestos tóxicos de los carpóforos, en particular ciclopéptidos como las amatoxinas, las falotoxinas, antamanida y las cicloamanidas A-D, además de un compuesto de bajo peso molecular como el ácido (2S,4S)-4-hidroxi-2-pirrolidincarboxílico, la lectina tóxica falolisina que actúa como hemolisina y la proteína tóxica toxofalina. En el presente trabajo se analizó por primera vez el contenido de los principales ciclopéptidos tóxicos de *A. phalloides*, como son las amatoxinas y las falotoxinas, así como su distribución en diferentes tejidos de los carpóforos de esta especie, obtenidos del Parque Pereyra Iraola, Pilar y Luján, tres zonas de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección UV por arreglo de diodos y espectrometría de masa. Los resultados mostraron la influencia climatológica, edafológica, ecológica y de la flora involucrada en la simbiosis ectomicorrízica sobre la variación de los valores obtenidos y de la preponderancia de determinadas amanitinas.

Palabras Clave: *Amanita phalloides*; amatoxinas; falotoxinas; ácido (2S,4S)-4-hidroxi-2-pirrolidincarboxílico; falolisina; toxofalina; cuantificación; cromatografía líquida de alta resolución; espectrometría de masa.

Toxic Cyclopeptides from *Amanita phalloides* growing in Argentina: Extraction, Identification, and Quantitation of Amatoxins and Phallotoxins. Occurrence of other Toxic Compounds.

Abstract

Amanita phalloides is a higher Basidiomycete fungus, from Europe, that grows in Argentina and

gives rise to a mycetism that is often fatal. In this research, toxic compounds from carpophores were isolated, in particular cyclopeptides such as amatoxins, phallotoxins, antamanide, and cycloamanides A-D, as well as a low molecular weight compound such as (2S,4S)-4-hydroxy-2-pyrrolidine carboxylic acid, the toxic lectin phallolysin that acts as hemolysin, and the toxic protein toxophalin. In the present paper, the content of the main toxic cyclopeptides of *A. phalloides*, such as amatoxins and phallotoxins, was analyzed for the first time, as well as their distribution in different tissues of the carpophores of this species, obtained from the Pereyra Iraola Park, Pilar and Luján, three areas of the Province of Buenos Aires, Argentina, using high-performance liquid chromatography with UV diode array detection and mass spectrometry. The results showed the influence of climatology, edaphology, ecology, and the flora involved in the ectomycorrhizal symbiosis on the variation of the values obtained and the preponderance of some amanitins.

Keywords: *Amanita phalloides*; amatoxins; phallotoxins; (2S,4S)-4-hydroxy-2-pyrrolidinecarboxylic acid; phallolysin; toxophalin; quantitation; high performance liquid chromatography; mass spectrometry.

1. Introducción

Amanita phalloides (Vaill. ex Fr.) Secr. es un hongo superior Basidiomicete considerado el más tóxico del mundo, siendo mortal en la mayoría de los casos. Si bien algunas especies de *Amanita* son comestibles, la intoxicación fatal es casi exclusivamente imputable a miembros del género *Amanita*, section *Phalloideae*, a la que pertenece *Amanita phalloides*, siendo responsables del 90-95% de las intoxicaciones mortales por micetismos en humanos [1-3]. Es por eso que *Amanita phalloides* es llamada vulgarmente “hongo de la muerte” o “sombrero de la muerte” o sea “*death cap*” en inglés, “*Knollenblätterpilz*” en alemán, “*calice de la mort*” en francés y “*angelo della morte*” en italiano.

Amanita phalloides crece en Europa y resulta abundante en Alemania, en los bosques de la Ciudad de Heidelberg (Estado de Baden-Württemberg) y en la Ciudad de Munich (Estado de Baviera), donde varias generaciones de la familia Wieland estudiaron las intoxicaciones provocadas por ingestión de esta especie y otras del género *Amanita* desde el punto de vista médico, químico y bioquímico [2,4,5].

Amanita phalloides presenta un anillo irregular distintivo cerca de la parte superior del estípite y una volva en la base, ambas son características morfológicas de valor diagnóstico [6]. El cuerpo fructífero emana un olor dulzón y no desagradable. Su sabor es agradable según los sobrevivientes de la intoxicación [6]. Además, su apariencia cambia en diferentes épocas del año y en diferentes lugares, dependiendo del clima, el suelo y el momento de la cosecha, lo que hace más difícil para los recolectores la correcta identificación de los hongos.

¿Cómo fue introducida esta especie en Argentina? *Amanita phalloides* forma ectomicorrizas con robles, castaños, hayas, abedules y pinos, entre otros, que originalmente fueron traídos al país por los primeros europeos [7] y así se introdujeron *Amanita phalloides* y otros hongos superiores.

Se han registrado intoxicaciones fatales con *Amanita phalloides* desde hace años en Alemania [8], EE. UU. [9], Canadá [9], México [10-12], Polonia [13], Francia [14], República Checa [15], Portugal [16,17], Chile [18] y Uruguay [19], entre otros países. Recientemente se ha hecho una compilación de las intoxicaciones debidas a carpóforos que contienen amatoxinas [20].

La ingestión de *Amanita phalloides* provoca un micetismo tardío (grupo 1), según la clasificación que hicieramos, ya que es un micetismo con un período de latencia que suele ser de 6 a 24 horas [21,22]. *A. phalloides* es responsable de la mayoría de las muertes causadas por micetismo (>20% en adultos, >50% en niños) [23,24].

Las primeras referencias sobre el hallazgo de ejemplares en nuestro país, datan del año 1941, en la localidad de San Miguel, Provincia de Buenos Aires [25]. Se han publicado intoxicaciones en nuestro país, en Córdoba con tratamiento en el Hospital Italiano de Córdoba [26], en Buenos Aires en el Centro Nacional de Intoxicaciones del Hospital A. Posadas [25], pero se tienen registros en Centros Toxicológicos de hospitales y clínicas de diferentes provincias, incluyendo el Centro Toxicológico de La Plata con el mayor número de intoxicados.

Los compuestos tóxicos de *Amanita phalloides* por vía oral son un grupo de octapéptidos bicíclicos tóxicos conocidos como **amatoxinas (Figura 1)**, en particular **α -amanitina**, contra las cuales no existen, hasta el momento, antídotos eficaces disponibles, si bien recientemente se han sugerido algunos [27,28].

Se conocen tres grupos de ciclopéptidos tóxicos de *Amanita*: **amatoxinas (Figura 1)**, **falotoxinas (Figura 2)** y **virotoxinas (Figura 3)** [1,29,30,31]. Si bien varios autores indican la presencia de virotoxinas en carpóforos de *Amanita phalloides*, en las investigaciones realizadas en nuestros laboratorios sólo hemos encontrado amatoxinas y falotoxinas, en concordancia con otros autores que manifiestan que las virotoxinas se encuentran singularmente en los hongos *Amanita virosa* [32] y recientemente se encontraron en *Amanita subpallidorozea* [33].

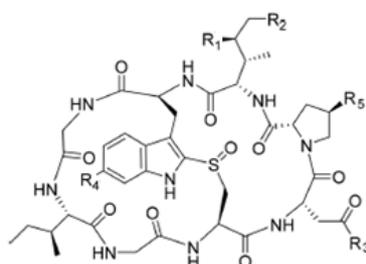
a) Amatoxinas:

El grupo más grande de ciclopéptidos tóxicos es el de las nueve **amatoxinas** (α -, β -, γ - y ϵ -amanitinas, amanulina, ácido amanulínico, amaninamida, amanina y proamanulina) [31,34]

(Figura 1) que son octapéptidos bicíclicos con peso molecular cercano a 900, que se han identificado en 35 especies de hongos de los géneros *Amanita* (*A. phalloides*, *A. bisporigena*, *A. decipiens*, *A. exitialis*, *A. hygroskopica*, *A. ocreata*, *A. suballiacea*, *A. tenuifolia*, *A. verna* y *A. virosa*), *Galerina* (*G. badipes*, *G. beinrothii*, *G. fasciculata*, *G. helvoliceps*, *G. marginata*, *G. sulciceps*, *G. unicolor* y *G. venenata*) y *Lepiota* (*L. brunneoincarnata*, *L. brunneolilacea*, *L. castanea*, *L. clypeolaria*, *L. clypeolarioides*, *L. felina*, *L. fulvella*, *L. fuscovinacea*, *L. griseovirens*, *L. heimii*, *L. helveoloides*, *L. kuehneri*, *L. langei*, *L. lilacea*, *L. locanensis*, *L. ochraceofulva*, *L. pseudohelveola*, *L. pseudolilacea*, *L. rufescens*, *L. subincarnata* y *L. xanthophylla*) [22,35-37] y en una especie del género *Conocybe* (*Conocybe filaris*; sinónimo: *Pholiotina filaris*) [20].

De las nueve amatoxinas, se clasifican α -amanitina, γ -amanitina, amaninamida, amanulina y proamanulina como **amatoxinas neutras**, mientras que β -amanitina, ε -amanitina, amanina y ácido amanulínico son **amatoxinas ácidas** (Figura 1).

Amatoxinas



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
α -Amanitina	OH	OH	NH ₂	OH	OH
β -Amanitina	OH	OH	OH	OH	OH
γ -Amanitina	OH	H	NH ₂	OH	OH
ε -Amanitina	OH	H	OH	OH	OH
Amanulina	H	H	NH ₂	OH	OH
Ácido amanulínico	H	H	OH	OH	OH
Amaninamida	OH	OH	NH ₂	H	OH
Amanina	OH	OH	OH	H	OH
Proamanulina	H	H	NH ₂	OH	H

Figura 1: Estructura química de las amatoxinas.

La secuencia de aminoácidos (estructura primaria) de las amatoxinas es Ile-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys-Asn-Pro (α -amanitina) o Ile-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys-Asp-Pro (β -amanitina), ciclada por enlaces peptídicos de cabeza-cola y con un entrecruzamiento entre Trp y Cys vía la unidad de sulfóxido (S=O) que forma el puente de triptationina. La diversidad estructural entre las amatoxinas surge de las diferencias en hidroxilación de las cadenas laterales, que

incluyen 4-hidroxiprolina (4-hidroxiPro), γ,δ -dihidroxi-isoleucina (γ,δ -dihidroxi-Ile) y 6'-hidroxitriptofano (6'-hidroxi-Trp) (**Figura 1**) [31].

Todas las amatoxinas son oligopéptidos que se sintetizan como proproteínas de 35 aminoácidos, de las cuales una prolil-oligopeptidasa escinde los últimos ocho aminoácidos [38]. La α -amanitina está codificada directamente por el gen *AMA-1*, lo que indica que estos compuestos se sintetizan en los ribosomas y no por péptido-sintetasas no ribosómicas. El gen *AMA-1* está presente en otras especies tóxicas de la sección *Phalloideae* del género *Amanita*, pero está ausente en las especies no tóxicas correspondientes a las otras secciones [38].

La primera amatoxina que se aisló fue α -amanitina por Wieland y Hallermayer en 1941 [39]. Siete de las amatoxinas (α -, β -, γ - y ε -amanitinas, amanulina, ácido amanulínico y proamanulina) contienen una rara subestructura de 6-hidroxiindol (proveniente del 6'-hidroxi-*L*-triptofano unido al ciclo) sustituido en las posiciones 2 y 3 por el ciclo peptídico [30,40], mientras que las restantes contienen el indol sin hidroxilar.

Las amatoxinas son los únicos ciclopéptidos, en comparación con las falotoxinas y virotoxinas, que son tóxicos por vía oral y por lo tanto, responsables de los micetismos [25, 41-44]. Las amatoxinas son absorbidas en el tubo digestivo, son termoestables (no se destruyen por cocción) y no son volátiles (no se destruyen por desecación). Su gran estabilidad térmica, combinada con su solubilidad en agua, las hace excepcionalmente tóxicas [29].

Además, las amatoxinas son resistentes a la degradación enzimática y ácida, por lo que cuando se ingieren no se inactivan en el tracto gastrointestinal [29]. Se demostró que estos compuestos también resisten los procesos de congelación/descongelación, pues se han registrado casos fatales después de consumir carpóforos de *A. phalloides* congelados durante 7-8 meses [45]. Asimismo, las amatoxinas se descomponen muy lentamente cuando se almacenan en soluciones acuosas, abiertas, o tras una prolongada exposición al sol o a la luz de neón [46,47].

Las amanitinas, la amanina y la amaninamida son responsables de estas intoxicaciones mortales en humanos. Son mucho más potentes que las otras toxinas.

De todas ellas, **α -amanitina** y **β -amanitina** se consideran las más potentes, por lo que los principales estudios toxicológicos se centraron en estos ciclopéptidos tóxicos. Por esta razón, no se pueden sacar conclusiones definitivas sobre las posibles diferencias entre las amatoxinas neutras y las ácidas.

El mecanismo de acción de las amatoxinas, en particular las amanitinas, se basa principalmente en que son inhibidores potentes y selectivos de la enzima hepática ARN

polimerasa II, dependiente de ADN extra nucleolar [48], una enzima vital en la síntesis de ARN mensajero (ARNm), microARN y ARN nuclear pequeño (snRNA: del inglés: *small nuclear RNA*). El mecanismo molecular de la inhibición de la ARN polimerasa II ha sido previamente publicado [49].

Es decir que, tras la captación por el octapéptido transportador de aniones orgánicos (OATP: *organic anion-transporting octapeptide*) ubicado en la membrana sinusoidal de los hepatocitos, las amatoxinas bloquean específicamente a la ARN polimerasa II dependiente del ADN eucariótico [48], inhibiendo así la síntesis de ARNm que es la plantilla (*template*) para la síntesis de proteínas, causando el cese de la transcripción y, en consecuencia, provocando una disminución marcada del contenido de proteínas y, en última instancia, la muerte de las células diana, los hepatocitos [3,50]. α -Amanitina es un potente inhibidor de la ARN polimerasa II dependiente del ADN (forma nucleoplásmica) del erizo de mar, del hígado de rata y del timo de ternera, y no ejerce ningún efecto sobre la actividad de otras ARN polimerasas nucleolares o extranucleolares. Por consiguiente, no afectan a la ARN polimerasa I (forma nucleolar) ni de la ARN polimerasa III (también nucleoplásmica) [1,2]. La ARN polimerasa de *Amanita phalloides* es insensible a los efectos de las amatoxinas; por lo tanto, el hongo no se intoxica a sí mismo [51].

Entre otros mecanismos adicionales está la sinergia con mediadores de apoptosis, como el factor de necrosis tumoral y la participación en la oxidación celular. Se han realizado estudios *in vitro* mostrando la actividad de las amatoxinas en la generación de estrés oxidativo celular [52].

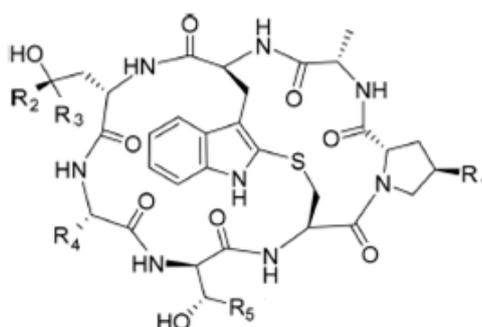
En realidad, las primeras células que se ven afectadas son aquellas con una alta tasa de síntesis de proteínas, como los enterocitos, los hepatocitos y las células renales proximales [30]. Los estudios en ratones muestran que las lesiones renales ocurren en intoxicaciones con niveles bajos de amatoxinas. En los casos de intoxicación con niveles elevados de amatoxinas, el paciente muere por insuficiencia hepática aguda o hipoglucemia antes de que aparezcan las lesiones renales [53,54]. Dadas las controversias existentes entre autores, en nuestros laboratorios se han realizado estudios en animales de experimentación que se presentarán en otra oportunidad. Asimismo, el análisis de pacientes intoxicados que realizara nuestro grupo de investigación, permitió aclarar por primera vez aspectos de la intoxicación desde el momento de la ingestión de los hongos; estos resultados se discutirán en otra publicación.

Las amatoxinas se eliminan principalmente por la bilis, pero existe un ciclo enterohepático, que prolonga la acción hepatotóxica [55].

b) Falotoxinas:

Las **falotoxinas** (faloidina, profaloína, faloína, falisina, falacidina, falacina, falisacina) [31] (**Figura 2**) son heptapéptidos bicíclicos, en los que el anillo principal tiene un puente mediante una unión del azufre de la cisteína con la posición 2' del anillo indólico del triptofano (puente de triptationina). Se aislaron por primera vez de *A. phalloides* [56]. Las secuencias de aminoácidos (estructura primaria) de faloidina y falacidina son Ala-Trp-Leu-Ala-*D*-Thr-Cys-Pro y Ala-Trp-Leu-Val-*D*-Asp-Cys-Pro respectivamente. Hay diversidad estructural entre las falotoxinas debido a diferencias en la hidroxilación de las cadenas laterales.

Falotoxinas



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Faloidina	OH	Me	CH ₂ OH	Me	Me
Profaloína	H	Me	Me	Me	Me
Faloína	OH	Me	Me	Me	Me
Falisina	OH	CH ₂ OH	CH ₂ OH	Me	Me
Falacidina	OH	Me	CH ₂ OH	CHMe ₂	CO ₂ H
Falacina	OH	Me	Me	CHMe ₂	CO ₂ H
Falisacina	OH	CH ₂ OH	CH ₂ OH	CHMe ₂	CO ₂ H

Figura 2: Estructuras químicas de las falotoxinas.

De estas falotoxinas, faloidina, faloína, profaloína y falisina se clasifican como **falotoxinas neutras**, mientras que falacina, falacidina y falisacina son **falotoxinas ácidas**.

El mecanismo de acción de las falotoxinas se ha caracterizado *in vitro* desde hace tiempo [57-60]. Las falotoxinas afectan la permeabilidad de las membranas celulares externas e internas. Tienen una alta afinidad por la actina y su capacidad de perturbar el equilibrio entre las formas F y G es considerada responsable de sus efectos tóxicos [4].

Las falotoxinas actúan fijándose a la actina monomérica globular G impidiendo su polimerización en filamentos de actina F, lo que provoca una desorganización del citoesqueleto que perturba su función correcta y conduce a la muerte celular. Es decir, afectan el equilibrio entre filamentos y monómeros, hacia filamentos. Se unen fuertemente a los filamentos de actina (actina F) y la estabilizan, evitando la despolimerización de los microfilamentos [59]. Los conjugados fluorescentes de las falotoxinas se utilizan como reactivos citológicos para delinear el citoesqueleto de actina.

Por lo que hemos podido observar, la lesión de la membrana celular de los enterocitos explicaría las náuseas, vómitos y diarrea que constituyen los primeros síntomas clínicos de la intoxicación.

Las falotoxinas sólo son tóxicas para los mamíferos si se administran parenteralmente, siendo extremadamente tóxicas cuando se administran por vía intravenosa [29]. No son tóxicas por vía oral ya que no se absorben a través del tracto gastrointestinal y, por lo tanto, no son causa de intoxicación humana por ingestión de estos hongos [4,61,62]. Las falotoxinas presentan hepatotoxicidad *in vivo* por administración intraperitoneal [59].

Las falotoxinas están muy relacionadas con las amatoxinas y también se aislaron de especies del género *Amanita* [16,30,31] y de especies del género *Conocybe* [63]. Faloidina fue el primer péptido tóxico que se aisló de este género en 1937 [4].

La falacidina está codificada directamente por el gen *PHA-I*, lo que indica que estos compuestos se sintetizan en los ribosomas y no por péptido-sintetasas no ribosómicas. La falacidina se sintetiza como una proproteína de 34 aminoácidos que luego será escindida por una prolil-oligopeptidasa para obtener el heptapéptido. El gen *PHA-I* está presente en otras especies tóxicas de la sección *Phalloideae* de *Amanita*, pero está ausente en las especies no tóxicas de otras secciones [38]. Por lo tanto, a diferencia de otros ciclopéptidos fúngicos conocidos, las amatoxinas y las falotoxinas se biosintetizan en los ribosomas y, por lo tanto, se clasifican como péptidos sintetizados por ribosomas y modificados postraduccionalmente (RiPPs: *ribosomally-synthesized and post-translationally-modified peptides*) [38,64].

c) **Virotoxinas:**

Las **virotoxinas** (viroidina, desoxoviroidina, alaviroidina, aladesoxoviroidina, viroisina, desoxoviroisina) (**Figura 3**) son ciclopéptidos tóxicos monocíclicos [31] que, como ya se ha dicho, no hemos encontrado en *Amanita phalloides* en nuestros laboratorios, de acuerdo con autores que expresan que son característicos de *Amanita virosa* [32] y recientemente se encontraron en *Amanita subpallidorozea* [33].

La estructura y la actividad biológica de las virotoxinas son similares a las de las falotoxinas, lo que sugiere que las virotoxinas son derivadas biosintéticamente de las falotoxinas o bien, comparten vías precursoras comunes [65]. Recientemente se ha estudiado la biosíntesis de los ciclopéptidos tóxicos de *Amanita* [66].

A diferencia de las falotoxinas que son bicíclicas, las virotoxinas son heptapéptidos monocíclicos y contienen *D*-serina en lugar de *L*-cisteína. Además, las virotoxinas poseen dos aminoácidos que no se habían encontrado anteriormente en la naturaleza: 2,3-*trans*-3,4-dihidroxi-*L*-prolina y 2'-(metilsulfonil)-*L*-triptofano [67]. Las virotoxinas, como las falotoxinas, sólo son tóxicas por vía endovenosa [30].

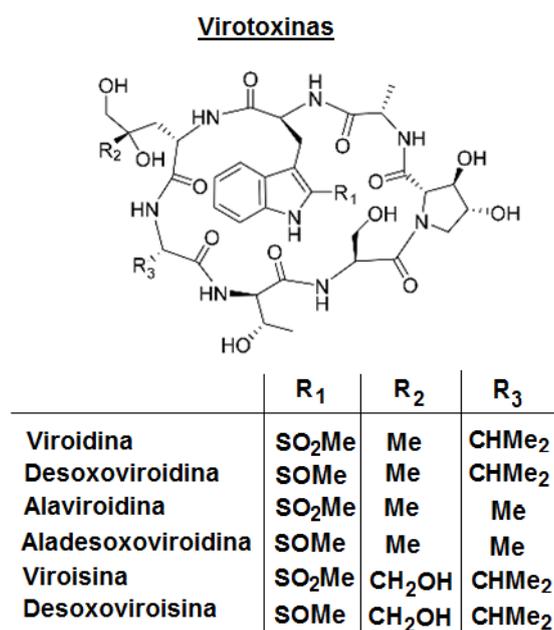


Figura 3: Estructuras químicas de las virotoxinas.

La característica toxicológica principal de las virotoxinas es la necrosis hepática hemorrágica causada por una interacción de las virotoxinas con la superficie externa del hepatocito a través de mecanismos desconocidos [61]. En este punto, el rol de las virotoxinas en la toxicidad humana sigue siendo poco claro, aunque debido a su pobre absorción oral, se da poca importancia clínica a esta clase de toxinas.

Diferente perfil toxicológico de los tres grupos de ciclopéptidos tóxicos

Las amatoxinas son altamente tóxicas (DL₅₀ intraperitoneal (i.p.) = 0,1-0,6 mg/kg en el ratón blanco; excepto amanulina, ácido amanulínico y proamanulina que presentan DL₅₀ > 20 mg/kg), causando la muerte en 2-8 días. Si bien T. Wieland y O. Wieland en 1959 determinaron una DL₅₀ i.p. de 0,1 mg/kg para α -amanitina y DL₅₀ de 0,4 mg/kg para β -amanitina en ratones [68], posteriormente [29] se publicaron otros valores (DL₅₀ de

α -amanitina = 0,3 mg/kg y DL₅₀ de β -amanitina = 0,5 mg/kg en ratones por vía i.p.). La DL₅₀ de α -amanitina para los seres humanos es de 0,1 mg/kg por vía oral. Por lo tanto, teniendo en cuenta que un esporóforo de *Amanita phalloides* (20-25 g) puede contener de 5 a 8 mg de amatoxinas [2], la ingestión de un solo hongo mediano (o medio hongo grande) de *A. phalloides* es teóricamente una dosis letal para un hombre de 75 kg [69].

Las falotoxinas y las virotoxinas son menos tóxicas (DL₅₀ i.p. = 1,5-20 mg/kg, en el ratón blanco) que las amatoxinas, pero actúan rápidamente, causando la muerte en 2-5 horas [31]. Todas las falotoxinas tienen una DL₅₀ i.p. similar (de 1,5 a 4,5 mg/kg), excepto profaloína, que parece ser menos tóxica (> 20 mg/kg). La falotoxina neutra faloina y las falotoxinas ácidas falacina y falacidina presentan DL₅₀ i.p. de 1,5 mg/g en ratones. La DL₅₀ i.p. de las virotoxinas en ratones oscila entre 1,0 y 5,1 mg/kg.

Obtención de otros compuestos tóxicos de *Amanita phalloides*

Amanita phalloides contiene también otro grupo de ciclopéptidos, **antamanida** y **cicloamanidas A-D** (Figura 4), que son monocíclicos y no contienen triptofano. La antamanida es un ciclopéptido que contrarresta a la faloidina, según se determinara hace largo tiempo [29]. La química, bioquímica y aspectos biológicos moleculares de los ciclopéptidos tóxicos en *Amanita* fueron tratados por Wieland [4].

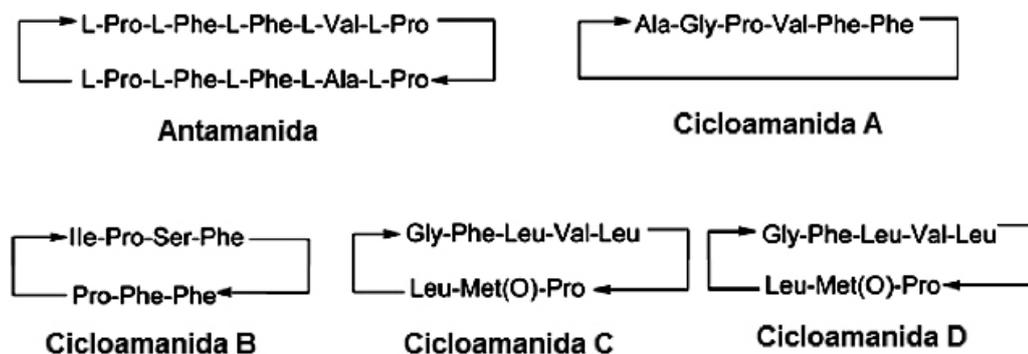


Figura 4: Estructuras químicas de antamanida y cicloamanidas A-D.

También se ha aislado e identificado un compuesto de bajo peso molecular como el **ácido (2S,4S)-4-hidroxi-2-pirrolidincarboxílico** (Figura 5) en carpóforos de *Amanita phalloides*, que es estructuralmente similar al **ácido (2S,3R,4R)-3,4-dihidroxi-2-pirrolidincarboxílico** (Figura 5) aislado e identificado en carpóforos de *Amanita verna* [70].

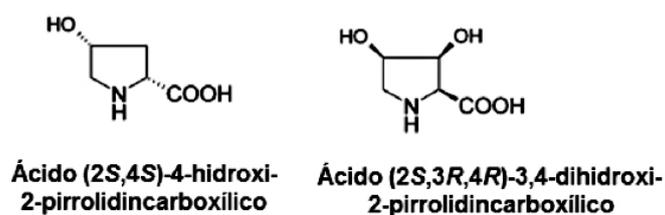


Figura 5: Estructuras químicas de los ácidos hidroxipirrolidincarboxílicos presentes en *Amanita phalloides* y *A. verna* respectivamente.

Asimismo, de extractos acuosos de *Amanita phalloides* se aisló una hemolisina tóxica denominada **falolisina**, que es una mezcla de dos o tres proteínas citolíticas de estructura similar, cada una con un peso molecular de 34 kDa. Ha demostrado actividad hemolítica *in vitro*. Dado que el jugo gástrico del estómago destruye esta toxina, es inocua por vía oral [29].

También se aisló **toxofalina**, que es una proteína tóxica de 55 kDa y un punto isoelectrico (pI) de 5,7 y que se expresa predominantemente en el estípite del carpóforo de *Amanita phalloides*; se caracterizaron sus principales propiedades fisicoquímicas y biológicas que coincidieron con las informadas previamente [71,72].

Como se evaluara mediante experimentos de entrecruzamiento, toxofalina forma un complejo trimérico en solución con buffer. Induce la apoptosis en varias líneas celulares de mamíferos (L1210 y CCL-64 murinas, y A549 humanas) con CI_{50} de 0,25-0,45 $\mu\text{g/ml}$ [71]. Las características fisicoquímicas, químicas y biológicas de toxofalina difieren claramente de las de falolisina. La estructura primaria de toxofalina se estudió previamente en forma parcial mediante la secuenciación directa de sus péptidos trípticos, seguida por la correspondiente clonación basada en PCR (reacción en cadena de la polimerasa; del inglés: *polymerase chain reaction*) del ADNc (ADN complementario) [72]. La toxofalina mostró una homología estructural con la *L*-aminoácido-oxidasa del hongo *Laccaria bicolor*. El ácido ascórbico inhibió el efecto citotóxico de toxofalina, muy probablemente como resultado de la captación de peróxido de hidrógeno, que es el producto de la catálisis de las oxidasas.

La toxofalina induce la fragmentación del ADN y los cambios morfológicos en los núcleos de las células diana (condensación de cromatina y fragmentación de núcleos), que son características de la apoptosis. Recientemente se demostró que las *L*-aminoácido-oxidasas de *Amanita phalloides* y *Clitocybe geotropa* inducen apoptosis dependiente de caspasas [73] en líneas celulares cancerosas Jurkat a través de las vías intrínseca y extrínseca; si bien el aumento significativamente mayor de caspasa 9 sobre la actividad de caspasa 8 sugiere que es la vía intrínseca el modo predominante de la apoptosis inducida por estas oxidasas [73].

Varios basidiomicetos presentan actividad de *L*-aminoácido-oxidasas con amplia especificidad de sustrato y una variedad de masas moleculares aparentes que varían de 25 a 200 kDa, siendo más activas a pH 5,5 que a pH 8,0 [72].

Por lo tanto, además de los **ciclopéptidos altamente tóxicos** y la lectina tóxica **falolisina**, *A. phalloides* contiene **toxofalina** que es una proteína citotóxica con propiedades de la enzima *L*-aminoácido-oxidasa.

En el presente trabajo se analizó el contenido de los principales ciclopéptidos tóxicos de *A. phalloides*, como son las amatoxinas y las falotoxinas, así como su distribución en diferentes tejidos de los carpóforos de esta especie, obtenidos del Parque Pereyra Iraola, Pilar y Luján, mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección por arreglo de diodos (DAD: *diode array detection*) y espectrometría de masa.

2. Materiales y Métodos

Reactivos y Productos químicos: Todos los reactivos, solventes y compuestos químicos se obtuvieron de la mayor pureza disponible, de Merck AG (Darmstadt, Alemania) o de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). En lo posible de representantes en Argentina. El patrón de α -amanitina de alta pureza (>90 % pura) se adquirió de Sigma-Aldrich (Prod. No. A2263, Sigma-Aldrich Co., St Louis, EE. UU.). La β -amanitina de alta pureza se obtuvo de Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, EE. UU.). El acetonitrilo y el metanol (grado HPLC y grado LC-MS) fueron adquiridos de Fisher Chemicals (NJ, EE. UU.). El agua se purificó con un sistema de purificación Milli-Q Plus para obtener agua ultrapura (Millipore, Bedford, Ma., EE. UU.). Se controló la pureza de todos los solventes utilizados [74].

Métodos cromatográficos analíticos y preparativos:

Cromatografía en capa delgada (CCD) o TLC (del inglés: *Thin-layer chromatography*):

Para las cromatografías analíticas en capa delgada se utilizaron cromatoplasmas de silicagel G-60 F₂₅₄ (Merck), de fase reversa RP-18 (Merck) y de alúmina F₂₅₄ de 100 μ m de espesor (Merck). También se usaron cromatoplasmas de alta resolución (HPTLC: *high performance thin-layer chromatography*) de silicagel 60 F₂₅₄ (Merck). En todos los casos se usó la técnica ascendente.

Se usaron reveladores universales como: 1) (**H₂SO₄-CH₃COOH (1:1)**), con calentamiento posterior (105°C, 5 min): Todos los compuestos orgánicos produjeron manchas negras; y 2) **luz ultravioleta de longitud de onda de 254 nm:** Se obtuvieron manchas fluorescentes,

color celeste o amarillo). También **reveladores específicos como:** a) **Reactivo de Ehrlich para índoles:** 4-dimetilaminocinamaldehído en ácido clorhídrico 6 N y etanol. Se roció la placa cromatográfica y a continuación se calentó durante 5 minutos a 105°C.

Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC: *high-performance liquid chromatography*) con detector de masa (CL-EM/EM; del inglés: LC-MS/MS):

Se utilizó el triple cuadrupolo TSQ Quantum Access MAX como detector de masa tándem y la fuente API ThermoScientific™ Ion Max™ con la sonda HESI-II. La alta resolución de la monitorización selectiva de reacciones (H-SRM) con tiempos de adquisición de 2 ms permitió cuantificar una gran cantidad de compuestos en un solo análisis. Se usó el rango de masa de 10 a 3000 m/z . La celda de colisión de contaminación cruzada cero eliminó los falsos positivos. Se logró la cuantificación y confirmación simultánea de las estructuras.

Métodos espectroscópicos

Espectroscopía infrarroja

Los espectros de absorción infrarroja realizados con transformación de Fourier (FT-IR) se obtuvieron en un espectrofotómetro Unicam modelo Mattson Galaxy 3020 (resolución de 2 nm) con programas de análisis de datos Mattson. Las determinaciones se hicieron en pastillas de bromuro de potasio (300 mg). Los valores de número de onda máximo se expresaron en cm^{-1} . Se pesaron masas crecientes de estándares desde 1,0 mg a 20 mg, produciendo pastillas homogéneas del orden de 0,3 a 6%, generando las curvas *versus* la absorbancia; se compararon bandas y se graficaron.

Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de espectros de resonancia magnética nuclear protónica (^1H -RMN) de alta resolución se registraron en un equipo Bruker AC-200 a 200,1 MHz, y en un Bruker AM-500 a 500 MHz, usando dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) como solvente y tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^{13}C (^{13}C -RMN) se efectuaron en los equipos indicados, a 50,3 MHz y 139 MHz respectivamente. Se utilizó el programa WinNMR, de Bruker, de registro y ampliación de zonas de los espectros. Los desplazamientos químicos se expresaron en ppm (δ). Los datos de RMN fueron procesados en una estación de trabajo Bruker.

También se realizaron estudios especiales para los ciclopéptidos y espectros bidimensionales de RMN en un equipo de ^1H -RMN de 600 MHz, con magneto Bruker UltraShield 600 Plus de 14.1 Tesla. Sistema de adquisición y control: Bruker Avance III 600 con preamplificador y unidad neumática para RMN de sólidos. Sondas de observación: En espectros de rutina de muestras líquidas se usó SmartProbe $^1\text{H}/\text{BBO}$ ($^1\text{H}/\text{X}$) 5 mm con

gradiente Z (BBO calibrado para observar ^{13}C y ^{15}N). En espectros de muestras líquidas de macromoléculas como los ciclopéptidos se usó TXI triple resonancia ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) 5 mm con gradiente Z.

ESTUDIO DE AMANITA PHALLOIDES

Muestras para la identificación del material recolectado

Se recolectaron muestras de hongos tóxicos en el otoño, en el Parque Pereyra Iraola, en Pilar y en Luján, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Varios carpóforos con distinto grado de crecimiento fueron cuidadosamente recolectados para ser enviados a micólogos especialistas en taxonomía para su identificación inequívoca. Los carpóforos fueron identificados en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN) de la Universidad de Buenos Aires (UBA) como *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) Secr. Un ejemplar representativo fue depositado en el entonces Departamento de Ciencias Biológicas, FCEN, UBA, bajo el N° BAFC 34.547. Algunos basidiocarpos después de la recolección se incluyeron cuidadosamente dentro de una resina de poliéster Nobile recién preparada para inclusión preacelerada, siendo la polimerización catalizada con metiletilcetona (100:1,5), y estas muestras se mantuvieron en el Instituto PROPLAME de CONICET (FCEN, UBA) (actualmente INMIBO, Instituto de Micología y Botánica, CONICET-UBA).

Determinación de la presencia de amatoxinas (toxicidad oral) por ensayo o test de Wieland-Meixner

Una vez recolectados los carpóforos, se realizó el llamado ensayo o test del periódico de Wieland [75,76], comúnmente llamada prueba de Meixner [77,78] o de Wieland-Meixner, que es un ensayo muy utilizado en el campo por los micólogos para facilitar la identificación de *Amanita phalloides* o de presencia de amatoxinas tóxicas. La reacción se debe, en realidad, a la presencia de un anillo indol sustituido.

Las amanitinas α , β y γ y otras amatoxinas sólo se diferencian en el anillo peptídico, pero siempre contienen un 6-hidroxiindol central, por lo tanto dan reacción positiva, como así también todos los otros géneros que poseen amatoxinas [75,78].

Este test se realiza aplicando una pequeña cantidad de líquido obtenido al exprimir una porción de hongo fresco, o de la muestra que se va a analizar, en un trozo de papel rústico que contenga gran cantidad del biopolímero complejo lignina (como el papel de periódico o el de guías telefónicas), se deja secar la mancha y, luego, se agrega una gota de ácido clorhídrico concentrado que actúa como catalizador ácido. Si se tiene una parte de hongo seco, se debe tratar con etanol al 70% y luego centrifugar brevemente para sedimentar las esporas oscuras; ese líquido se utiliza entonces para realizar el ensayo.

Una reacción entre el grupo indol sustituido (o triptamina sustituida) y la lignina del papel da como resultado la formación de un color azul (ensayo positivo), que aparece 5 a 10 minutos después de agregar el ácido [78,79]. El color azul de la reacción se intensifica después de aproximadamente 1 hora; al cabo de unas 2 horas comienza a desvanecerse y prácticamente desaparece 8 horas después.

Se conocen falsos positivos respecto a la presencia de amatoxinas, ya que los hongos que contienen compuestos indólicos como las triptaminas hidroxiladas, como la psilocina de algunos hongos alucinogénicos (llamados “hongos mágicos”), o la serotonina, también darán una reacción de Wieland-Meixner positiva [80]. El resultado negativo de las falotoxinas implica que el indol no hidroxilado no da la reacción con lignina (test de Wieland-Meixner negativo), como tampoco lo dan amaninamida y amanina que son amatoxinas con un indol no hidroxilado (indol 2,3-disustituído con el ciclo peptídico).

No se ha dilucidado cuál es el compuesto azul que se forma en el caso de las amatoxinas, pero aquí proponemos una reacción con el producto final que da origen a ese color. La reacción se produce entre el aldehído coniferílico (4-hidroxi-3-metoxicinamaldehído) presente en la lignina y el indol hidroxilado de la toxina en el medio ácido concentrado dando el acetal correspondiente coloreado (producto de Meixner) (**Figura 6**). Con otros indoles hidroxilados cambia la posición de unión del aldehído coniferílico al indol, obteniéndose siempre un producto similar, con variabilidad en la sustitución, lo cual provoca cambios en el color y tonalidad del producto.

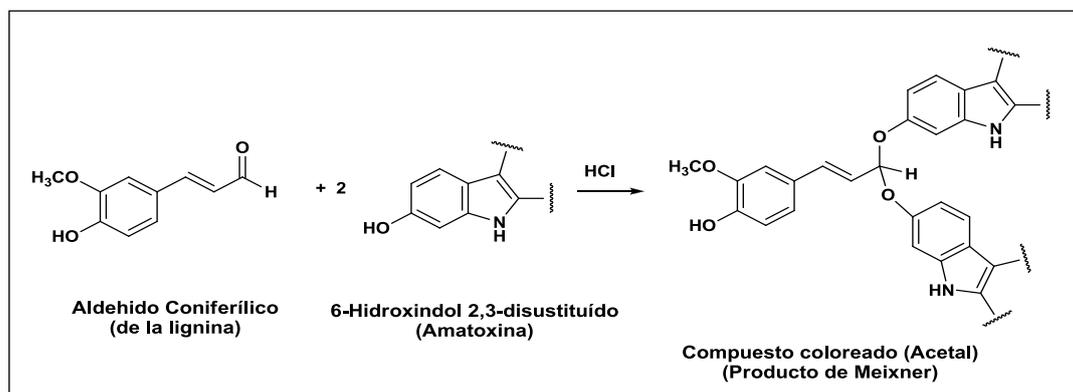


Figura 6: Reacción de Wieland-Meixner propuesta en este trabajo para mostrar la formación del producto coloreado (producto de Meixner), indicando reacción positiva para las amatoxinas que contienen el anillo 6-hidroxiindol 2,3-disustituído con el ciclo peptídico.

Extracción y aislamiento de los ciclopeptidos tóxicos de *Amanita phalloides*

La preparación de las muestras antes del procesamiento de las mismas se realizó separando los restos orgánicos e inorgánicos de cada carpóforo fresco de *Amanita phalloides* debidamente identificados.

Los carpóforos de *Amanita phalloides* recolectados fueron seccionados por medio de cuchillas de acero. Se ensayaron diferentes metodologías de extracción, por ejemplo: a distintas temperaturas. Cada muestra constaba de 10 g de hongo fresco por cada 100 ml de metanol. Una de las muestras fue extraída en metanol a temperatura ambiente con un tiempo de contacto de una semana aproximadamente. La otra, se la procesó con metanol a reflujo durante 1 hora. La extracción a reflujo resultó más efectiva.

El extracto metanólico, con los ciclopéptidos solubilizados, fue filtrado al vacío con papel Whatman 1 en embudo de vidrio fritado. La torta obtenida se siguió extrayendo en caliente una vez más con igual procedimiento. Para cada muestra los filtrados obtenidos fueron mezclados y llevados a sequedad a presión reducida a 40°C de temperatura. El residuo fue tratado con cloruro de metileno o con éter de petróleo fracción 60-80° varias veces para la extracción y lavado de los compuestos lipídicos. El remanente se suspendió en metanol, se filtró, se evaporó al vacío; se repitió el procedimiento y se llevó a concentración de 1g de peso seco por mililitro de solución.

El residuo final en el procesamiento a escala preparativa fue disuelto en agua y se pasó por una columna de la resina macrorreticular no iónica XAD-4 (Amberlite XAD-4; Sigma-Aldrich) de 20-60 mesh y 100 Å de tamaño medio de poro, que es un adsorbente polimérico (copolímero de estireno-divinilbenceno) para la eliminación de sales en los extractos eluidos, quedando retenidos los ciclopéptidos. Esta resina adsorbió y liberó las sales (especies iónicas) a través de interacciones hidrofóbicas y polares. Generalmente se utiliza en condiciones isocráticas. Amberlite XAD-4 se debe almacenar en un recipiente bien cerrado en un lugar fresco, seco y bien ventilado; lejos de agentes oxidantes.

La columna se eluyó con agua-etanol (1:1, en volumen), la purificación de los ciclopéptidos eluidos se realizó a pH 3 en una columna de resina Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich) seguida de otro desalado con XAD-4 y luego la elución continuó en Sephadex LH-20 a pH neutro. Sephadex LH-20 es un dextrano entrecruzado hidroxipropilado que tiene una potente selectividad cromatográfica debido a la naturaleza dual, hidrofílica y lipofílica, de la matriz. El rango de pH operativo es de 2 a 13. Se utilizó primero agua como fase móvil para eluir los azúcares libres y compuestos muy hidrofílicos, luego etanol con porcentaje creciente de 20 a 90% y por último acetona. Los ciclopéptidos se obtuvieron en las fracciones eluidas con las distintas concentraciones de etanol.

Cada fracción cromatográfica fue monitoreada mediante cromatografía en capa delgada común y de alta resolución. El control de pureza se efectuó por cromatografía líquida de alta resolución y electroforesis capilar de alta resolución. La visualización de las manchas en los

cromatogramas en capa delgada se efectuó mediante reactivos de iodo, reactivo de Dragendorff y ninhidrina, los cuales son adecuados para detectar ciclopéptidos, péptidos lineales y aminoácidos.

Para la identificación de cada ciclopéptido se aplicaron técnicas espectroscópicas como resonancia magnética nuclear protónica ($^1\text{H-RMN}$) y espectrometría de masa.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC: *high-performance liquid chromatography*) y Cromatografía líquida-espectrometría de masa (CL-EM)

Los extractos de *Amanita phalloides* se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en columnas C_{18} de fase reversa ($150 \times 4,6$ mm; partículas de $5 \mu\text{m}$), utilizando una fase móvil de acetato de amonio $0,05$ M (50 mM)/acetonitrilo (9:1, v/v), pH: 5,5, con una velocidad de flujo de 1 ml/min, en un equipo de HPLC Agilent serie 1200 equipado con un detector de longitud de onda variable.

También se utilizó una fase móvil con un programa de gradientes de eluyente para realizar cromatografía líquida-espectrometría de masa (CL-EM), mediante combinación de la fase móvil **A** con la fase móvil **B**. Fase móvil **A**: acetato de amonio $0,02$ M (20 mM), pH 5; fase móvil **B**: acetonitrilo (grado HPLC). El programa usado consistió en aumentar gradualmente el porcentaje de **B** desde 10% hasta 100% , a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Detalles del programa: 10% **B** durante 4 min, luego 18% **B** durante 6 min, luego un gradiente lineal de 18% **B** a 100% **B** durante 20 min, a una velocidad de flujo de 1 ml/min. En cada corrida, se inyectó el equivalente a $0,6$ mg de tejido en un volumen de $30 \mu\text{l}$. El eluido se controló a 250 , 295 y 305 nm. La detección por espectrometría de masa del eluido se realizó con un espectrómetro de masa de cuadrupolo simple Agilent 6120 en modo de polaridad positiva con un rango de exploración de 700 - 1000 m/z. Los iones se generaron mediante electrospray con un ajuste de voltaje capilar de 5 kV y una temperatura del gas de secado (nitrógeno) de 350°C .

Para analizar cada parte del carpóforo (sombbrero o píleo, estípite o tallo, anillo, volva y bulbo) de *Amanita phalloides*, el tejido a analizar fue homogeneizado en una mezcla de metanol/agua/ácido clorhídrico diluido, $0,01$ M, (5:4:1, en volumen). En condiciones isocráticas, se usó una columna de fase reversa C_{18} y como fase móvil: acetato de amonio $0,05$ M/acetonitrilo (90:10, v/v), pH: 5,5, con una velocidad de flujo de 1 ml/min.

3. Resultados y Discusión

Análisis de los ciclopéptidos de *Amanita phalloides*

Los datos de cuantificación de las toxinas de *Amanita phalloides* de diferentes regiones del mundo son importantes para obtener la mayor información posible sobre su relativa

morbilidad y potencial letalidad. Hasta el momento, no se había realizado estudio alguno sobre el contenido de toxinas de *A. phalloides* de Argentina, por lo tanto lo abordamos en esta investigación.

Se estudiaron carpóforos de *A. phalloides* recolectados en el Parque Pereyra Iraola y en otras zonas de la Provincia de Buenos Aires como Pilar y Luján. Las principales toxinas de *A. phalloides* (amatoxinas y falotoxinas) fueron analizadas y separadas en este trabajo mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC: *reversed-phase high-performance liquid chromatography*) con detección ultravioleta (UV) de onda fija y de onda variable, incluido arreglo de diodos, y con detección de masa (espectrómetro de masa como detector). Sus estructuras químicas fueron confirmadas por espectrometría de masa. Se cuantificaron estas toxinas en diferentes partes del carpóforo (sombbrero o píleo, estípite o tallo, anillo, volva y bulbo).

Los cromatogramas se obtuvieron con columnas C₁₈ de fase reversa (150 × 4,6 mm; partículas de 5 µm), utilizando una fase móvil de acetato de amonio 0,05 M (50 mM)/acetonitrilo (9:1, v/v), pH: 5,5, con una velocidad de flujo de 1 ml/min. También se utilizó una fase móvil con un programa de gradientes de eluyente para realizar cromatografía líquida-espectrometría de masa (CL-EM), mediante combinación de la fase móvil **A** con la fase móvil **B**. Fase móvil **A**: acetato de amonio 0,02 M (20mM), pH 5; fase móvil **B**: acetonitrilo (grado HPLC). El programa usado consistió en aumentar gradualmente el porcentaje de **B** desde 10 % hasta 100%, a una velocidad de flujo de 1 ml/min. En cada corrida, se inyectó el equivalente a 0,6 mg de tejido en un volumen de 30 µl. El eluido se controló a 250, 295 y 305 nm. La detección por espectrometría de masa se realizó en modo de polaridad positiva con un rango de exploración de 700-1000 *m/z*. Los iones se generaron mediante electrospray con un ajuste de voltaje capilar de 5 kV y una temperatura del gas de secado (nitrógeno) de 350°C.

La longitud de onda utilizada en la detección UV permitió ver preferentemente a las amanitinas frente a las falotoxinas, ya que a 303 nm se visualizaron los picos cromatográficos de α-, β- y γ-amanitinas, así como también δ- y ε-amanitinas con menor intensidad, parcialmente superpuestas con las mencionadas previamente, mientras que a 290-295 nm se detectaron adecuadamente las falotoxinas: falacidina, falisina, faloidina y faloína. A modo de ejemplo se muestran en la **Figura 7** cromatogramas con detección UV a onda fija, a las longitudes de onda mencionadas.

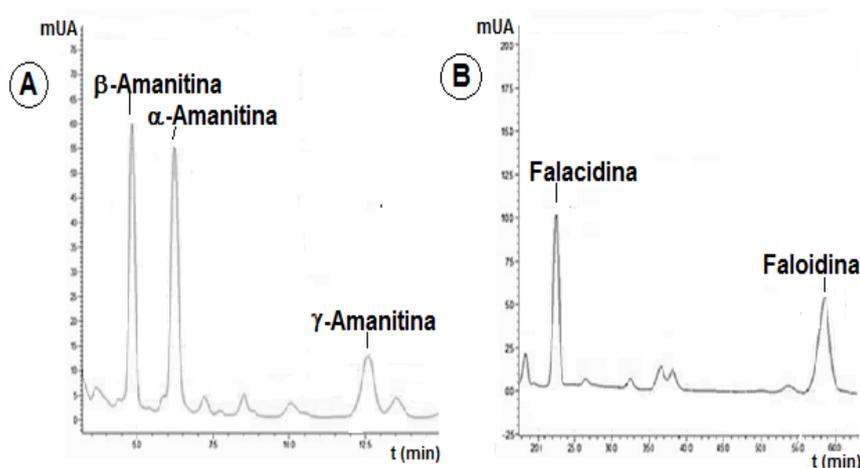


Figura 7: Cromatogramas de amanitinas y falotoxinas obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC: *high-performance liquid chromatography*) con detección UV de extractos de *Amanita phalloides*. (A): Cromatograma que muestra α -, β - y γ -amanitinas a una longitud de onda UV de 303 nm. (B): Cromatograma que muestra las falotoxinas a una longitud de onda UV de 292 nm. *Abreviaturas:* mUA: miliunidades de absorbancia; min: minutos. Tiempos de retención (t_R): β -amanitina: 4,82 min; α -amanitina: 6,22 min; γ -amanitina: 12,52 min. Falacidina: 22,46 min; faloidina: 50,54 min.

Por lo tanto, para detectar adecuadamente, tanto las amatoxinas como las falotoxinas presentes en cada extracto bajo estudio, fue necesario utilizar un detector UV de onda variable o con mejor precisión un detector UV de arreglo de diodos (DAD: *diode array detector*). Para obtener más datos de cada pico se acopló a un detector de masa obteniendo entonces el ión molecular (M) de cada pico y los espectros de masa correspondientes (**Tabla 1**).

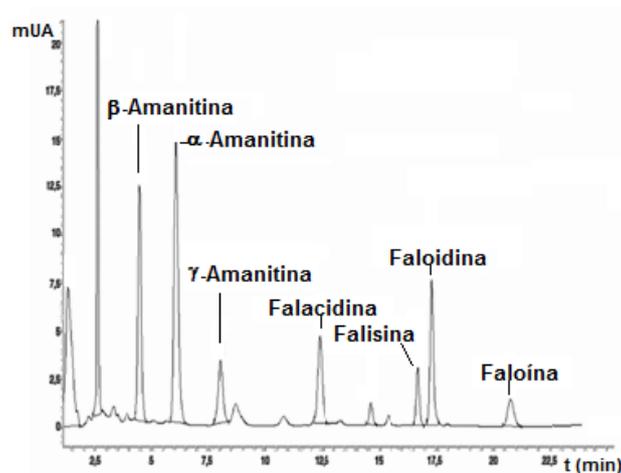


Figura 8: Cromatograma de los ciclopéptidos de píleos o sombreros de carpóforos de *Amanita phalloides* con detector UV y de masa. Tiempos de retención (t_R): β -Amanitina: 4,46 min; α -amanitina: 6,03 min; γ -amanitina: 8,01 min; falacidina: 12,35 min; falisina: 16,68 min; faloidina: 17,27 min; faloína: 20,73 min.

Se cuantificó el contenido de α -amanitina en tejidos del sombrero o píleo, estípite y volva mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. Los límites de detección UV fueron de 55 $\mu\text{g/ml}$ para α -amanitina y 64 $\mu\text{g/ml}$ para β -amanitina, lo cual es importante para la salud alimentaria [81]. El límite de detección en CL-EM para cada toxina fue de aproximadamente 10 ng/ml de medio de extracción. Los resultados muestran que los sombreros tienen el mayor contenido de amatoxinas (**Figura 8**), mientras que la volva fue más rica en falotoxinas (**Figura 9**). Además, se observó la variabilidad en la composición de las toxinas de diferentes sitios geográficos y por diferencias en tipo de suelo, clima, época de recolección, momento de la estación otoñal, humedad ambiente y grado de madurez del carpóforo.

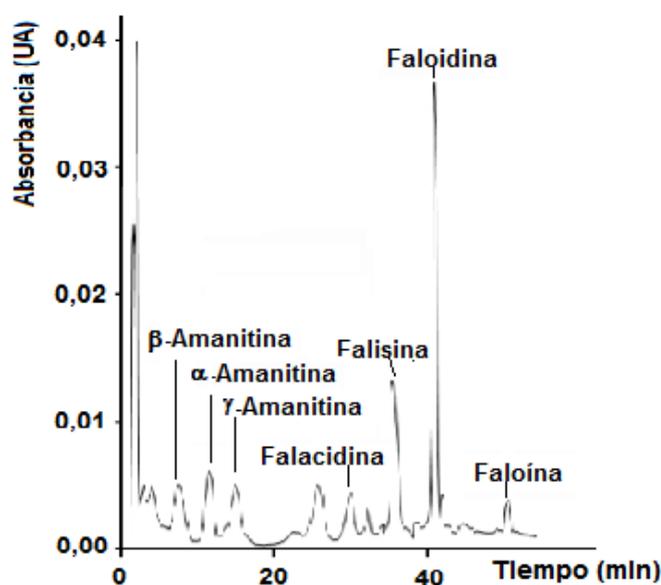


Figura 9: Cromatograma en fase reversa de los ciclopéptidos de la volva de carpóforos de *Amanita phalloides* con detección UV. Abreviaturas: UA: unidades de absorbancia; min: minutos.

Tabla 1: Detección por espectrometría de masa de los ciclopéptidos del extracto de carpóforos de *Amanita phalloides*. Abreviaturas: M: ión molecular.

Ciclopéptido	Fórmula elemental	Ión molecular (Daltons)	Valor experimental
α -Amanitina	$\text{C}_{39}\text{H}_{54}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{S}$	918,3	919,3 $[\text{M}+\text{H}^+]$
β -Amanitina	$\text{C}_{39}\text{H}_{53}\text{N}_9\text{O}_{15}\text{S}$	919,3	920,3 $[\text{M}+\text{H}^+]$
γ -Amanitina	$\text{C}_{39}\text{H}_{54}\text{N}_{10}\text{O}_{13}\text{S}$	902,4	903,4 $[\text{M}+\text{H}^+]$
Faloidina	$\text{C}_{35}\text{H}_{48}\text{N}_8\text{O}_{11}\text{S}$	788,3	789,3 $[\text{M}+\text{H}^+]$
Faloína	$\text{C}_{35}\text{H}_{48}\text{N}_8\text{O}_{10}\text{S}$	772,3	773,3 $[\text{M}+\text{H}^+]$
Falisina	$\text{C}_{35}\text{H}_{48}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{S}$	804,3	805,4 $[\text{M}+\text{H}^+]$
Falacidina	$\text{C}_{37}\text{H}_{50}\text{N}_8\text{O}_{13}\text{S}$	846,3	847,3 $[\text{M}+\text{H}^+]$

Composición de los ciclopéptidos tóxicos en *Amanita phalloides* obtenida en esta investigación

Dado que la ingestión de los carpóforos de *Amanita phalloides* es responsable de varias intoxicaciones fatales accidentales o bien, premeditadas, es relevante tener datos sobre su composición total de compuestos tóxicos, su distribución en los tejidos del carpóforo del hongo y también su preponderancia geográfica.

Hasta el momento no se disponía de trabajos científicos sobre la composición de los ciclopéptidos tóxicos de *A. phalloides* que crece en Argentina, por eso se encaró el tema en este trabajo.

Se han registrado varias intoxicaciones en diferentes áreas del país. Esta especie existe en todo el territorio argentino pero con mayor incidencia en la zona central del país, en Buenos Aires y gran Buenos Aires. Nuevos casos de intoxicación por *A. phalloides* han sido registrados cada año, el más reciente en 2021, referido a un turista que murió en la Provincia de Córdoba. Sin embargo, es difícil estimar el número exacto de intoxicaciones por este micetismo que ocurre cada año debido a la falta de difusión pública de los registros hospitalarios sobre el tema.

Se eligió la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) debido a que varios hospitales y clínicas cuentan actualmente con un cromatógrafo para realizar estos ensayos. Además, el procedimiento en fase reversa ha sido el más utilizado en la literatura [36,40,82-87], lo cual permite realizar comparaciones.

Se analizaron 37 muestras de *A. phalloides* provenientes de la Provincia de Buenos Aires (Parque Pereyra Iraola, Pilar y Luján). Los resultados de la cuantificación fueron:

Total de amatoxinas: $2,10 \pm 0,02$ a $5,70 \pm 0,02$ mg/g de peso seco.

Total de falotoxinas: $0,50 \pm 0,01$ a $2,30 \pm 0,01$ mg/g de peso seco.

En realidad los valores numéricos no son relevantes, pues se observa una constante variación significativa en el contenido de toxinas, no sólo debida a los diferentes sitios geográficos, sino también, como es sabido, por la influencia de las condiciones climáticas, la topografía y las características del suelo [84,85]. Asimismo, en una misma zona, fijados esos parámetros, se observa una distribución desigual de los ciclopéptidos tóxicos dentro de los tejidos de los carpóforos de *Amanita phalloides*. Interesan los valores relativos y las tendencias.

En cuanto al estado de maduración, hemos podido comprobar que el contenido de amatoxinas es relativamente alto durante las primeras etapas de desarrollo (botón, botón con el velo exterior roto y píleo revelado desde el velo exterior) y disminuye en etapas de madurez (cuerpo fructífero completamente desarrollado con sombrero convexo) y de vejez

(cuerpo fructífero marchitado con sombrero doblado) [17,86]. Algo similar se ha descrito para otra especie, *Amanita exitialis* [86]. Si bien se sabe que el carpóforo joven totalmente desarrollado contiene concentraciones más bajas de toxinas totales (amatoxinas y falotoxinas) con respecto al carpóforo maduro [31].

De acuerdo con los resultados obtenidos, se han observado diferencias significativas en las cantidades de toxinas en diferentes tejidos del carpóforo (sombrero o píleo, laminillas, esporas, anillo, estípite o tallo, volva y bulbo) [84]. La menor cantidad de toxinas se detectó en las esporas (sólo un 3% de la concentración de toxina del carpóforo [88]), seguidas por la volva y el estípite, en forma creciente entre todas las partes del carpóforo. La cantidad máxima de toxinas se midió en las laminillas, seguidas por el píleo, en forma decreciente.

Se utilizaron las técnicas multivariadas de análisis de datos para obtener más información sobre las variables que más influyen en las similitudes y/o diferencias de cada muestra.

Respecto a α -amanitina, la cantidad más alta se encontró en el sombrero y el estípite, mientras que la más baja correspondió a la volva de *A. phalloides*. El contenido de α -amanitina del sombrero fue el doble que en el estípite y cuatro veces mayor que en la volva.

Los resultados muestran que el sombrero o píleo, las laminillas, el anillo y el estípite tienen el mayor contenido de amatoxinas, mientras que la volva y el bulbo son los más ricos en falotoxinas, en concordancia con resultados previos [17,83,85], si bien las cantidades variaron. Esta aparente discrepancia puede explicarse por factores ambientales y diferencias genéticas.

En cuanto a las condiciones ambientales del área de recolección (temperatura, microclima, suelo y valores de pH) parecen jugar un rol determinante en el perfil de amatoxinas y de falotoxinas. La geografía local influye significativamente en la composición de las toxinas de los tejidos del cuerpo fructífero, en concordancia con resultados previos [84]. Las condiciones geográficas, topográficas, climáticas, y las diferencias de pH del suelo entre las áreas analizadas parecen tener un impacto en el perfil de las toxinas. Según nuestros resultados, las condiciones ambientales del sitio de recolección tienen mayor influencia en la composición de las falotoxinas que en la de amatoxinas. Las mayores variaciones en la concentración de las toxinas correspondieron a faloidina y falisina en los estípites de Pereyra Iraola y Luján. La concentración más alta de faloidina se encontró en el estípite de Pereyra Iraola. Por otro lado, la concentración más alta de falisina se encontró en el estípite de Luján.

En gran parte de los carpóforos que recolectamos en Parque Pereyra Iraola, presentaron mayor concentración de *beta*-amanitina, respecto a la proporción de las otras muestras recolectadas en Argentina.

Amanita phalloides pertenece a una categoría de hongos superiores llamados simbióticos ectomicorrízicos. Es decir que estos hongos suelen tener una íntima relación (simbiótica) con las plantas que los hospedan. En este contexto, un hongo ectomicorrízico obtiene el suministro de carbono y otras sustancias orgánicas esenciales del árbol y, a cambio, la planta se beneficia por recibir recursos de agua y nutrientes para crecer. Por lo tanto, los lazos estrechos entre los hongos ectomicorrízicos y sus huéspedes vegetales nos llevarían a esperar mayor influencia del huésped en la composición química de las especies de hongos ectomicorrízicos. Los especímenes de *A. phalloides* de Luján estaban en una asociación simbiótica con árboles de castaño y los ejemplares de Pereyra Iraola estaban en asociación simbiótica con el roble, lo cual también contribuyó a las diferencias encontradas en el contenido de las toxinas. Por lo tanto, el árbol huésped y la flora circundante que participan en la relación simbiótica tienen una influencia relevante en la composición química de los hongos, que hemos podido demostrar.

Conclusiones

Las condiciones geográficas, topográficas, climáticas y de pH del suelo mostraron, en nuestros análisis, que tienen un importante impacto en el perfil de las toxinas, con mayor influencia en la concentración detectada de falotoxinas.

Se determinaron mayores variaciones en la concentración de faloidina y falisina en los estípites de las muestras de Luján y de Pereyra Iraola. La concentración más alta de faloidina se encontró en los estípites de Pereyra Iraola y la concentración más alta de falisina en los estípites de las muestras de Luján.

En cuanto a las amanitinas de los carpóforos recolectados en muestras de Argentina, se detectó mayor concentración de β -amanitina en las de Parque Pereyra Iraola.

En este trabajo demostramos que es importante la influencia de la simbiosis con el árbol huésped puesto que los ejemplares de Pereyra Iraola son robles, mientras que en Luján son castaños. Además, se pudo demostrar que la flora circundante participa en la relación simbiótica e influye en la composición química de los hongos estudiados.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de Buenos Aires y al Hospital de Clínicas por la infraestructura y facilidades concedidas. ABP es Investigadora Superior del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET).

Referencias

1. Wieland T., Faulstich H. Fifty years of amanitin. *Experientia* 1991; 47: 1186-1193.

2. Faulstich H., Wieland T. New aspects of amanitin and phalloidin poisoning. En: *Natural Toxins II*. Singh B.R., Tu A.T. (eds.), Plenum: New York, chapter 24, 1996.
3. Karlson-Stiber C., Persson H. Cytotoxic fungi -- an overview. *Toxicon* 2003; 42: 339-349.
4. Wieland T. *Peptides of poisonous Amanita mushrooms*. New York: Springer, 1986.
5. Wieland T. 50 Jahre Phalloidin: seine Entdeckung, Charakterisierung sowie gegenwärtige und zukünftige Anwendung in der Zellforschung. [50 years of phalloidine: its discovery, characterization and current and future applications in cell research]. *Naturwissenschaften* 1987; 74: 367-373. Artículo en alemán.
6. Bonnet M.S., Basson P.W. The toxicology of *Amanita phalloides*. *Homeopathy* 2002; 91: 249-254.
7. Hunziker A.T. *Amanita phalloides* en las Sierras de Córdoba. *Kurtziana* 1983; 6: 157-160.
8. Bresinsky A., Besl H. *Giftpilze. Ein Handbuch für Apotheker, Ärzte und Biologen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Alemania, 1985.
9. Lampe K.F., McCann M.A. Differential diagnosis of poisoning by North American mushrooms, with particular emphasis on *Amanita phalloides*-like intoxication. *Ann. Emerg. Med.* 1987; 16: 956-962.
10. Pérez Silva E., Herrera Suárez T. Nuevo registros para México de especie del género *Amanita*. *Bol. Soc. Mex. Micol.* 1982; (17): 120-129.
11. Villegas M., Cifuentes J., Aroche R.M., et al. Primer registro de *Amanita phalloides* en México. *Bol. Soc. Mex. Micol.* 1982; (17): 140-146.
12. Aroche R.M., Fuentes P. Presencia de ciclopéptidos tóxicos en algunas especies de la sección Phalloidae del género *Amanita* en México. *Bol. Soc. Mex. Micol.* 1982; (17): 187-195.
13. Lapiński T.W., Prokopowicz D. Cechy epidemiologiczno-kliniczne zatruc grzybami w regionie północno-wschodnim Polski [Epidemiological factors of mushroom poisoning in the north-east of Poland]. *Przegląd Epidemiologiczny Epidemiol. Rev.* 1998; 52: 463-467. Artículo en polaco.
14. Garrouste C., Hémerly M., Boudat A.M., et al. *Amanita phalloides* poisoning-induced end-stage renal failure. *Clin. Nephrol.* 2009; 71: 571-574.
15. Krenová M., Pelclová D., Navrátil T. Survey of *Amanita phalloides* poisoning: clinical findings and follow-up evaluation. *Hum. Exp. Toxicol.* 2007; 26: 955-961.
16. Garcia J., Costa V.M., Baptista P., et al. Quantification of α -amanitin in biological samples by HPLC using simultaneous UV-diode array and electrochemical detection. *J. Chromatogr. B* 2015b; 997: 85-95.
17. Garcia J., Costa V.M., Carvalho A.T., et al. A breakthrough on *Amanita phalloides* poisoning: an effective antidotal effect by polymyxin B. *Arch. Toxicol.* 2015c; 89: 2305-2323.
18. Valenzuela E., Moreno G., Jeria M. *Amanita phalloides* en bosques de *Pinus radiata* de la IX Región de Chile: taxonomía, toxinas, métodos de detección, intoxicación faloidiana. *Bol. Micol.* 1992; 7: 17-21.
19. Heuhs L., Fogel E., Scaiola G. Intoxicación por hongos *Amanita phalloides*. *Rev. Méd. Urug.* 1994; 10: 138-141.
20. Diaz J.H. Amatoxin-containing mushroom poisonings: species, toxidromes, treatments, and outcomes. *Wilderness Environ. Med.* 2018; 29: 111-118.
21. Trakulsrichai S., Sriapha C., Tongpoo A., et al. Clinical characteristics and outcome of toxicity from *Amanita* mushroom poisoning. *Int. J. Gen. Med.* 2017; 10: 395-400.
22. Pomilio A.B., Battista S.M., Alonso A. Micetismos. Parte 1: Síndromes con período de latencia tardía. *Acta Bioquím. Clín. Latinoamer.* 2018b; 52: 459-487.
23. Ventura S., Ruiz C., Durán E., et al. Amanitinas. *Rev. Lab. Clín.* 2015; 8: 109-112.
24. Zilker T., Faulstich H. Cyclopeptide-containing mushrooms: the deadly *amanitas*. En: Brent J., Burkhart K., Dargan P., Hatten B., Megarbane B., Palmer R. (eds) *Critical Care Toxicology*. Springer, Cham; 1-21, 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20790-2_117-2.
25. Talamoni M., Cabrerizo S., Cari C., et al. Intoxicación por *Amanita phalloides*, diagnóstico y tratamiento. *Arch. Argent. Pediatr.* 2006; 104: 372-374.
26. Guzmán E., Bartoli J., Zidarich S., et al. Intoxicación grave por *Amanita phalloides*. Una causa inusual de fallo hepatorenal en Argentina. *Prensa Med. Argent.* 2001; 88: 343-348.
27. Garcia J., Costa V.M., Bovolini A., et al. An effective antidotal combination of polymyxin B and methylprednisolone for α -amanitin intoxication. *Arch. Toxicol.* 2019; 93: 1449-1463.
28. Garcia J., Carvalho A., das Neves R.P., et al. Antidotal effect of cyclosporine A against α -amanitin toxicity in CD-1 mice, at clinical relevant doses. *Food Chem. Toxicol.* 2022; 166: 113198.

29. Wieland T., Faulstich H. Amatoxins, phallotoxins, phallolysin, and antamanide: the biologically active components of poisonous *Amanita* mushrooms. *Crit. Rev. Biochem.* 1978; 5: 185-260.
30. Wieland T. The toxic peptides from *Amanita* mushrooms. *Int. J. Peptide Protein Res.* 1983; 22: 257-276.
31. Vetter J. Toxins of *Amanita phalloides*. *Toxicon* 1998; 36: 13-24.
32. Antonyuk V.O., Klyuchivska O.Y., Stoika R.S. Cytotoxic proteins of *Amanita virosa* Secr. mushroom: purification, characteristics and action towards mammalian cells. *Toxicon* 2010; 55: 1297-1305.
33. Wei J., Wu J., Chen J., et al. Determination of cyclopeptide toxins in *Amanita subpallidorosea* and *Amanita virosa* by high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry. *Toxicon* 2017; 133: 26-32.
34. Walton J. Chemistry of the *Amanita* peptide toxins. En: *The Cyclic Peptide Toxins of Amanita and Other Poisonous Mushrooms*. Cham: Springer; pp. 19-57, 2018a.
35. Baumann K., Muenther K., Faulstich H. Identification of structural features involved in binding of α -amanitin to a monoclonal antibody. *Biochemistry* 1993; 32: 4043-4050.
36. Enjalbert F., Rapior S., Nouguier-Soulé J., et al. Treatment of amatoxin poisoning: 20-year retrospective analysis. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 2002; 40: 715-757.
37. Sgambelluri R.M., Epis S., Sasserà D., et al. Profiling of amatoxins and phallotoxins in the genus *Lepiota* by liquid chromatography combined with UV absorbance and mass spectrometry. *Toxins (Basel)* 2014; 6: 2336-2347.
38. Hallen H.E., Luo H., Scott-Craig J.S., et al. Gene family encoding the major toxins of lethal *Amanita* mushrooms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 104: 19097-19101.
39. Wieland H., Hallermayer R. Über die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes VI. Amanitin das Hauptgift des Knollenblätterpilzes. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1941; 548: 1-18.
40. Garcia J., Oliveira A., de Pinho P.G., et al. Determination of amatoxins and phallotoxins in *Amanita phalloides* mushrooms from northeastern Portugal by HPLC-DAD-MS. *Mycologia* 2015a; 107: 679-687.
41. Rodríguez-Maldonado M.G., López-Álvarez F., Andrade-Padilla M.A. Intoxicación por hongos: A propósito de un niño con falla hepática (Mushrooms poisoning: on purpose of a child with hepatic failure). *Rev. Mex. Pediatr.* 2008; 75: 171-174.
42. Pérez Gordillo J.H., Colbert Rodríguez M., Cruz Rivera N., et al. Falla hepática fulminante por intoxicación por *Amanita verna*. Reporte de tres casos. *Rev. Hosp. Juárez México* 2009; 76: 168-175.
43. Cortese S., Risso M., Trapassi J.H. Intoxicación con *Amanita phalloides*: Serie de tres casos. *Acta Toxicol. Argent.* 2013; 21: 110-117.
44. Barquero M., Bolaños P. Falla hepática aguda y otros trastornos causados por el consumo de *Amanita phalloides*. *Med. Legal Costa Rica* 2016; 33: 96-102.
45. Himmelmann A., Mang G., Schnorf-Huber S. Lethal ingestion of stored *Amanita phalloides* mushrooms. *Swiss Med. Wkly.* 2001; 131: 616-617.
46. Barceloux D.G. *Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants, and Venomous Animals*. Wiley, Londres, 2008.
47. Garcia J., Costa V.M., Carvalho A., et al. *Amanita phalloides* poisoning: mechanisms of toxicity and treatment. *Food Chem. Toxicol.* 2015d; 86 (Suppl. 2): 41-55.
48. Wieland T., Götzendörfer C., Zanotti G., et al. The effect of the chemical nature of the side chains of amatoxins in the inhibition of eukaryotic RNA polymerase B. *Eur. J. Biochem.* 1981; 117: 161-164.
49. Garcia J., Carvalho A.T., Dourado D.F., et al. New *in silico* insights into the inhibition of RNAP II by α -amanitin and the protective effect mediated by effective antidotes. *J. Mol. Graph. Model.* 2014; 51: 120-127.
50. Mas A. Mushrooms, amatoxins and the liver. *J. Hepatol.* 2005; 42: 166-169.
51. Horgen P.A., Vaisius A.C., Ammirati J.F. The insensitivity of mushroom nuclear RNA polymerase activity to inhibition by amatoxins. *Arch. Microbiol.* 1978; 118: 317-319.
52. Magdalan J., Ostrowska A., Piotrowska A., et al. α -Amanitin induced apoptosis in primary cultured dog hepatocytes. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2010a ; 48: 58-62.
53. Fiume L., Marinozzi V., Nardi F. The effects of amanitin poisoning on mouse kidney. *Br. J. Exp. Pathol.* 1969; 50: 270-276.
54. Faulstich H. New aspects of *Amanita* poisoning. *Klin. Wochenschr.* 1979; 57: 1143-1152.

55. Broussard C.N., Aggarwal A., Lacey S.R., *et al.* Mushroom poisoning – from diarrhea to liver transplantation. *Am. J. Gastroenterol.* 2001; 96: 3195-3198.
56. Lynen F., Wieland U. Über die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes. IV. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1938; 533: 93-117.
57. Dancker P., Löw I., Hasselbach W., Wieland T. Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin. *Biochim. Biophys. Acta* 1975; 400: 407-414.
58. Gabbiani G., Montesano R., Tuchweber B., *et al.* Phalloidin-induced hyperplasia of actin filaments in rat hepatocytes. *Lab. Invest.* 1975; 33: 562-569.
59. Wieland T. Interaction of phallotoxins with actin. *Adv. Enzyme Regul.* 1976; 15: 285-300.
60. Cooper J.A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.* 1987; 105: 1473-1478.
61. Loranger A., Tuchweber B., Gicquaud C., *et al.* Toxicity of peptides of *Amanita virosa* mushrooms in mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1985; 5 (6 Pt 1): 1144-1152.
62. Homer J.A., Sperry J. Mushroom-derived indole alkaloids. *J. Nat. Prod.* 2017; 80: 2178-2187.
63. Hallen H.E., Watling R., Adams G.C. Taxonomy and toxicity of *Conocybe lactea* and related species. *Mycol. Res.* 2003; 107 (Pt 8): 969-979.
64. Arnison P.G., Bibb M.J., Bierbaum G., *et al.* Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat. Prod. Rep.* 2013; 30: 108-160.
65. Derelanko M.J., Hollinger M.A. *Handbook of Toxicology*. Second ed., Taylor & Francis, 2001.
66. Walton J. Biosynthesis of the *Amanita* cyclic peptide toxins. En: *The Cyclic Peptide Toxins of Amanita and Other Poisonous Mushrooms*. S Cham: Springer; 93-130, 2018b.
67. Faulstich H., Buku A., Bodenmüller H., *et al.* Virotoxins: actin-binding cyclic peptides of *Amanita virosa* mushrooms. *Biochemistry* 1980; 19: 3334-3343.
68. Wieland T., Wieland O. Chemistry and toxicology of the toxins of *Amanita phalloides*. *Pharmacol. Rev.* 1959; 11: 87-107.
69. Rumack B.H., Spoerke D.G. *Handbook of Mushroom Poisoning: Diagnosis and Treatment*. CRC Press, Boca Raton, FL, EE.UU., 1994.
70. Liu J.-K. N-Containing compounds of Macromycetes. *Chem. Rev.* 2005; 105: 2723-2744.
71. Stasyk T., Lootsik M., Hellman U., *et al.* A new toxic protein from death cap *Amanita phalloides*: isolation and study of cytotoxic activity. *Stud. Biol.* 2008; 2: 21-32.
72. Stasyk T., Lutsik-Kordovsky M, Wernstedt C, *et al.* A new highly toxic protein isolated from the death cap *Amanita phalloides* is an L-amino acid oxidase. *FEBS J.* 2010; 277: 1260-1269.
73. Pišlar A., Sabotič J., Šlenc J., *et al.* Cytotoxic L-amino-acid oxidases from *Amanita phalloides* and *Clitocybe geotropa* induce caspase-dependent apoptosis. *Cell Death Discov.* 2016; 2: 16021.
74. Pomilio A.B., Vitale A.A. *Métodos Experimentales de Laboratorio en Química Orgánica*. Serie de Química, Monografía No 33, Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos (OEA), Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, 1988.
75. Wieland T., Wirth L., Fischer E. Über die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes, VII. β -Amanitin, eine dritte Komponente des Knollenblätterpilzgiftes. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1949; 564: 152-160.
76. Wieland T. Zeitungspapier-test für Giftpilze. *Umsch. Wiss. Tech.* 1978; 78: 611.
77. Meixner A. Amatoxin-Nachweis in Pilzen. *Z. Mykol.* 1979; 45: 137-139.
78. Beutler J.A., Vergeer P.P. Amatoxins in American mushrooms: evaluation of the Meixner test. *Mycologia* 1980; 72: 1142-1149.
79. Wieland T. Amatoxine, Phallotoxine – die Gifte des Knollenblätterpilzes. *Chem. unserer Zeit* 1979; 13: 56-63.
80. Beuhler M., Lee D.C., Gerkin R. The Meixner test in the detection of α -amanitin and false-positive reactions caused by psilocin and 5-substituted tryptamines. *Ann. Emerg. Med.* 2004; 44: 114-120.
81. Barbosa I., Domingues C., Barbosa R.M., *et al.* Amanitins in wild mushrooms: the development of HPLC-UV-EC and HPLC-DAD-MS methods for food safety purposes. *Foods* 2022; 11: 3929.
82. Enjalbert F., Gallion C., Jehl F., *et al.* Simultaneous assay for amatoxins and phallotoxins in *Amanita phalloides* Fr. by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1992; 598: 227-236.
83. Enjalbert F., Gallion C., Jehl F., *et al.* Toxin content, phalloxin and amatoxin composition of *Amanita phalloides* tissues. *Toxicon* 1993; 31: 803-807.

84. Enjalbert F., Cassanas G., Guinchard C., et al. Toxin composition of *Amanita phalloides* tissues in relation to the collection site. *Mycologia* 1996; 88: 909-921.
85. Enjalbert F., Cassanas G., Salhi S.L., et al. Distribution of the amatoxinas and phallotoxins in *Amanita phalloides*. Influence of the tissues and the collection site. *C. R. Acad. Sci. – Sér. III* 1999; 322: 855-862.
86. Hu J., Zhang P., Zeng J., et al. Determination of amatoxins in different tissues and development stages of *Amanita exitialis*. *J. Sci. Food Agric.* 2012; 92: 2664-2667.
87. Scott Chialvo C.H., Griffin L.H., Reed L.K., et al. Exhaustive extraction of cyclopeptides from *Amanita phalloides*: guidelines for working with complex mixtures of secondary metabolites. *Ecol. Evol.* 2020; 10: 4233-4240.
88. Kaya E., Surmen M.G., Yaykasli K.O., et al. Dermal absorption and toxicity of *alpha* amanitin in mice. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 2014; 33: 154-160.

COMENTARIOS SOBRE EVENTOS CIENTÍFICOS EXTRANJEROS

Wordlab y Euromedlab 2023: Comentarios sobre algunas presentaciones destacadas

Nilda E. Fink

Programa de Estímulos para el Avance de las Ciencias del Laboratorio Clínico (PROES),
Fundación Bioquímica Argentina (FBA).

Recibido: 23 de agosto de 2023

Aceptado: 31 de agosto de 2023

En la ciudad de Roma (Italia), entre los días 21 al 25 de mayo del corriente año, se llevaron a cabo el 25° Congreso Internacional de Química Clínica y Laboratorio Médico, el 25° Congreso Europeo de Química Clínica y Laboratorio Médico y el 55° Congreso de la Sociedad Italiana de Bioquímica Clínica y Biología Molecular Clínica organizados por la European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM; anteriormente EFCC), International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) y la Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC).

Los mismos se realizaron en el Centro de Convenciones la Nuvola y en ellos se presentaron 21 simposios, 4 conferencias plenarias, 24 talleres educativos, 12 presentaciones de la industria y otras actividades (reuniones cerradas, debates y reuniones con expertos). Hubo una enorme concurrencia entre participantes y expositores. Es de nuestro interés referirnos a algunos de los eventos relevantes de esas reuniones, lamentando que por razones de espacio no podamos referirnos a todas las presentaciones incluidas en los mismos.

La Conferencia de apertura llevada a cabo el sábado 21, trató sobre un tema actual, en las condiciones presentes en el continente europeo y estuvo referida a “El perdón para el bienestar individual, familiar y comunitario”. El mismo fue dictado por el Profesor Robert Enright (Universidad de Wisconsin Madison, EE. UU.) que es un pionero del estudio del perdón desde el punto de vista científico. El Prof. Enright señaló que el perdón es una parte importante de una vida sana y remarcó que las personas pueden enfadarse y permanecer así durante años como resultado de tensiones y conflictos entre las personas, dentro y fuera de

las familias y en las comunidades. Manifestó que el perdón puede curar la ira enfermiza y malsana. En esta conferencia inaugural, el Profesor Enright abordó siete preguntas sobre la virtud moral del perdón: “a) ¿Cómo puede la ira comprometer el bienestar? b) ¿Cuál es la definición de perdón cuando una persona está perdonando a otros que actuaron injustamente?; c) ¿Cuáles son algunos temas que a menudo se confunden con el perdón, como excusar o reconciliar?; d) ¿Cuál es la evidencia científica que muestra una mejora en el bienestar de quienes practican el perdón?; e) ¿Cómo hace la gente para perdonar a los demás?; f) ¿Cómo podría incorporarse el perdón en las familias?; g) ¿Cómo puede el perdón mejorar el bien común de las comunidades?” Estas preguntas que interpelan, inducen a una reflexión individual, familiar y comunitaria profundas.

En otra conferencia plenaria llevada a cabo el jueves 25, se trató el tema de los “Avances diagnósticos en demencia”. Fue dictada por el Dr. K. Blennow, especialista en Neurociencia y Fisiología (Universidad de Gotemburg, Alemania). En la misma se refirió a los biomarcadores del LCR ATN (amiloide, tau, neurodegeneración) que reflejan las patologías centrales de la enfermedad de Alzheimer (EA) y cuyas pruebas totalmente automatizadas están disponibles. Son métodos con muy buena precisión aprobados por la FDA. Los biomarcadores específicos de ATN incluyen A β 42, tau fosforilada (P-tau181) y tau “total” (T-tau), y las relaciones A β 42/40 y P-tau/A β 42. Estos analitos muestran un rendimiento muy alto para identificar el depósito de amiloide y la EA y también son útiles en las primeras etapas de la enfermedad. Sin embargo, el tamaño del efecto (veces de cambio) para la proporción de A β 42/40 en plasma es muy bajo (sólo alrededor del 10 % de disminución en los casos positivos de PET amiloide). Esto da como resultado una baja robustez, lo que puede causar dificultades para la introducción en el uso clínico rutinario.

Comento que recientemente se han informado datos prometedores para varias especies de tau fosforiladas (P-tau181, P-tau217 y P-tau231) en sangre, con aumentos específicos en EA y alta concordancia con el tau PET. Estudios recientes muestran altas correlaciones entre estas especies de P-tau tanto en LCR como en plasma, lo que sugiere que las diferencias son menores. Por otra parte, estudios recientes sugieren que P-tau231 muestra el cambio más temprano, mientras que P-tau217 aumenta con la gravedad de la enfermedad. También existen varios métodos diferentes para todas las variantes de P-tau en plasma, tanto inmunoensayos como métodos de espectrometría de masa. Los niveles de luz de neurofilamento (NFL) aumentan en el LCR y en la sangre en la EA, pero NFL es un

biomarcador general de neurodegeneración que muestra niveles elevados en muchos otros trastornos neurodegenerativos. Un nuevo biomarcador de neurodegeneración de tipo EA, la tau derivada del cerebro (BD-tau), se muestra prometedor como componente N en el marco ATN sanguíneo. Los biomarcadores sanguíneos, junto con APO-E y la edad, probablemente sean las herramientas de triage de primera línea para la predicción del riesgo.

Dentro de los simposios, cabe destacar el excelente Simposio de la IFCC sobre Inteligencia artificial y laboratorio clínico titulado: Aplicaciones de inteligencia artificial en medicina de laboratorio clínico. Presidentes de sesión: A. Carobene (Italia), D. Gruson (Bélgica).

- Inteligencia artificial: aplicaciones actuales y futuras en el laboratorio médico, D. Gruson (Bélgica).
- La ética de los dispositivos de punto de atención y la necesidad de marcos de políticas de IA en entornos con recursos limitados, M. Gmira (Marruecos).
- El valor de la IA en el ecosistema de salud móvil, N. Delvaux (Bélgica).
- Algoritmos completos de aprendizaje automático basados en hemogramas para la detección de sepsis, L. Agnello (Italia).
- Inteligencia Artificial Aplicada a la Prevención de la Esteatohepatitis No Alcohólica en Atención Primaria Utilizando Fib-4 como Marcador de Fibrosis, S. Sánchez Berdial (España)

El Dr. Demian Gruson en su presentación expresó que el laboratorio clínico se encuentra en el corazón de un ecosistema de salud cambiante donde las tecnologías emergentes, las pruebas inteligentes, el monitoreo remoto y la ciencia de datos juegan un papel central. Los laboratorios clínicos también se encuentran en una era de evolución de los servicios que brindan a los usuarios, la búsqueda de eficiencia operativa, necesidad de prácticas sostenibles e integración de plataformas multiómicas. El laboratorio “incrementado” resultante deberá tener beneficios para el manejo de los pacientes y los resultados clínicos.

Es evidente que para desarrollar enfoques integradores poderosos, con el uso de inteligencia artificial (IA) será posible y permitirá mejorar el apoyo a la decisión clínica, el modelado de riesgos, el tratamiento de enfermedades complejas, la eficiencia operativa y el

modelado *in-silico*. Con un papel cada vez mayor de la IA y los dispositivos de salud móviles, es importante adoptar los estándares de validación apropiados y evaluar cuidadosamente la calidad de estos complejos algoritmos de IA basados en datos antes de que se apliquen y se difundan en la atención médica diaria. Los laboratorios clínicos, los especialistas del laboratorio clínico y el conjunto de los cuidadores de Salud son actores importantes para garantizar un uso seguro y ético de la IA y las tecnologías emergentes en el cuidado de la salud.

Otro evento al cual tuvimos oportunidad de asistir fue el Simposio de la IFCC referido al “Rol central del laboratorio clínico en la salud pública y la continuidad de atención al paciente”. Fueron Presidentes del mismo los Dres. R. Erasmus (Sudáfrica) y A. St John (Australia).

- Revisión crítica de la evidencia que respalda el valor del Laboratorio Clínico en la atención clínica, K. Adeli (Canadá).
- Agregado de valor a través de una implementación de pruebas mejorada, A. St John (Australia).
- Demostrando el valor del laboratorio médico desde una perspectiva industrial, B. Meyer (Reino Unido).
- Estrategias para promover el valor del laboratorio médico en América del Norte, D. Kinniburgh (Canadá).

En el mismo, el Prof. Dr. Koshrow Adeli, Presidente de la IFCC, remarcó el papel del laboratorio clínico. La atención médica integral para la prevención, el diagnóstico, el tratamiento y el manejo de enfermedades clínicas, incluidos brotes de enfermedades infecciosas como COVID-19 proporciona a los profesionales de la salud datos basados en evidencia necesarios para brindar atención segura, eficaz y de alta calidad a los pacientes. Los profesionales de laboratorio aportan directamente a la atención al paciente y a la Salud pública. Si bien esta profesión es vital para la atención médica, los sistemas de salud tienden a no ser conscientes de su papel crucial y central en la prestación de atención médica. Lo que claramente se necesita es una campaña de concientización mundial que llegue a una audiencia global y llame la atención sobre el papel del laboratorio clínico y su valor agregado en la atención médica 6P: personalizada, preventiva, predictiva,

participativa, EMD y rutas clínicas. Como parte de nuevos planes estratégicos, la IFCC promoverá fuertemente el valor del laboratorio médico mediante la recopilación de evidencia para demostrar el valor del laboratorio clínico en la prestación de atención médica, particularmente en el contexto de la toma de decisiones clínicas. La evidencia recopilada de todo el mundo se utilizará para promover el papel fundamental del laboratorio en la atención médica entre las partes interesadas clave, incluidos los gobiernos, los profesionales de la salud y el público. La IFCC también está iniciando una nueva campaña anual llamada "Semana del laboratorio médico global de la IFCC" para celebrar la profesión en abril de cada año a partir de 2022 y durante todo el año en todas las principales conferencias y eventos internacionales o regionales de la IFCC. Este programa tiene como objetivo crear conciencia sobre la contribución crítica del laboratorio clínico al cuidado de la Salud y celebrar el importante papel de todos los profesionales de laboratorio en todo el mundo.

Otro evento de relevancia fue el Simposio de la IFCC titulado: Promoción de la excelencia en laboratorio médico en todo el mundo: Una actualización de los grupos de trabajo de la IFCC. Presidentes de la sesión: K. Adeli (Canadá), A. Haliassos (Grecia).

- Mejora de la calidad de los laboratorios a nivel global: Resultados del estudio piloto EQA de la IFCC, E. Amann (Alemania).
- Cerrar las brechas en el cribado neonatal: El programa global NBS de la IFCC, J. Bonham (Reino Unido).
- Impacto del Laboratorio Clínico en la Medicina Clínica: Desarrollando la Evidencia, Z. Zhao (EE. UU.).
- Base de datos mundial de intervalos de referencia para adultos y niños, J. Zierk (Alemania).

Nos referiremos brevemente a la presentación de la Prof. Dra. Z. Zhao (Weill Cornell Medicina, EE. UU.) sobre el IMPACTO DEL LABORATORIO CLÍNICO EN LA MEDICINA CLÍNICA: DESARROLLO DE LA EVIDENCIA. La Dra. Zhao comenzó su exposición mencionando “que se requiere que los profesionales de laboratorio realicen estudios que brinden evidencia del impacto de las pruebas en los resultados de los

pacientes, ya que el crecimiento del laboratorio médico depende de su "valor agregado" en el panorama de la atención médica. Para demostrar el valor de las pruebas, debemos comprender si vale la pena invertir en la prueba e identificar el impacto de las pruebas en la gestión, las vías de atención y los resultados. Sin embargo, en realidad, vincular la información del laboratorio clínico con el valor es un desafío. La mayoría de las pruebas de laboratorio se utilizan para múltiples propósitos y en combinación con otras pruebas médicas o de laboratorio en una vía de atención compleja. El impacto de las pruebas de laboratorio en los resultados de los pacientes es parcial y variable, ya que los resultados medidos pueden estar muchos pasos más allá del rendimiento de la prueba y verse afectados por muchas otras variables. Entonces, cuando falta la información del resultado, es difícil cuantificar el valor de las pruebas de laboratorio”.

El Grupo de trabajo de la IFCC sobre estudios de resultados en laboratorio médico (TF-OSLM) se estableció en 2022. En su presentación, compartió los mandatos y la experiencia del grupo de trabajo para identificar publicaciones existentes de alta calidad revisadas por pares que demuestren el valor del laboratorio en la atención médica y desarrollar un programa de investigación financiado para investigadores en hospitales ubicados en todo el mundo para realizar nuevas investigaciones retrospectivas y prospectivas con resultados que evalúen el valor del laboratorio clínico en la atención médica en general.

Otro Simposio importante en la programación fue el organizado por EFLM referido a la Calidad en el laboratorio clínico: un blanco en movimiento.

Presidentes de sesión: P. Fernandez-Calle (España), D. Vitkus (Lituania).

- Evaluación y seguimiento de la calidad analítica, M. Panteghini (Italia).
- Evaluación de la solidez del proceso de prueba total con indicadores de calidad, V. De Guire (Canadá).
- Medición de resultados e integración de medidas de calidad en laboratorio médico, M. Plebani (Italia).
- Los Programas de estandarización clínica de los CDC (CSP CSP) - Mejora de la calidad de las mediciones de biomarcadores de enfermedades en Investigación y atención al paciente, H. Vesper (EE. UU.).
- Mejorando la Reducción de Errores en la Fase Post Analítica del Laboratorio Utilizando Herramientas Lean 6 Sigma y Benchmarking, M. Mendes (Brasil).

Dentro de dicho simposio nos referiremos a la exposición sobre EVALUACIÓN DE LA ROBUSTEZ DEL PROCESO TOTAL de testeo mediante INDICADORES DE CALIDAD del que participó como disertante el Dr. V. De Guire (Hospital Maisonneuve-Rosemont, Montreal-CHUM Red de Laboratorios/Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Universidad de Montreal, Montreal, Canadá) quien durante su presentación se preguntó si el laboratorio es lo suficientemente bueno para monitorear su calidad del proceso total de testeo y garantizar la seguridad del paciente. También se interrogó como profesional del laboratorio clínico, sobre cuál es la mejor estrategia para evaluar de manera eficiente la mejora de la calidad a través de los Indicadores de Calidad (IC). Durante su presentación, revisó las pautas y herramientas internacionales disponibles para el monitoreo de IC y discutió, en base a iniciativas internacionales y nacionales, las estrategias para la evaluación comparativa, así como la metodología para la estandarización y selección de IC.

Otro de los Simposios relevantes fue el referido a Pruebas Prenatales cuyos Presidentes de sesión fueron los Dres. B. Das (India), G. Novelli (Italia). En dicho simposio se incluyó:

- Detección de anomalías cromosómicas fetales en el primer trimestre, G. Novelli (Italia).
- EQA en pruebas prenatales y estandarización de PAPP-A, C. Sturgeon (Reino Unido).
- Evaluación del riesgo de pre-eclampsia durante el embarazo, L. Poon (Hong Kong).
- Impacto del tamizaje neonatal ampliado en la identificación de Enfermedades Hereditarias en Piamonte y Valle De Aosta, P. Sauro (Italia).
- Estudio piloto para la implementación del cribado neonatal de atrofia muscular espinal en el sur de España, R. Yayhaoui (España).

Una de las presentaciones titulada: TAMIZAJE DE ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS FETALES DEL PRIMER TRIMESTRE fue realizada por el Dr. G. Novelli de la Universidad Tor Vergata (Roma, Italia). En el mismo mencionó que el diagnóstico prenatal proporciona una batería de investigaciones de potencial interés y eficacia que permiten a la pareja recibir información oportuna sobre cualquier patología presente en el feto. Las técnicas instrumentales disponibles actualmente ofrecen numerosas opciones que permiten realizar el diagnóstico prenatal tanto de forma no invasiva como invasiva. Durante las últimas dos décadas, se han desarrollado varios métodos y protocolos para evaluar el riesgo de anomalías cromosómicas, basados en marcadores de ultrasonido, bioquímicos y/o su

combinación. En los últimos años, asimismo, ha sido posible analizar muestras de ADN fetal (*cell free fetal DNA*, cffDNA) en sangre materna desde el primer trimestre del embarazo. Esta técnica conocida como Prueba Prenatal No Invasiva (NIPT) ha revolucionado el diagnóstico prenatal del ADN del primer trimestre, por la rapidez de ejecución, precisión y costos. Es muy reconocida la validez y la utilidad clínica de la NIPT limitada a las tres trisomías principales (21, 18, 13), para las cuales la prueba de detección tiene mayor sensibilidad y especificidad. Se han informado tasas de detección de embarazos únicos del 99,7 %, 98,2 % y 99 % para las trisomías 21, 18 y 13 respectivamente con resultados falsos positivos en el 0,04 %, 0,05 % y 0,04 % de las muestras. Aunque la NIPT se considera el estándar de oro en la detección de aneuploidías principales, es importante enfatizar que:

- (a) La NIPT no es una prueba de diagnóstico, sino de detección;
- (b) Actualmente es la prueba prenatal con mayor sensibilidad y especificidad para el tamizaje de la trisomía 21 y ha sido validada para las principales aneuploidías autosómicas y cromosómicas sexuales;
- (c) Reduce la dependencia de investigaciones diagnósticas invasivas, que tienen costos más elevados y, en consecuencia, reduce el riesgo de aborto vinculado a esas técnicas;
- (d) No puede proporcionar un resultado en aproximadamente el 2% de los casos, debido a la insuficiencia de la muestra relacionada con la baja concentración de cffDNA en el plasma materno;
- (e) Se recomienda como una selección contingente después de la Prueba Combinada;
- (f) Debe ofrecerse como parte de una consulta con especialistas en genética médica y/o obstetricia y ginecología.