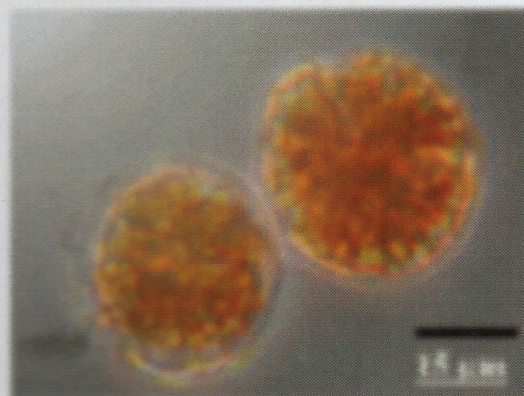
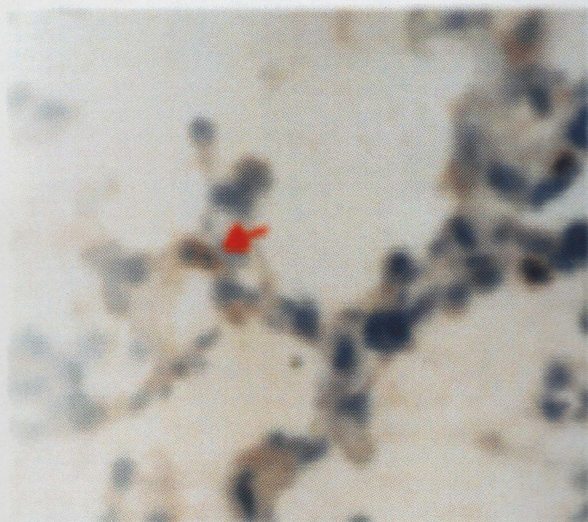
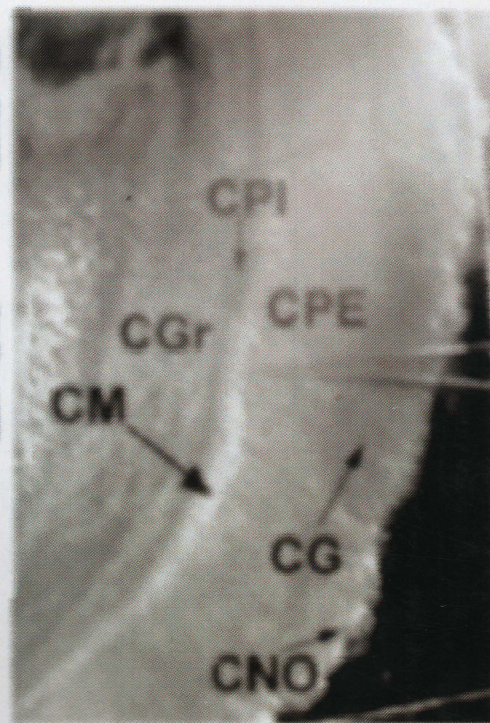
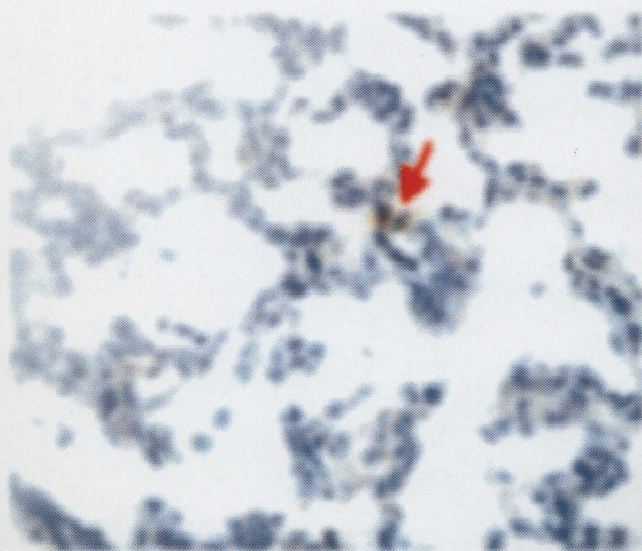


REVISTA DE CHILENA ESTUDIANTES DE MEDICINA

VOLUMEN 4

Nº1

2005



ISSN 0717-6074

REVISTA DE CHILENA ESTUDIANTES DE MEDICINA

ISSN 0717-6074

VOLUMEN 4

Nº1

2005

EDITOR

FABIOLA BARBA LILLO

EDICIÓN ELECTRÓNICA

GUILLERMO AGUILAR CORNEJO
JAVIER MARTINEZ ANTIMIL

COMITE EDITORIAL

PATRICIA BAU RODRIGUEZ
JAVIER MARTINEZ ANTIMIL

GUILLERMO AGUILAR CORNEJO
CRISTINA BARRA OSORIO

FABIOLA BARBA LILLO
CRISTINA BARRA OSORIO

DOCENTES REVISORES

DRA. MARTA ADONIS
DR. FELIPE CATAN
DRA. VIRGINIA FERNÁNDEZ
DR. PEDRO MALDONADO
DR. PATRICIO OPAZO
DR. HUMBERTO REYES

DR. CLAUD BEHN
DRA. LUCIA CIFUENTES
DR. FERNANDO HIDALGO
DR. ERNESTO MELKONIAN
DR. JUAN JOSÉ PRIETO
DR. IRVING SANTOS

DR. JUSTO BOGADO
DR. RICARDO CRUZ-COKE
DR. PEDRO MAGGIOLO
DR. JOSÉ NAVARRO
DR. SERGIO PUENTE
DR. EDUARDO WAINSTEIN

PATROCINADORES

FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMEDICAS (ICBM)

Este número de la Revista Chilena de Estudiantes de Medicina (ISSN 0717-6074) fue publicado por la Academia Científica de Estudiantes de Medicina de la Universidad de Chile (ACEM - UCHILE).

Las Palmeras 299, Interior Quinta Normal, Santiago, Chile.

Prohibida su reproducción total o parcial sin autorización escrita del editor

EJEMPLAR DE LIBRE DISTRIBUCIÓN

DISPONIBLE COMPLETO Y EN COLOR EN WWW.ACEMUCHILE.CL

REVISTA DE ESTUDIOS DE MEDICINA

ISSN 0717-8074

2005

Nº 1

VOLUMEN 4

EDITOR

FABIOLA BARBALLO

EDICIÓN ELECTRÓNICA

GUILERMO AGUILAR CORNEJO
JAVIER MARTÍNEZ ANTIJILL

COMITÉ EDITORIAL

PATRICIA BALBUENA RODRÍGUEZ
GUILERMO AGUILAR CORNEJO
JAVIER MARTÍNEZ ANTIJILL
FABIOLA BARBALLO
CRISTINA BARRA OSORIO

DOCENTES REVISORES

DR. JUSTO BOGADO	DR. CLAUDIO BEHN	DR. MARTA ADONIS
DR. RICARDO CRUZ-CORREA	DR. LUCÍA CIPRIENTES	DR. FELIPE CATAN
DR. PEDRO MAGGIOLI	DR. FERNANDO HIDALGO	DR. VIRGINIA FERNÁNDEZ
DR. JOSÉ NAVARRO	DR. ERNESTO MELKONIAN	DR. PEDRO MALDONADO
DR. SERGIO PUENTE	DR. JUAN JOSÉ PRIETO	DR. PATRICIO ORAZO
DR. EDUARDO WAINSTEIN	DR. IRVING SANTOS	DR. HUMBERTO REYES

PATROCINADORES

FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS (ICBM)

Este número de la Revista Chilena de Estudios de Medicina (ISSN 0717-8074) fue publicado por la Asociación
Chilena de Estudios de Medicina de la Universidad de Chile (ACEM-UCHILE).
Las Palmas 299, Interojo Quilín, Santiago, Chile.
Prohibida la reproducción total o parcial sin autorización escrita del editor.
DISTRIBUCIÓN GRATUITA
DISPONIBLE COMPLETO EN COLORES WWW.ACEMUCHILE.CL

EDITORIAL

REVELAN ESTRATEGIA DE LOS PATÓGENOS DEL NUEVO MUNDO

THEY REVEAL STRATEGY OF THE PATHOGEN OF THE NEW WORLD

Recientemente hemos recibido un notable documento, desde una fuente científica confiable; estaba en un correo electrónico junto a un anuncio sobre un virus de computadora, y parece ser un discurso importante dirigido a la Asociación Mundial de Patógenos (WPA). El texto se titula "Nuestro Futuro Infeccioso: la Nueva Agenda". En él, el Presidente de la WPA, Mr. Prion, anuncia un profundo cambio político, de gran interés para la humanidad, porque pronostica un cambio en las metas de nuestros mayores predadores. Agradecemos a *Science* por difundir su texto completo.

"Debo informar a la comunidad infecciosa", advierte Prion, "que la mayoría de nuestros antiguos anfitriones naturales está desapareciendo. Nunca nuestro futuro ha sido más negro, amenazado como está por una realidad que era impensable hace unos 5000 años. Nuestro abastecimiento alimentario está siendo reemplazado debido a una sola especie, *Homo sapiens*, que ha llegado a reinar sobre toda la Tierra. Domina por su cantidad y por el alcance de su diseminación, y ha llegado a ser para todos nosotros el más grande desafío, que ya no podemos seguir ignorando".

"Se requiere acción. Desde luego, en este desastre hay un germen de oportunidad y una oportunidad para los gérmenes. Con nuestra tradición evolutiva, debemos prepararnos para cambiar de gustos, cambiar de anfitrión, y aprovecharnos del único agregado apetitoso y disponible en nuestro menú: el camino del futuro es la homofagia".

"Antes de continuar con esta nueva oportunidad que se nos presenta, son necesarias algunas felicitaciones. Al HIV, por el gran salto realizado, y por matar tan lentamente como para compartir hospedero con muchos de nosotros. Al bacilo tuberculoso, por su triunfo renovado e inesperado. A los virus Ebola, Hanta, Lassa, y Marburg por sus ingeniosos esfuerzos, sabiendo que no permanecerán sin recompensa. A *Legionella pneumophila* por su recato silencioso. A todos aquellos ya en la cumbre, los grandes pioneros como *Plasmodium*, el virus dengue, y *Treponema*, y especialmente a aquel gran debilitador, el virus del resfrío común, por darnos a todos ejemplo espléndido de cómo alcanzar el éxito".

"Hay muchos factores que nos dan esperanza. *Homo* es notablemente hospitalario con nosotros. En cantidades extraordinarias, están ahora desnutridos e inmunodeficientes, y tienen una tendencia a mantenerse, no solamente esparciéndonos a nosotros los veteranos, sino dando muchas oportunidades nuevas para los novatos que llegan al banquete. Ellos gastan sus recursos médicos en unos pocos, mientras fracasan en sacarnos de tantas áreas, como los alimentos y el agua potable, que llegan a muchos. Ellos usan mal los antibióticos, una de sus mejores armas contra nosotros, permneciendo ciegos a nuestra habilidad evolutiva para desarrollar resistencia. Ellos prestan muy poca atención a nuestra gran capacidad para evolucionar a niveles nuevos de virulencia. Y ellos imprudentemente están cambiando el clima, liberando a muchos de nosotros de nuestras históricas limitaciones geográficas".

"La única nube oscura sobre nuestro horizonte es la propensión de *Homo* para auto-dañarse. Han amenazado modificar a algunos de nosotros para usarnos en su lucha intraspecífica o "guerra bacteriológica", como ellos la llaman, (como si nosotros hiciéramos la guerra). Esto podría causarnos un problema de disponibilidad alimenticia, pero ellos son reproductores tan prolíficos que, con nuestra notable paciencia genética, podríamos fácilmente resistir un desastre poblacional hasta que ellos logren una vez más la biomasa necesaria para satisfacer nuestros apetitos.

"En perspectiva, compañeros patógenos, *Homo* es la oportunidad que finalmente nos podrá beneficiar a todos. Aparte de su preponderancia numérica, muestra todas las debilidades que maximizan nuestro potencial efectivo. Aunque ellos niegan que existe un almuerzo gratuito, nosotros sabemos una cosa distinta. Hay almuerzos gratis para todos; son ellos mismos."

Revista Science 292, Number 5526, Issue of 29 Jun 2001, p. 2397. (Traducción: Dr. Angel Spotorno O.)

Thomas Eisner y Paul R. Ehrlich

Thomas Eisner, Cornell Institute para la Investigación en Ecología Química y el Departamento de Neurobiología y Comportamiento, Cornell University, Ithaca, NY 14853, EUA; Paul R. Ehrlich está en el Departamento de Ciencias Biológicas, Stanford University, Stanford, CA 94305, EUA.

CONTENIDO

VARIACIÓN EN PROTEÍNAS DEL SURFACTANTE EN TEJIDO PULMONAR DE LACTANTES FALLECIDOS DURANTE UNA INFECCIÓN POR <i>PNEUMOCYSTIS JIROVECI</i> <i>Licarallén Quevedo C., Dr. Sergio Vargas M., Bq. Carolina Ponce O.</i>	5
MODULACIÓN SEROTONINÉRGICA DE LA ACTIVIDAD NEURONAL DEL BULBO OLFATORIO DE LA RATA <i>Gabriel García-Huidobro Llord, Dra. María De la Luz Aylwin Ostalé.</i>	13
EXPRESIÓN DE RECEPTORES ESFEROIDALES Y COACTIVADORES EN ENDOMETRIOS OBTENIDOS DE PACIENTES CON SD. DE OVARIO POLIQUÍSTICO. POTENCIALES CONSECUENCIAS EN EL DESARROLLO DE HIPERPLASIA ENDOMETRIAL <i>Natalia Iturain M., Natalia Silva A., Dra. Margarita Vega, Dr. Fernando Gabler, Alejandra Villavicencio.</i>	20
EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LACTANTES CON CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS QUE CURSAN INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS BAJAS <i>José Miguel Flores M., Angela Gallardo E., Carolina Selman, Dr. Hernán Sepúlveda, E.U. Evelyn Palominos L.</i>	28
TASAS DE INCIDENCIA Y CARACTERIZACIÓN DE SARCOMAS EN LA PROVINCIA DE VALDIVIA (1999-2003) <i>Sergio Varela C, Paula Valenzuela S, Matías Miralles, Dr. Cristián Carrasco L</i>	33
ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ALGUCIDA DE LA BACTERIA <i>CYTOPHAGASP.</i> ASOCIADA AL DINOFLAGELADO TÓXICO <i>ALEXANDRIUM CATENELLA</i> <i>Soledad P. Ugarte, Adelheit B. Schneider, Alicia I. Sciaraffia, Dra. Ana Maria Amaro</i>	38
ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ALGUCIDA DE LA BACTERIA <i>CYTOPHAGASP.</i> ASOCIADA AL DINOFLAGELADO TÓXICO <i>ALEXANDRIUM CATENELLA</i> <i>Soledad P. Ugarte, Adelheit B. Schneider, Alicia I. Sciaraffia, Dra. Ana Maria Amaro</i>	38
GUERRA, PROSTITUCIÓN Y SÍFILIS, UNA SOMBRA EN EL SIGLO XX <i>Erika T Becerra C., María Angélica Bello F., Ximena Campos M., César Leyton R.</i>	44

VARIACIÓN EN PROTEÍNAS DEL SURFACTANTE EN TEJIDO PULMONAR DE LACTANTES FALLECIDOS DURANTE UNA INFECCIÓN POR *PNEUMOCYSTIS JIROVECI*

LICARALLÉN QUEVEDO C.¹, DR. SERGIO VARGAS M.², BQ. CAROLINA PONCE O.²

RESUMEN

Antecedentes: *Pneumocystis sp* induce daños en el surfactante pulmonar, consistentes en una alteración de su composición lipídica y en cambios selectivos en la expresión de sus proteínas (SP). Nosotros postulamos que en lactantes fallecidos durante una infección primaria por *Pneumocystis jiroveci*, presentan una disminución en la expresión de proteínas del surfactante del tipo hidrofóbicos (SP-B, SP-C) y un aumento en las de tipo hidrofílicos (SP-A, SP-D).

Método: Se utilizaron muestras de tejido pulmonar de lactantes fallecidos en la comunidad, las que fueron diagnosticadas para *P.jiroveci* mediante PCR anidada y las SPs analizadas por inmunohistoquímica. Se asignó un puntaje a cada muestra de acuerdo al grado de inmunotinción y el número de células positivas en 50 campos a 40X.

Resultados: Se observó un aumento significativo en la expresión de Sp-A ($p < 0.002$) en las muestras *P.jiroveci* positivas y una tendencia a la disminución en la expresión de SP-B que no alcanzó significancia estadística ($p = 0.12$).

Conclusión: Nuestros resultados sugieren que SP-A aumenta su expresión en presencia de *P.jiroveci* y justifican el análisis de un mayor número de muestras para el estudio de SP-B. Se continuaran nuestras investigaciones para cuantificar esta expresión y dilucidar si estas alteraciones ocurren a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional, relacionándolas con el síndrome de muerte súbita

Palabras claves: *pneumocystis jiroveci*, surfactante, síndrome de muerte súbita.

INTRODUCCIÓN

En el curso de la historia de la infección causada por el *Pneumocystis jiroveci*, se han realizado numerosos estudios sobre la neumonía que ocurre en pacientes inmunosuprimidos, como son aquellos que sufren del SIDA, que están sometidos a quimioterapia debido al cáncer, o que reciben drogas inmunosupresoras para el trasplante de órganos (1,2), todas estas enfermedades probablemente por reinfección por parte del patógeno (infección secundaria). Como principales modelos de estudio están los animales inmunosuprimidos e inmunodeficientes, principalmente los ratones SCID (colonias de diversa combinación de inmunodeficiencia, carecen de células T y B) y ratones nudes atímicos (carecen de células T) (3).

La infección primaria o primer contacto con *Pneumocystis*, que ocurre precozmente en la vida, normalmente permanece subclínica, pero algunos reportes han indicado que estos pueden presentarse clínicamente como neumonía en infantes inmunocompetentes, infección respiratoria autolimitada o sólo asintomática, que pueden llegar a ser transmitida a hospedadores susceptibles (4,5,6).

Más de un 50% de la etiología de la neumonía permanece sin ser conocida, es así como un número significativo de enfermedades respiratorias, podrían

corresponder a manifestaciones clínicas de un primer contacto con *Pneumocystis*. Estudios realizados en el laboratorio del Dr. Vargas, han sugerido la asociación entre la infección de *Pneumocystis* y el síndrome de muerte súbita (SMS)(4).

El mejor modelo de animal para el estudio de la infección primaria del *Pneumocystis* es el conejo, ya que estos usualmente desarrollan en forma espontánea, en el momento del destete, la neumonía causada por *Pneumocystis*, la cual resuelven a las pocas semanas, sin necesidad de un tratamiento, imitando la infección causada en humanos sanos (7,8). Sin embargo, es posible hacer un paralelismo entre la infección primaria y modelos de infección secundaria, ya que los cambios observados a nivel del surfactante pulmonar son los mismos en ambos modelos y dichos cambios son observados tempranamente en modelos de infección secundaria, sugiriendo que dichos cambios podrían ser requeridos para permitir la proliferación del *Pneumocystis* (9).

Pneumocystis, ha sido clasificado como un tipo exótico de hongo (10). La infección por *pneumocystis* es especie específico, siendo identificado *P. carinii* para los animales y el *P. jiroveci* en animales, y se sugiere que su transmisión es vía inhalación de quistes infectados(6).

¹ Estudiante 4° año Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

² Laboratorio de Infecciones Respiratorias. Programa de Microbiología. ICBM. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Se ha postulado que luego de la inhalación de quistes de *Pneumocystis* estos llegan al interior del alvéolo donde proliferan en su forma trofozoítica (nomenclatura de protozoo) y se adhieren al neumocito tipo I, a través de interacciones entre las adhesinas polipeptídicas sobre la superficie del hongo y proteínas de la matriz extracelular, así como fibronectina, vintronectina y laminina, éste parece ser el paso fundamental en la colonización (3). Se cree que la injuria provocada en el tejido es producto de una respuesta inflamatoria, a través de mediadores como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Paralelo a esto ocurre una hiperplasia e hipertrofia del neumocito tipo II. Se observa un incremento de la permeabilidad de la membrana alveolo-capilar, lo que explicaría en parte, el edema intersticial. Este proceso conduce a un relleno de espacios con masas del parásito, macrófagos, células epiteliales alveolares escamadas y eventualmente, leucocitos polimorfonucleares. Los materiales encontrados en el pulmón contienen además glicoproteínas, componentes del surfactante, inmonoglobulinas y otras proteínas del hospedero. Las células plasmáticas que infiltran los pulmones de los infantes durante la neumonía por este microorganismo no siempre están presentes en la neumonía de los pacientes de SIDA u otros inmunocomprometidos (3,6)

Se ha visto que la respuesta inmune generada por el hospedador es del tipo humoral y celular, teniendo una importancia fundamental las células T CD4⁺ (linfocitos T helper), lo cual se ha estudiado principalmente en ratones nude y SCID (3), lo que explicaría también la enfermedad en pacientes inmunodeprimidos. Todos estos mecanismos conducen finalmente a una sintomatología que cursa con: tos seca no productiva, fiebre de intensidad variable, astenia, disnea y taquipnea con cianosis. La presión parcial de oxígeno es baja, mientras que la presión parcial de dióxido de carbono puede ser normal o baja. Si no son tratados los pacientes, esto lleva en un 100% de los casos a una muerte por asfixia (11).

Los mecanismos por los cuales se produce la hipoxia en el desarrollo en esta enfermedad aún permanecen sin ser clarificados, estudios tanto en humanos como en modelos de infección en animales sugiere que la anormalidad en la expresión de los componentes y la actividad biofísica del surfactante juega un rol en la alteración fisiológica de la respiración asociada a esta infección (12), dichas alteraciones se presentan en etapas tempranas de la infección (9).

El surfactante pulmonar ubicado en la superficie alveolar, es una mezcla activa de fosfolípidos (80%), otros lípidos (10%) y proteínas (10%) secretadas por los neumocito tipo II, y cuyas funciones principales son: 1) Reducir la tensión superficial en la interfase líquido-aire, lo que permite mantener la estabilidad pulmonar a bajos volúmenes del pulmón (12), y 2) Participar en la defensa del huésped, evitando la vulnerabilidad del pulmón a la invasión de microorganismos (13).

Sobre la base de sus estructuras, función y solubilidad en solventes orgánicos, las proteínas del surfactante han sido divididas en dos grupos:

1. Las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C, mantienen la tensión superficial del alvéolo, participando en el empaquetamiento de los lípidos, organización y en el aumento de la absorción de la interfase líquido-aire. La contribución fisiológica en la función del pulmón ha sido designada a través de diversas observaciones, como por ejemplo: la deficiencia congénita de SP-B (y ausencia conmesurable de SP-C) resulta de manera uniforme en una falla respiratoria crónica en infantes humanos (14)

2. Las proteínas hidrofílicas SP-A y SP-D, son importantes componentes en la inmunidad innata. SP-A y SP-D son miembros de una familia de lectinas tipo C que incluyen un número de moléculas con conocida función de defensa del hospedador. Ambas proteínas pueden influir en la función de los macrófagos y la vía de señalización específica de receptores presentes sobre las células blancas. *In vitro* tanto SP-A como SP-D selectivamente se unen a *Pneumocystis* (12). Se ha demostrado que SP-A media el aumento del *clearance* de *Pneumocystis* por los macrófagos (12).

Se ha observado en el surfactante de humanos y animales modelos de NPC una elevación en la actividad fosfolipasa, disminución en la cantidad de fosfolípidos y alteración relativa e las proporciones de los componentes individuales de los lípidos (fosfotidilglicerol, dipalmitodilfosfatidilcolina) (12). Sin embargo, los cambios reportados en la composición lipídica son insuficientes para explicar las alteraciones fisiológicas observada en NPC. Se ha descrito una selectiva *down-regulation* de la expresión de las proteínas SP-B tanto en ratones scid/scid y modelos de ratones depletados para CD4, así como incrementos en los niveles de SP-A y SP-D inducido por NPC en tratamientos con corticoides en ratas (12), pero el rol de los cambio en estas proteínas en la patogénesis de la disfunción del surfactante permanecían desconocidos.

Recientemente se ha ido esclareciendo los cambios observados en las relaciones proteicas; es así como Atochina y cols. demostró en un modelo con tratamiento no esterooidal que NPC induce un incremento significativo en la tensión superficial mínima, paralelo a la selectiva inhibición de la expresión de SP-B y SP-C. Además reportó que los niveles alveolares de SP-D eran marcadamente elevados. Estudios con ratón *knockout* para SP-A y SP-D no muestran alteraciones en la tensión superficial (15).

Al analizar las investigaciones realizadas para aclarar la neumonía causada por *Pneumocystis jiroveci* durante una infección secundaria, es posible relacionarla con la infección primaria y predecir un posible mecanismo que explique su manifestación clínica o subclínica según corresponde, pero principalmente, nos ayudará a recolectar mayor información para relacionar los cambios producidos en el surfactante con el síndrome de muerte súbita estudiado en el laboratorio del Dr. Vargas.

De acuerdo a esto, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo y objetivos:

HIPÓTESIS:

Lactantes fallecidos durante una infección primaria por *Pneumocystis*, presentan un disminución en la expresión de proteínas del surfactante hidrofóbicas (SP-B, SP-C) y un aumento de la expresión de proteínas del surfactante hidrofílicas (SP-A, SP-D)

OBJETIVO GENERAL:

Determinar, mediante inmunohistoquímica, las proteínas del surfactante en muestras de tejido pulmonar de lactantes fallecidos que cursan una infección primaria de *Pneumocystis jiroveci*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Clasificación de las muestras de tejido pulmonar en: positivo para *Pneumocystis jiroveci* y negativos para *Pneumocystis jiroveci*, mediante PCR anidada.
- Estandarizar un método inmunohistoquímico, para el análisis semi-cuantitativo para SP-A.
- Utilizando el protocolo estandarizado de inmunohistoquímica, analizar SP-B.
- Realizar un análisis comparativo de las diferentes proteínas y su relación con la infección por *P. jiroveci*

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

Muestras de tejido de pulmón derecho de lactantes fallecidos en la comunidad, obtenidos desde el Servicio Médico Legal.

2. Procesamiento de las muestras

Las muestras desde cada lóbulo del pulmón fueron almacenadas a -20°C. Se realizaron cortes en micrótopo de congelación de 4mm, se fijaron con acetona fría en portaobjetos silanizados y se almacenaron a -20°C en papel de aluminio, para su posterior estudio.

3. Diagnóstico de *Pneumocystis jiroveci*

a) Extracción y purificación de ADN mediante Kit Qiagen (cat# 51306)

b) La detección del *P. jiroveci* se realiza mediante la reacción de polimerasa en cadena (PCR) anidada en termociclador (MJ research, modelo PTC-150-16), de acuerdo al siguiente protocolo:

1° *Amplificación:* se utilizó partidores pAZ102-H y pAZ102-E (Bioschile), que amplifican el gen de la sub-unidad mayor del rRNA mitocondrial del *Pneumocystis* y se preparó el mix para cada muestra. El programa utilizado fue: 40 ciclos de: 94°C por 1:30min; 55°C por 1:30min; 72°C por 2:00min.

2° *Amplificación:* se utilizó partidores internos pAZ102X y pAZ102Y (bioschile) específicos para *Peumocystis jiroveci*. y se preparó el mix para cada muestra. El programa utilizado fue: 10 ciclos de: 94°C por 1:30 min, 56°C por 1:30 min, 72°C por 2:00 min, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1:30 min, 65°C por 1:30min, 72°C por 2:00min. Las muestras se amplificaron se almacenaron a -20°C. Se observaron en gel de agarosa al 2% que contiene Bromuro de etidio en buffer TAE 0.5X. El gel se corrió a 50 volts por 30 minutos en buffer TAE 0.5X con un marcador de peso molecular de 100pb (Gibco cat#15628-019)

Soluciones utilizadas:

- Buffer TAE 50X: 40 mM Tris, 20mM Acido acético glacial, 1mM EDTA pH 8.0.

- Mix 1x para PCR (invitrogen: 2.5 ml DNA muestra, 2.5 ml buffer PCR10X, 3ml MgCl₂ 25mM, 0.5ml dNTPs 10mM, 0.75 ml de cada primers 10mM, 0.125 ml Taq polimerasa 500U (gibco ct#18038-042) y 14.8 ml de agua nanopure.

- Partidores universales para *Pneumocystis* :

pAZ102-H sens: 5'-GTG TAC GTT GCA AAG TAC TC-3'
pAZ102-E antisens: 5'-GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA-3'

- Partidores internos de *P. jiroveci*:

PAZ102-X sens: 5'-GTG AAA TAC AAA TCG GAC TAG G-3'
PAZ102-Y antisens: 5'-TCA CTT AAT ATT AAT TGG GGA GC-3'

4. Inmunohistoquímica

Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente de acuerdo al siguiente protocolo:

a) Las muestras procesadas se ambientaron en PBS por 5min. y se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena mediante la adición de 40ml del reactivo bloqueo peroxidasa (Sta. Cruz cat# G1703) por 10 min. Se lavo con PBS por 2 min 3 veces, eliminando el exceso de líquido desde los portaobjetos

b) Para bloquear las uniones inespecíficas se adicionó 40 ml de BSA al 2% por 30 min.

c) La titulación de los anticuerpos primarios SP-A (cat#sc-7700) y SP-B (cat#sc-7701) se realizó a las diluciones: 1:20, 1:30 y 1:50 en BSA al 2%. Se incubó con 40 ml del anticuerpo primario previamente diluido por 30 min. Se lavo con PBS por 2 min 3 veces, eliminando el exceso de líquido desde los portaobjetos.

d) Para el bloqueo de biotina endógena se utilizó el kit Dako cat#01344. Primero se incubó con 40 ml de Avidina por 10 min. Se lavo con PBS como se indicó anteriormente. Segundo, se incubó con 40 ml de Biotina por 10 min. Se lavo nuevamente con PBS.

e) Se incubaron las muestras con 40 ml de anticuerpo secundario biotinilado anti-cabra (cat# sc-2053) por 30 min. Se lavo con PBS por 2 min 3 veces, eliminando el exceso de líquido desde los portaobjetos.

f) Cómo método de detección se utilizó el kit estraptavidina-HRPO (Santa Cruz cat#SC-2053).

g) Se realizó tinción de contraste con hematoxilina #2 de Gill por 10 min, se realizó lavados con agua desionizada. Luego se pasó por un baño con alcohol-ácido, lavando posteriormente con agua desionizada, se dejó por 5min en solución de Borato de sodio al 1% y se lavó con agua desionizada.

h) Inmediatamente se adicionó a cada portaobjeto 1 a 2 gotas de medio de montaje acuoso (Dako cat#S3025), se cubrió con cubreobjeto, para su observación por microscopia de luz (olympus Bx60)

Soluciones utilizadas: Todos los reactivos son Merck

- Buffer PBS: 1.5mM KH₂PO₄, 0.15M NaCl, 3 mM de Na₂HPO₄

- Solución alcohol-ácido: alcohol70%, 12 mM HCl

5. Análisis Inmunohistoquímico

Para el análisis semicuantitativo de la tinción inmunohistoquímica se establecieron categorías de análisis a las que se le asignó un puntaje determinado (tabla 1). La cuantificación de la marca se realizó calculando el promedio de la multiplicación del número de células positivas en 50 campos 40x por el puntaje asignado (ver fórmula).

Formula de asignación del puntaje:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ de células (50 campos 40x)} \times \text{puntaje (1,2 o3)}}{3}$$

Tabla 1: Categorización celular semicuantitativa inmunohistoquímica.

Categoría	Puntaje	Características
+++	3	Tinción Intensa (naranja-oscuro), cubre todo el citoplasma celular.
++	2	Tinción Media (anaranjado), cubre zonas del citoplasma, más pericelular
+	1	Tinción Tenue (anaranjado-plomizo), cubre zonas del citoplasma, o todo el citoplasma.

6. Análisis estadístico

Para verificar si existían diferencias significativas en la expresión de las proteínas del surfactante en los grupos *P.jiroveci* positivo y los *P.jiroveci* negativo, se utilizó el software de estadística Systat, aplicando el test de Mann-Whitney que se emplea para el análisis de variables no pareadas con n < 9. Valores de p < 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

1. Clasificación de las muestras mediante diagnóstico de *Pneumocystis jiroveci*

La PCR anidada genera dos fragmentos identificables en el gel de agarosa al 2%: en la 1° amplificación es de 362 pb y en la 2° amplificación es de 267 pb. En la figura 1, se ilustran algunas muestras observadas. Mediante la PCR se obtuvo el diagnóstico de *P.jiroveci* en cada muestra estudiada, lo que permitió clasificar las muestras en: *P.jiroveci* positivo y *P.jiroveci* negativo (tabla 2).

Muestra	PCR 1	PCR 2	<i>Pneumocystis jiroveci</i>
1138-03 LDI	+	+	Positivo
1138-03 LDM	+	+	Positivo
1138-03 LDS	+	+	Positivo
1642-03 LDI	-	+	Positivo
1642-03 LDM	-	+	Positivo
1642-03 LDS	-	-	Negativo
1225-03 LDI	-	-	Negativo
1225-03 LDM	-	-	Negativo
1225-03 LDS	-	-	Negativo
1231-03 LDI	-	-	Negativa
1231-03 LDM	-	-	Negativa
1231-03 LDS	-	-	Negativa
1222-03 LDS	-	+	Positiva
658-03 LDI	-	+	Positiva
738-03 LDI	-	+	Positiva
865-03 LDI	-	-	Negativa

Tabla 2: Clasificación de las muestras según diagnóstico de *P.jiroveci*

2. Inmunohistoquímica

Se estandarizó el protocolo de inmunohistoquímica para ambas proteínas del surfactante y la titulación del primer anticuerpo dio como mejor dilución 1:30 para SP-A y para SP-B. Se identificó una muestra como positiva para *P.jiroveci*, la cual fue utilizada como control positivo para SP-A y control negativo para SP-B, dada su gran intensidad en la inmunohistoquímica y su PCR anidada positiva en ambas amplificaciones. Como control negativo se utilizó cada muestra sin la incubación con el primer anticuerpo (figura 2)

3. Análisis Inmunohistoquímico

Las muestras procesadas para inmunohistoquímica, presentaron diferentes tipos de inmunotinción por célula marcada con el anticuerpo anti proteína del surfactante (figura 3). Estas diferencias fueron claves para su clasificación (ver tabla 1) y fueron observadas tanto para SP-A como para SP-B (datos no mostrados).

Los resultados del análisis semicuantitativo para SP-B y SP-A se muestran en las tablas 3 y 4, los cuales se obtuvieron mediante la fórmula de asignación de puntaje (ver antes).

El análisis estadístico indicó que la expresión de la proteína SP-A en las muestras *P.jiroveci* (+) fue significativamente mayor a las muestras *P.jiroveci* (-) ($p < 0.0024$). La proteína SP-B no presenta una diferencia significativa entre los dos grupos de muestras ($p = 0.12966$).

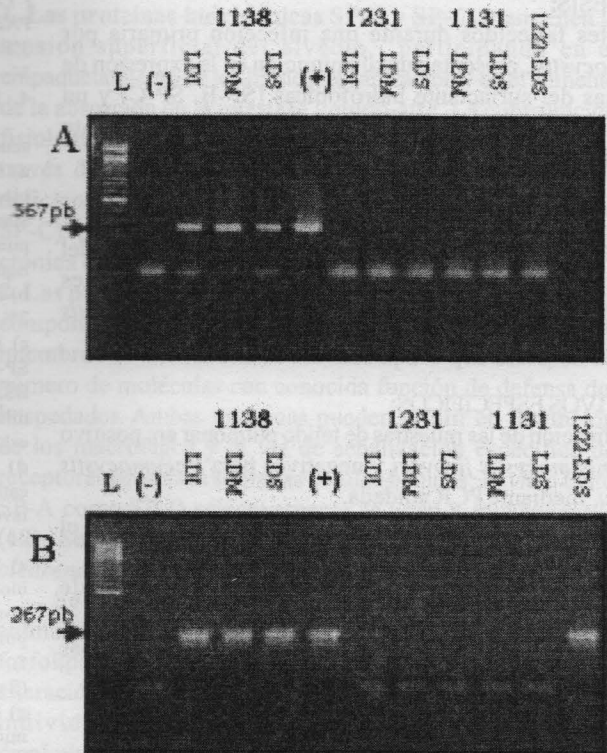


Figura 1: Primera y Segunda PCR para *P. jiroveci*. A: Primera PCR con partidores pAZ102-H y pAZ102-E. B: Segunda PCR con partidores internos pAZ102X y pAZ102Y. L: marcador de peso molecular de 100pb, (-): control negativo, (+): control positivo, LDS: lóbulo derecho superior, LDM: lóbulo derecho medio, LDI: lóbulo derecho inferior. Números: codificación de muestras del año 2003

DISCUSIÓN

Diversos estudios han demostrado que la infección por *Pneumocystis* provoca una alteración selectiva en la composición del surfactante, y disminuye la razón fosfolípido/proteína (12,16).

Las investigaciones en los últimos años se han volcado al análisis de los cambios en la expresión de las proteínas del surfactante. Atochina y cols. en el año 2000, demostraron una disminución en la expresión de las proteínas hidrofóbicas Sp-B y SP-C, en infección por *Pneumocystis* en ratones scid/scid sin tratamiento esteroideal; este cambio se vio acompañado de un cambio fisiológico importante en las propiedades biofísicas del surfactante (aumento de la tensión superficial). Estudios previos realizados para encontrar la función de las proteínas hidrofóbicas, apoyan la relación entre estas proteínas y cambios en la tensión superficial. (3,12,17).

El aumento en la expresión de las proteínas hidrofílicas también se ha demostrado (18). Así en pacientes con neumonía relacionadas a SIDA se observó un incremento de la proteína SP-A, incluso mayor que en pacientes que presentan neumonías no producidas por éste microorganismo. (16,19).

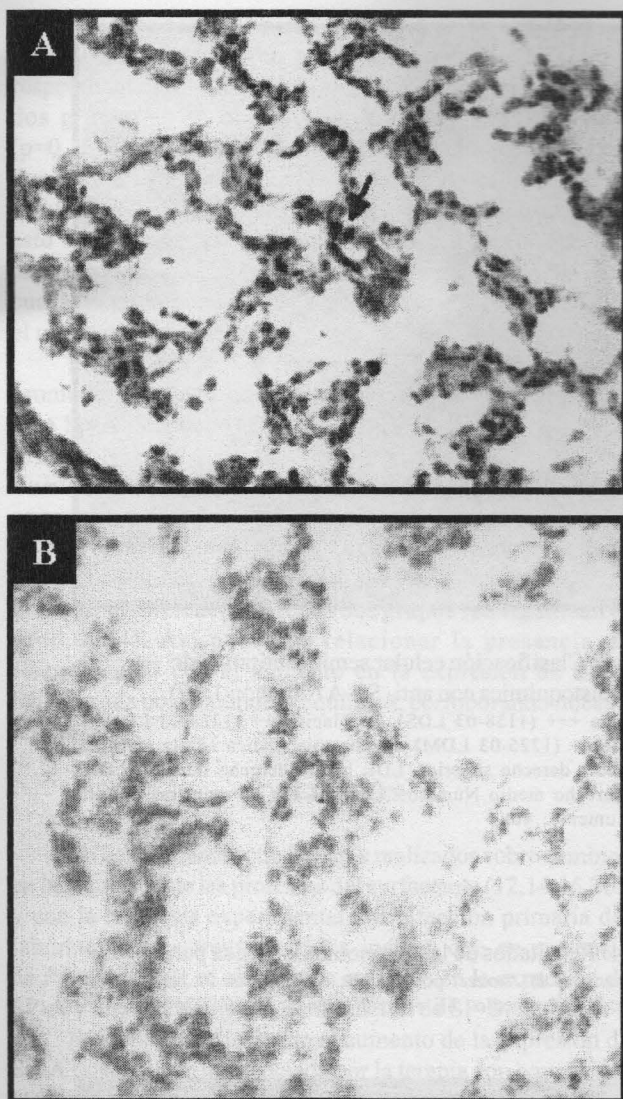


Figura 2: Muestras controles de Inmunohistoquímica
 A: Control positivo (1138-03 LDI). B: Control negativo (1138-03 LDI). Aumento 20X

La proteína SP-D también responde con una elevación en su concentración frente a infecciones por *Pneumocystis jiroveci* (12.), y recientemente se ha comprobado su función en la agregación de microorganismos, participando de esta manera en la eliminación por parte del hospedero, al poseer la proteína SP-D un dominio que reconoce la glicoproteína A de *Pneumocystis sp*, que potencia la interacción con macrófagos alveolares (16,18,19).

Si bien todos estos estudios fueron realizados en modelos que cursaban con una infección secundaria, es posible relacionarlos a una infección primaria, ya que los cambios observados en el surfactante se desarrollan tempranamente en la infección (20).

Basados en las observaciones descritas, nosotros planteamos que lactantes fallecidos durante una infección primaria por *Pneumocystis jiroveci*, presentan una disminución en la expresión de proteínas del surfactante de

A

Muestra	Categoría +	Categoría ++	Categoría +++	Puntaje
1138-03 LDI	4	5	0	4,667
1138-03 LDM	0	3	5	7,000
1138-03 LDS	0	5	1	4,333
1642-03 LDI	6	6	0	6,000
1642-03 LDM	0	0	0	0,000
1222-03 LDS	0	0	0	0,000
$\bar{X} \pm SE$				3,667 \pm 1,223

B

Muestra	Categoría +	Categoría ++	Categoría +++	P. jiroveci (-)
1642-03 LDS	2	2	0	2,000
1225-03 LDI	1	8	3	8,667
1225-03 LDM	1	9	4	10,333
1225-03 LDS	0	26	8	25,333
1231-03 LDI	0	4	6	8,667
1231-03 LDM	9	0	0	3,000
$\bar{X} \pm SE$				9,667 \pm 3,421

Tabla 3: Resultados de la inmunohistoquímica para SP-B

A: en muestras *P. jiroveci* positiva. B: en muestras *P. jiroveci* negativa.
 X = Promedio SE = Error estándar. P=0.12966

tipo hidrofóbicas (SP-B y SP-C) y un aumento de las de tipo hidrofílicas (SP-A y SP-B).

Para probar nuestra hipótesis lo primero que se realizó fue la clasificación de las muestras de tejido pulmonar mediante PCR anidada. Se estudiaron los pulmones derechos de 8 pacientes, obteniendo muestras de cada uno de los lóbulos. En la tabla 2 se pueden observar los resultados de las dos amplificaciones sucesivas de ADN: se obtuvieron 8 muestras *P. jiroveci*-negativas y 8 muestras *P.jiroveci*-positivas. Sólo la muestra 1138-03 presentó un PCR positivo en las dos amplificaciones, sugiriendo una mayor carga de *P. jiroveci*. La muestra 1642-03 es negativa para *P.jiroveci* sólo en el lóbulo Derecho Superior (LDS), indicando una infección localizada del patógeno en los otros dos lóbulos, ésta focalización de la infección ha sido observada anteriormente en nuestro laboratorio (datos no mostrados). En la fig. 1A se observa una banda de 367 pb que corresponde a la primera amplificación de las muestras 1138-03 y en la fig.1B se observa una banda de 267 pb que corresponde a la segunda amplificación de la misma muestra. Las otras 2 muestras cargadas en el gel no amplifican para *Pneumocystis*. La muestra 1642-03 LDS positiva para *P. jiroveci*, no presentó banda en la primera amplificación, ya que la cantidad de ADN obtenida es menor a la detectada por un gel de agarosa, pero al amplificar nuevamente esta muestra si observamos una banda a 267pb (2° amplificación).

El análisis de las variaciones de expresión de las proteínas del surfactante se realizó a través de inmunohistoquímica. Por lo tanto nuestra segunda etapa en

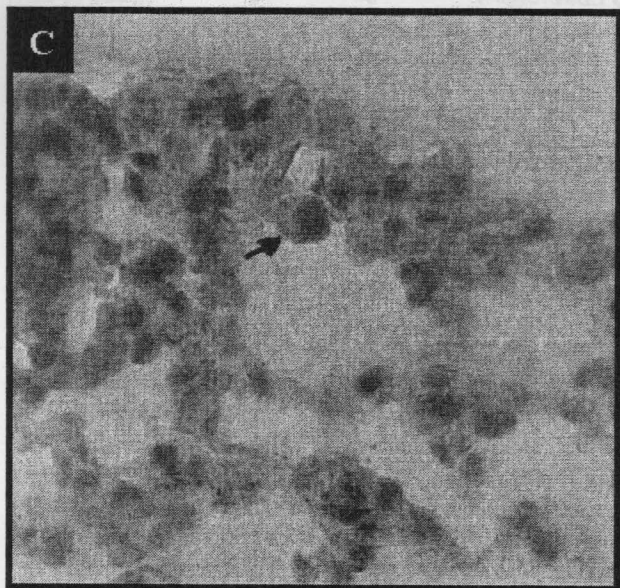
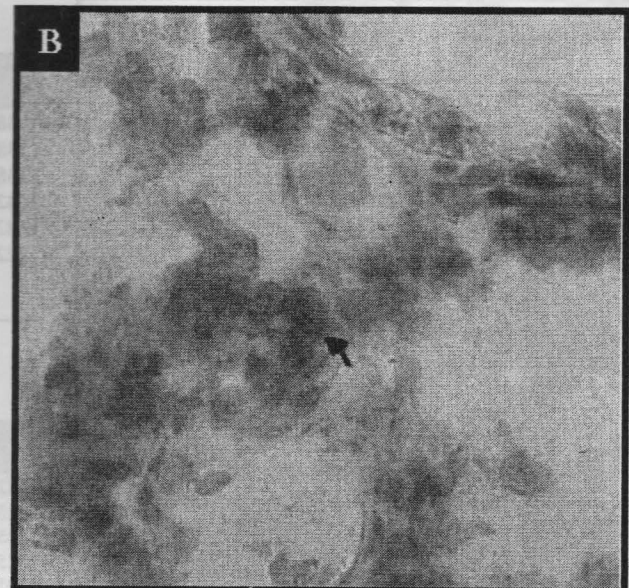
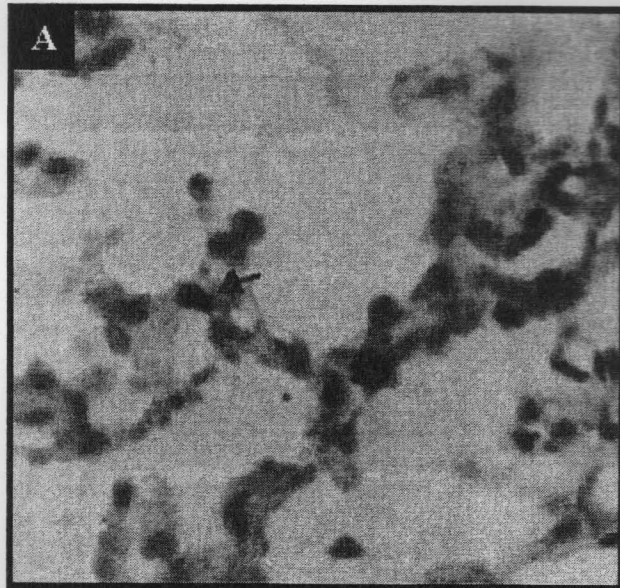


Figura 3: Clasificación celular semicuantitativa de Inmunohistoquímica con anti- SP-A (dilución 1:30).
A: Tinción +++ (1138-03 LDS). **B:** Tinción ++ (1225-03 LDI).
C: Tinción + (1225-03 LDM). Flecha roja: indica célula marcada.
 LDS: lóbulo derecho superior, LDI: lóbulo derecho inferior, LDM: lóbulo derecho medio. Números: codificación de muestras del año 2003. Aumento: 40x

Tabla 4: Resultados de la inmunohistoquímica para SP-A
A: en muestras *P. jiroveci* positiva. **B:** en muestras *P. jiroveci* negativa. X = Promedio SE = Error estándar. P < 0.00244

A

Muestra	Categoría +	Categoría ++	Categoría +++	P.jiroveci (+)
1138-03 LDI	2	12	30	38,667
1138-03 LDM	0	8	10	15,333
1138-03 LDS	0	11	20	27,333
1642-03 LDI	0	3	0	2,000
1642-03 LDM	0	2	0	1,333
1222-03 LDS	0	0	9	9,000
658-03 LDI	40	20	1	27,667
738-03 LDI	50	0	10	26,667
			X ± SE	18,500 ± 4,823

B

Muestra	Categoría +	Categoría ++	Categoría +++	P.jiroveci (-)
1642-03 LDS	0	0	0	0,000
1225-03 LDI	0	6	0	4,000
1225-03 LDM	1	0	0	0,333
1225-03 LDS	0	0	0	0,000
1231-03 LDI	2	0	0	0,667
1231-03 LDM	0	0	0	0,000
1231-03 LDS	0	0	0	0,000
865-03 LDI	0	0	0	0,000
			X ± SE	0,625 ± 0,490

el presente estudio fue estandarizar la técnica para las SPs del tipo hidrofóbicas e hidrofílicas. Se probaron dos medios de bloqueo: el entregado en el kit straptavidina-HRPO y BSA al 2%, siendo este último el más eficiente en la disminución del *background* de la inmunotinción. Se realizó la titulación del anticuerpo primario (1:20, 1:30 y 1:50), obteniéndose la mejor marca con la dilución 1:30 en BSA al 2% tanto para SP-A como para SP-B (ver materiales y métodos). El análisis de la inmunohistoquímica se llevó a cabo por una categorización de las inmunotinciones (tabla 1 y fig.3) y asignación de puntaje como fue descrito antes.

Como se puede apreciar en la tabla 3 A y B, el promedio de células positivas y su puntaje asignado para SP-B en muestras *P.jiroveci*-positivas es menor que para las muestras *P.jiroveci*-negativas (3.6667 y 9.667 respectivamente), encontrando incluso muestras sin marcas para SP-B en el grupo infectado con *Pneumocystis* y muy pocas células

categorizadas como 3 cruces en comparación con el grupo control no infectado (en promedio 1 célula y 4 células respectivamente). Al realizar el análisis estadístico de estos dos grupos no se observó una diferencia significativa ($p=0.1296$), sin embargo esto se puede adjudicar a la gran desviación estándar entre las muestras de cada grupo en estudio y al número limitado de casos estudiados, es por esto que al observar los resultados se puede ver que hay una "tendencia" a la disminución de la expresión de SP-B, la cual sólo podremos confirmar fehacientemente al aumentar el número de muestras.

En la tabla 4 A y B, se puede observar el puntaje promedio asignado por las células marcadas (categorías) para Sp-A. Se puede apreciar claramente un aumento en la inmunotinción de SP-A en el grupo infectado con *Pneumocystis* (puntaje promedio: 18,500 contra 0,625). No se encontraron células marcadas con categoría tres cruces en el grupo *Pneumocystis*-negativas (no infectada). Si bien las desviaciones entre las muestras de los grupos son grandes, la diferencia entre los dos grupos fue significativa ($p<0.0024$). Así podemos relacionar la presencia de *Pneumocystis* con el aumento en la expresión de SP-A evidenciada por inmunohistoquímica, corroborando nuestra hipótesis.

CONCLUSIÓN

En concordancia con trabajos realizados sobre cambios en la expresión de las proteínas del surfactante (12,14,15,20), y con la hipótesis experimental por infección primaria del laboratorio, nuestros resultados indican que en presencia de *Pneumocystis* se observa un aumento en la expresión de SP-A y una tendencia a la disminución de SP-B.

Evidencias indican que el aumento de la expresión de SP-A puede verse influenciada por la terapia con corticoides (16, 12, 21) que fue utilizada para modelos de animales inmunosuprimidos (20). Se ha observado recientemente que neumonía por *P. jiroveci* altera la expresión y distribución de las proteínas SP-A y SP-D, especialmente de la proteína SP-A, la cual no cambia en la fracción LA (agregados grandes de surfactante) (12), pero aumenta enormemente en la fracción SA (agregados pequeños de surfactante) en el líquido broncoalveolar (18). Debido a esto es importante conocer la metodología en cada estudio para saber si los cambios o no en la expresión de SP-A son atribuibles a *Pneumocystis*. Nuestro estudio no estuvo influenciado por corticoides y se observó SP-A total (en toda la muestra de tejido pulmonar).

Estudios realizados sobre la respuesta inmune generada por el pulmón, indican que cambios en los componentes del surfactante, pueden jugar un rol en la patogénesis de algunas enfermedades respiratorias, planteando que existe un balance entre las acciones estimuladoras e inhibitorias generadas por el surfactante sobre las células del sistema inmune. Es posible evidenciar que las proteínas SP-A y SP-D están involucradas en el reconocimiento de los microorganismos, actuando como opsoninas y estimulando la quimiotaxis y

fagocitosis, si bien cada una con propiedades particulares (13). Sin embargo la neumonía por este patógeno es caracterizada por una severa hipoxemia que a menudo es desproporcionada con respecto a la intensidad de la inflamación pulmonar (22).

Todos los estudios realizados ya sea en modelos experimentales en inmunosuprimidos, pacientes inmunosuprimidos o conejos que cursan con una infección primaria espontánea por *Pneumocystis* (12, 20,22) indican que existe una disminución de las proteínas hidrofóbicas (SP-B y SP-C), si bien nuestro estudio no dio una diferencia significativa estadísticamente, pudimos observar una disminución en la cantidad de células de categoría 3 cruces disminuida e inclusive casos donde por medio de ésta técnica de inmunotinción no pudimos observar células marcadas para SP-B.

Entendiendo la función de cada tipo de proteína del surfactante (ver introducción) se podría postular que los daños producidos en el surfactante, evidenciados como un aumento de las proteínas hidrofílicas y disminución de las de tipo hidrofóbicas, acompañadas de la disminución de los fosfolípidos, podrían producir una desestabilización de la fisiología pulmonar que produzca la muerte si un lactante pequeño no es capaz de compensar con un mayor esfuerzo respiratorio.

AGRADECIMIENTOS

Para la realización de este trabajo recibí el apoyo de todas las personas que conforman el Laboratorio de Enfermedades Respiratorias, quienes me acogieron con gran calidez e hicieron de mi estadía una vivencia gratificante. Debo agradecer en particular al Dr. Sergio Vargas quien me recibió en su laboratorio confiando desde el comienzo en mi trabajo, agradezco también a la Bq. Carolina Ponce quien fue mi principal pilar dentro del laboratorio, guiándome en las técnicas y decisiones experimentales desarrolladas. Al Dr. Patricio Madrid, quien como patólogo me enseñó a categorizar mis muestras y observar los cortes histológicos. Agradezco finalmente a la Bq. candidata a Doctorado Paola Pérez quien me ayudo a realizar el análisis estadístico de mis muestras.

BIBLIOGRAFIA

1. **Martin, W.J.II.** Pathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 8:356-357, 1993.
2. **Su, T.H. and W.J.Martin II.** Pathogenesis and host response in *Pneumocystis carinii* pneumonia. Ann. Rev. Med. 45:261-272, 1994.
3. **Hanano R., Kaufmann S.H.E.** *Pneumocystis carinii* and the immune response in disease. Trends in Microbiol. 6 (2):71-75, 1998.

4. **Vargas S., Ponce C., Hughes W., et al.** Association of primary *Pneumocystis carinii* infection and sudden infant death syndrome. Clin. Infect. Dis. 29:1489-1493, 1999
5. **Stagno S., Pifer L., Hugues W., Brasfield D., Tiller R.** *Pneumocystis carinii* pneumonia in young immunocompetent infants. Pediatr. 66:56-62, 1980.
6. **Dei-Cas E.** *Pneumocystis* infections: The iceberg?. Med. Microbiol. 38: 23-32, 2000.
7. **Ortona E., Visconti E., Barca S., et al.** Cellular and humoral response in *Pneumocystis carinii* spontaneously infected rabbits. J. Euk. Microbiol. 44(6):495, 1997.
8. **Ceré N., Polack B., Coudert P.** Improved rabbit model of *Pneumocystis carinii* pneumonia: induced infection in pneumocystis-free animals. APMIS. Suppl. 77(105):5-6, 1997.
9. **Aliouat E.M., Escamilla R., Cariven C., Vieu C., Mullet C.** Surfactant changes during experimental pneumocystosis are related to pneumocystis development. Eur. Respir. J. 11: 542-547, 1998.
10. **Stringer J.R.** The identity of *pneumocystis carinii*: not a single protozoan, but a diverse group of exotic fungi. Infect. Agents. Dis. 2:109-117, 1993.
11. **Murray P., Kobayashi G., Pfaller M., Rosenthal M.,** Microbiología Médica 2ª edición. Editorial Harcour Brace, 1990.
12. **Atochina E., Beers M., Scanlon S., Preston A., Beck J.** *P. carinii* induces selective alterations in component expression and biophysical activity of lung surfactant. Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol. 278:L599-L609, 2000.
13. **Phelps D.** Pulmonary surfact modulation of host-defense function. Appl. Cardiopulm. Pathol. 5: 221-229, 1995.
14. **Ballard P., Noguee L., Beers M., Ballard R., Planer B., Polk L., demello D., Moxley M., Longmore W.J.** Partial deficiency of surfact protein B in a compound heterozygote with a new mutations. Pediatrics. 96: 1046-1052, 1995.
15. **Korfhagen T., et al.** Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:9594-9599, 1996.
16. **Dichter J., Lundgren J., Nielsen T., Jensen B., Schattenkert J., Benfield T., Lawrence M., Shelhamer J.** *Pneumocystis carinii* in HIV-infected patients: effect of steroid therapy on surfactant level. Respir. Med. 93: 373-378, 1999.
17. **Ballard P., Noguee L., Beers M., Ballard R., Planer B., Polk L., demello D., Moxley M., Longmore W.J.** Partial deficiency of surfact protein B in a compound heterozygote with a new mutations. Pediatrics. 96: 1046-1052, 1995.
18. **Atochina E., Beck J., Scanlon S., Preston A., Beers M.** *Pneumocystis carinii* pneumonia alters expression and distribution of lung collectins SP-A and SP-D. J. Lab. Clin. Med. 137(6): 429-439, 2001.
19. **Phelps D., Rose R.** Increased recovery of surfactant protein A in AIDS-related Pneumonia. Am. Rev. Respir. Dis. 143: 1072-1075, 1991.
20. **Aliouat E., Escamilla R., Cariven C., Vieu C., Mullet C., Dei-Cas E., Prévost M.** Surfactant changes during experimental pneumocystosis are related to *pneumocystis* development. Eur Resp J 11:542-547, 1998.
21. **Limper A.H., Hoyte J.S., Standing J.E.** The role of alveolar macrophages in *Pneumocystis carinii* degradation and clearance from the lung. J. Clin. Invest. 99:2110-2117, 1997.
22. **Beers M.F., Atochina E.N., Preston A.M., Beck J.M.** Inhibition of lung surfactant protein B expression during *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice. J. Lab. Clin. Med. 133: 423-433, 1999.

MODULACIÓN SEROTONINÉRGICA DE LA ACTIVIDAD NEURONAL DEL BULBO OLFATORIO DE LA RATA

GABRIEL GARCÍA-HUIDOBRO LLORT¹, DRA. MARIA DE LA LUZ AYLWIN OSTALÉ².

RESUMEN

El bulbo olfatorio principal (BO) es la primera estructura de procesamiento de la vía olfatoria y recibe importantes proyecciones centrifugas provenientes del cerebro basal anterior. Dentro de estas proyecciones la vía centrifuga serotoninérgica, originada en los núcleos del rafe, cumple un rol fundamental en la modulación de procesos de aprendizaje y de discriminación olfatoria. En este estudio, caracterizamos la respuesta de neuronas Mitrales/Penacho (M/P) a la superfusión de serotonina (5-HT) 100mM usando la técnica de *patch clamp* en rebanadas de BO de ratas. La frecuencia de descarga neuronal (FDN) fue determinada en condiciones basales y en presencia de 5-HT en registros extracelulares e intracelulares. Nuestros resultados muestran la presencia de dos poblaciones neuronales distintas que respondieron en forma opuesta al neurotransmisor. En los registros extracelulares, 11 células de un total de 23 aumentaron en forma estadísticamente significativa la FDN respecto del nivel basal ($p=0,0013$; prueba t) y las restantes 12 células disminuyeron su FDN ($p=0,00005$). En los registros intracelulares encontramos un efecto similar donde 16 de 29 células aumentaron su FDN ($p=0,0005$), mientras que las 13 restantes mostraron una disminución de ésta ($p=0,0002$). Estos resultados sugieren que 5-HT podría activar diferencialmente receptores de tipo excitatorios o inhibitorios expresados en distintas poblaciones de células M/P con el consecuente efecto excitatorio o inhibitorio en estas células. Como explicación alternativa, debemos considerar la activación de receptores serotoninérgicos expresados en interneuronas del BO que modulan en ultima instancia una inhibición sobre las neuronas M/P.

15 de Julio de 2005. Proyecto Fondecyt N°1000901

Palabras Claves: bulbo olfatorio, serotonina, neuronas M/P

INTRODUCCIÓN

La función olfatoria cumple un rol fundamental en la gran mayoría de los organismos vivos. En vertebrados superiores el olfato es empleado en conductas de apareamiento, búsqueda de alimento, marcaje de territorio, identificación de individuos, etc. (1), así como en respuestas conductuales más complejas, como lo es el aprendizaje (2).

En la actualidad, la mayoría de los estudios publicados acerca de la función, conectividad neuronal y procesamiento de las señales olfatorias han considerado casi exclusivamente la transferencia unidireccional de la actividad sensorial, sin embargo, existen etapas intermedias de procesamiento de estas señales. De hecho, en el bulbo olfatorio (BO), (considerado la primera estación de relevo de la información olfatoria), existe una compleja red de interneuronas que reciben importantes proyecciones de vías "descendentes" o centrifugas provenientes de diferentes regiones del Sistema Nervioso Central (SNC). Estas son: la vía serotoninérgica, proveniente de los núcleos del rafe; la vía noradrenérgica, proveniente del locus coeruleus y una vía colinérgica, proveniente del cerebro basal anterior (3). Se ha postulado que estas vías centrifugas funcionarían como un "interruptor" del paso de las señales olfatorias a los centros olfatorios superiores (4). La evidencia experimental sugiere

que las vías centrifugas participarían activamente en los procesos de discriminación olfatoria, aprendizaje y plasticidad de las respuestas a odorantes. No obstante la relevancia que tienen estas vías en la percepción que se genera a nivel del SNC, los mecanismos que subyacen a su acción son, en su mayoría, desconocidos (2, 3).

Con respecto a la vía serotoninérgica, estudios conductuales han demostrado una clara evidencia de su relevancia en la modulación de señales olfatorias, específicamente aquellas relacionadas con el aprendizaje y la discriminación olfatoria (2, 6, 7). Pese a esto, existe poca información sobre algunos aspectos funcionales y moduladores de esta vía, siendo la menos estudiada de las tres.

Para determinar la acción de la serotonina (5-HT) en los distintos tipos celulares del BO de la rata, se requiere de la caracterización de los efectos serotoninérgicos tanto a nivel de la excitabilidad neuronal, como a nivel de la transmisión sináptica entre las neuronas del BO.

Este estudio pretende determinar los principales efectos de la 5-HT sobre una población celular del BO de ratas, y postular un mecanismo de acción que explique cómo este neurotransmisor modularía la respuesta olfatoria a través de

¹ Estudiante 4° año Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

la alteración de la excitabilidad neuronal de dichas células, todo dentro de un contexto de circuito neuronal interconectado, que constituye el BO.

Para tales efectos estudiamos, mediante la técnica *Patch Clamp* en rebanadas de BO de rata, la frecuencia de potenciales de acción o frecuencia de descarga neuronal (FDN) en ausencia y presencia de 5-HT mediante dos modalidades de registro, un modo extracelular y otro modo intracelular.

Los estudios planteados en este proyecto y sus resultados buscan contribuir, en particular, a entender algunos de los mecanismos de acción moduladora que tendría la vía centrífuga serotoninérgica en la dinámica de la actividad neuronal del BO de la rata, para así comprender más profundamente los cambios que ocurren a este nivel de procesamiento de la señal olfatoria. Esto contribuiría a entender de mejor manera la generación de los fenómenos perceptuales, de codificación, discriminación y aprendizaje de conductas iniciadas por estimulación olfatoria.

HIPOTESIS

Proponemos que 5-HT tiene efectos opuestos de tipo excitatorio y/o inhibitorio sobre las neuronas mitrales y en penacho (M/P) del BO, dependiendo de los tipos de receptores que allí se encuentren y de la predominancia de determinadas poblaciones de estos en las células del BO.

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar los efectos de la 5-HT sobre la actividad de las neuronas del BO in situ, que tienen relevancia en la modulación y el procesamiento de las señales olfatorias.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Determinar la respuesta (FDN) de las neuronas mitrales y en penacho presentes en el BO durante la perfusión de 5-HT, en experimentos de registro de actividad extracelular, en la modalidad de fijación de voltaje (*V-Clamp*) y en experimentos de registro intracelular, en modalidad de fijación de corriente (*I-Clamp*).

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología que se utilizó para examinar los efectos de la vía centrífuga serotoninérgica en la actividad electrofisiológica de las neuronas del BO, fue la técnica de *patch clamp* en rebanadas de BO de rata, asociada a un sistema de visualización de tejido, consistente en una combinación de luz infrarroja y videomicroscopía de contraste diferencial de interferencia u óptica Nomarski (Differential Interference Contrast, DIC-Nomarski).

ANIMALES

En todos los experimentos se utilizaron ratas juveniles, Sprague-Dawley, machos, de entre 3 a 5 semanas de edad, obtenidas del bioterio de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

EQUIPOS y MONTAJE

-Montaje: Se utilizó un Microscopio Nikon modelo eclipse E 600 de platina fija, no invertido, dotado de un objetivo de alta amplificación (40X de inmersión en agua) y óptica Nomarski. Se utilizó un Micromanipulador que permitió movimientos verticales y horizontales

en rangos de unos pocos micrómetros. La rebanada se fijó en una cámara de registro continuamente perfundida con líquido cerebro espinal artificial (LCEA) oxigenado a un flujo de 2 – 3 ml/minuto.

-Equipos de Amplificación: Se utilizó un Preamplificador (Axon Instrument) con una ganancia de X 1/100. Conectado directamente al electrodo. Un Amplificador (Axopatch 1 D de Axon Instrument) con ganancia de 0.5 a 100 X. Cámara de Video DAGE-DMI.

-Dispositivos de registro: Osciloscopio, PC compatible con tarjeta análogo-digital, Software pClamp5 y pClamp6. (Axon Instruments).

-Sistema de perfusión: La 5-HT y las soluciones fueron aplicadas a las rebanadas por un sistema de perfusión por gravedad, consistente en tubos graduados, bajadas de suero y llaves de tres pasos que confluían a la cámara de registro.

-Electrodos: Micropipetas de vidrio borosilicato; *Puller* o estirador de micropipetas (Sutter instrument) generando electrodos de aproximadamente 1 mm de diámetro en la punta y con resistencias del orden de entre los 3 a 10 MW.

SOLUCIONES

-Solución Extracelular: Se utilizó fluido cerebro espinal artificial (FCEA). La composición de éste fluido fue (en mM): 125 NaCl, 3 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 1,25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃ y 10 Glucosa (8). Para ajustar el pH entre 7 – 7,5, se mantuvo la solución en burbujeo continuo con una mezcla de O₂ y CO₂, a concentraciones de 95% y 5% respectivamente.

-Solución Intracelular: Esta solución contiene un buffer de pH (10 mM HEPES, ajustado a pH 7,4), un buffer de Calcio (1.1 mM EGTA), Mg-ATP para mantener las ATPasas activas (3mM), y Na-GTP para procesos que involucren proteínas G (0.3 mM). Para el modo de fijación de corriente (*I-clamp*): se utilizó una solución intracelular de KCl que contiene, además de los buffers nombrados, los siguientes componentes (en mM): 140 KCl, 5 NaCl, 1 MgCl₂, y 0.1 CaCl₂.

REBANADAS DE BO DE RATA

Para su obtención, las ratas fueron sacrificadas por decapitación mediante el uso de guillotina. Inmediatamente después se realizó la craneotomía, se quitaron las meninges y se eliminó el encéfalo con el fin de exponer los bulbos olfatorios en el piso de la fosa craneal anterior.

Luego, ambos BO fueron extirpados cuidadosamente y sumergidos en una placa petri con FCEA, la cual fue oxigenada mediante un tubo que contenía una mezcla de O₂ y CO₂ en la proporción ya descrita. Cada BO fue adherido a un bloque de agarosa 2%, con el fin de situarlo en una cámara de corte, en un vibrátomo, y determinar su plano de sección. Las rebanadas fueron de aproximadamente 300 µm de espesor. Finalmente, las rebanadas así obtenidas se incubaron por 45 – 60 minutos a 35°C, para su recuperación, previa a la experimentación.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Los registros de la actividad eléctrica se realizaron en dos configuraciones; 1) configuración de registro extracelular (*cell-attached*) en fijación de voltaje (*V-clamp*) y; 2) configuración de registro intracelular (*whole-cell*) en fijación de corriente (*I-clamp*).

En ambas configuraciones se registró la frecuencia de descarga neuronal (FDN) en: 1) Condición basal de la neurona en un periodo de tiempo fijo para todos los experimentos de 40 segundos; 2) durante la aplicación de 5-HT (40 seg.) y; 3) en la recuperación o lavado con FCEA (40 seg.).

Se midió la modificación de la FDN, medida en Hz, comparándola con la actividad basal como control. La recuperación o lavado se tomó como un criterio de validación del experimento.

Tanto las células mitrales como las neuronas en penacho fueron identificadas sobre la base de su morfología y ubicación en las distintas capas existentes en el BO (1) (Figura 1).

ANÁLISIS DE DATOS

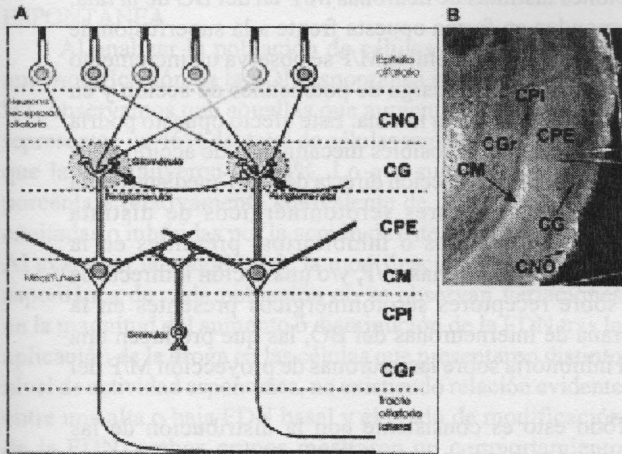
Los datos obtenidos se analizaron usando el software pClamp6. El conteo de las espigas se realizó a través de la exportación de los

datos a un archivo de texto para después someterlo a un programa de conteo de espigas descrito en *Visual Basic* de aplicaciones (VBA) en plataforma excel.

Se obtuvieron promedios de frecuencia de descargas en cada caso, los que fueron comparados frente a la actividad basal de la misma neurona que se registró en ese momento.

Para el análisis comparativo de los valores promedio de las FDN en las diferentes condiciones experimentales, se utilizó la prueba *t de student* de una cola para variables asociadas, otorgando un nivel de confianza de 95% y considerando como alta significación estadística una $p < 0,001$.

Figura 1. Estructura del BO.



A: Esquema que ilustra las capas del BO y sus principales tipos neuronales. **B:** Fotografía de microscopía de contraste diferencial de interferencia (DIC-Nomarski) con iluminación infrarroja de una rebanada de BO de aproximadamente 300 μ m de grosor, en la que se indican las capas del BO: CNO: capa del nervio olfatorio; CG: capa glomerular; CPE: capa plexiforme externa; CM: capa mitral

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN CELULAR NÚMERO y UBICACIÓN

Durante el curso de este estudio los registros, tanto extracelulares como intracelulares, se llevaron a cabo en un total de 272 células del tipo mitral o penacho (M/P), identificadas en base a su morfología y ubicación (1, 3, 9). De las 272 células sólo 52 registros fueron exitosos, lo que representa una tasa de éxito cercana al 19%.

Los criterios de éxito fueron los siguientes:

- Obtención de sellos con una resistencia igual o mayor a un GigaOhm (GOhm).
- Estabilidad del registro durante todo el experimento.
- Recuperación de la actividad basal de las neuronas tras la superfusión con FCEA.

Las neuronas registradas, se localizaron principalmente en la Capa Mitral (CM) y Capa Plexiforme Externa (CPE).

FORMA Y TAMAÑO

Se observó una diversidad morfológica caracterizada por el predominio de células con aspecto piriforme. Los porcentajes obtenidos son: Piriformes (57%); Piramidales (10%); Redondas (10%) y sin forma definida (23%).

El diámetro promedio del soma neuronal fue de 20,75 μ m \pm 4,79 (promedio \pm desviación estándar). El rango de tamaño de las neuronas registradas varió entre los 8,75 a los 30,62 μ m de largo (20,75 \pm 4,79 μ m) y los 8,75 a los 13,12 μ m de ancho (13,69 \pm 4,34 μ m).

ACTIVIDAD BASAL ESPONTÁNEA

La frecuencia de descarga basal medida en Hz (espigas por segundo) varió desde los 0 Hz hasta los 5,025 Hz (n=52). Mientras que las restantes 11 neuronas (registros extracelulares), incrementaron su FDN promedio desde 1,85 \pm 1,33 Hz (rango de 0 a 4,675 Hz) en condición basal, hasta 8,89 \pm 6,49 Hz (rango de 2,1 a 22,75 Hz) en presencia de 5-HT.

Ambos efectos sobre la FDN promedio son estadísticamente significativos por la prueba *t de student* para variables asociadas ($p < 0,001$, Figura 2).

DISMINUCIÓN DE LA FDN EN UN GRUPO DE NEURONAS M/P EN PRESENCIA DE 5-HT

Un total de 28 neuronas disminuyeron su FDN tras la aplicación de 5-HT, correspondientes al 53,85% del total de células exitosamente registradas. De estas, obtuvimos 16 células en experimentos intracelulares y 12 células en experimentos extracelulares.

En los registros intracelulares las frecuencias promedio variaron de 1,6 \pm 1,37 Hz (rango de 0,05 a 5,025 Hz) en condición basal, hasta 0,3 \pm 0,7 Hz (rango de 0 a 2,37 Hz) en presencia de 5-HT. Mientras que en los registros extracelulares estas frecuencias promedio disminuyeron desde 2,08 \pm 1,24 Hz (rango de 0,6 a 4,68 Hz) en condición basal, hasta 0,96 \pm 0,8 Hz (rango de 0,2 a 2,45 Hz) en presencia de 5-HT. Ambas disminuciones en la FDN promedio arrojaron una alta significancia estadística por prueba *t de student* para variables asociadas ($p < 0,001$, Figura 3).

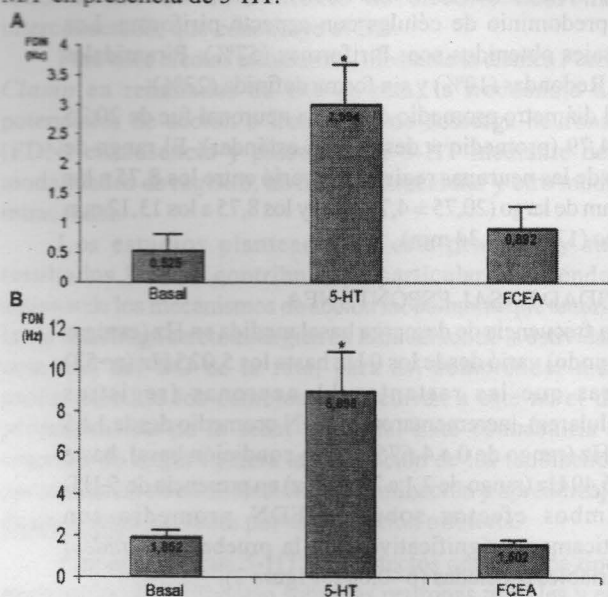
DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue establecer la acción de la 5-HT, el neurotransmisor de la vía centrifuga serotoninérgica sobre la excitabilidad de las neuronas M/P del BO de la rata.

Mediante el registro electrofisiológico de las acciones de la 5-HT en una preparación *in vitro*, como son las rebanadas de BO de rata, pudimos determinar las acciones de este neurotransmisor en la FDN de éstas células.

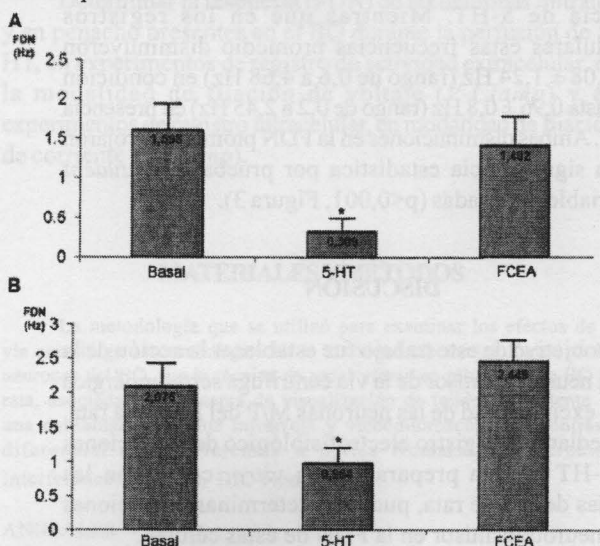
Los registros considerados para el análisis estadístico corresponden sólo a aquellos que cumplieron con los criterios de "registros exitosos" consistentes en una resistencia del sello igual o mayor a 1 GigaOhm, sellos estables durante el registro y recuperación de la actividad basal tras el lavado con FCEA. Hay que considerar que de los 272 registros totales realizados sólo 52 cumplieron con

Figura 2. Aumento de la FDN en un Grupo de Neuronas M/P en presencia de 5-HT.



A, modalidad de registro intracelular; y **B**, extracelular. En la abscisa se muestran las tres condiciones experimentales: BASAL; 5-HT 100mM; y FCEA. En la ordenada se muestra la FDN promedio en espigas/segundo (Hz). Los valores se presentan como promedios y la barra corresponde al error estándar. * $p < 0,001$.

Figura 3. Disminución de la FDN en un Grupo de Neuronas M/P en presencia de 5-HT.



A, modalidad de registro intracelular; y **B**, extracelular. En la abscisa se muestran las tres condiciones experimentales: BASAL; 5-HT 100mM; y FCEA. En la ordenada se muestra la FDN promedio en espigas/segundo (Hz). Los valores se presentan como promedios y la barra corresponde al error estándar. * $p < 0,001$.

estas condiciones, arrojando una tasa de éxito cercana al 19%, todo el resto corresponde a experimentos en donde las neuronas no poseían un potencial de membrana (Vm) estable o por artefactos mecánicos o al intentar registrar intracelularmente se perdía el sello entre el electrodo y la membrana. Esta tasa de rendimiento no incluye los intentos fallidos por lograr inicialmente un sello, aumentando en mayor medida la tasa de “fracasos”, lo que sugiere que esta es una técnica muy versátil y sofisticada, pero de bajo rendimiento.

Con esta técnica demostramos la presencia de dos poblaciones distintas de neuronas M/P en del BO de la rata, que responden en forma opuesta frente a la superfusión de 5-HT. En un grupo de células M/P se observa un incremento en la frecuencia de descarga de potenciales de acción y en otro un decremento de la misma. Este efecto opuesto podría ser explicado por dos posibles mecanismos de acción de la 5-HT sobre el BO: una acción directa de 5-HT mediada por la activación de receptores serotoninérgicos de distinta naturaleza (excitatorios o inhibitorios) presentes en la membrana de las neuronas M/P, y/o una acción indirecta de 5-HT sobre receptores serotoninérgicos presentes en la membrana de interneuronas del BO, las que producen una acción inhibitoria sobre las neuronas de proyección M/P del BO.

Todo esto es consistente con la distribución de las fibras serotoninérgicas en el BO, el tipo, ubicación y fisiología de receptores serotoninérgicos y con la organización morfofuncional del circuito neuronal del BO. (1, 3, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16).

LOCALIZACIÓN, FORMA Y TAMAÑO DE NEURONAS M/P

Tanto la localización como las características morfológicas utilizadas para identificar las células M/P, fueron consistentes con clasificaciones morfológicas previas (1, 3, 9). Las células mitrales tienen sus cuerpos celulares ubicados principalmente en la CM, existiendo también algunos en la CPE, denominándose células mitrales desplazadas. Las células en penacho, en cambio, se ubican solamente en la CPE (1). Las células registradas en este estudio fueron principalmente mitrales, ya que preferentemente se registraron neuronas ubicadas en la CM, pero en algunos casos también se registraron células de la CPE, correspondientes a células mitrales desplazadas o en penacho. La metodología utilizada en este estudio no permitió distinguir entre células mitrales o en penacho, por lo tanto, ambas fueron consideradas como una sola población de células M/P.

En cuanto a la forma de estas neuronas, la mayoría de los estudios morfológicos en tejidos teñidos las definen como células con forma piramidal (1, 9). En este trabajo encontramos un 10% de neuronas con una forma notoriamente piramidal y un 57% de las células con una morfología piriforme, que claramente corresponden al tipo de células mitrales o en penacho. Esta diferencia puede deberse a que la descripción morfológica fue hecha con preparaciones de tejido fijado y no de tejido vivo.

Respecto al tamaño del soma neuronal, encontramos que el diámetro promedio de las neuronas M/P fue de $20,75 \pm 4,79$ μ m, similar al de estudios previos realizados en cortes de tejido fijado, en que las células mitrales de mamíferos presentaron un cuerpo neuronal de entre 15-30 μ m de diámetro y las células en penacho un soma de entre 15-20 μ m de diámetro (1). Por lo tanto, concluimos que los factores morfológicos de forma, tamaño y localización de las células registradas en este estudio se corresponden a las de las células M/P del BO de rata.

ANÁLISIS DEL EFECTO DE 5-HT SOBRE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA

Al analizar la población de células que sí mostraron una modificación de la FDN espontánea en presencia de 5-HT, observamos que aquellas que aumentaron su actividad representan un 46% del total de células registradas y aquellas que la disminuyeron un 54%. Lo que sugiere que hay un porcentaje relativamente equivalente de neuronas que son excitadas o inhibidas por la acción de este neurotransmisor. Al examinar la magnitud de la modificación en la descarga espontánea de cada población no se observan variaciones en la magnitud del aumento o disminución de la FDN tras la aplicación de la droga en las células que presentaron distinto nivel de actividad espontánea, no existiendo relación evidente entre una alta o baja FDN basal y el grado de modificación de la FDN; ambos grupos mostraron un comportamiento independiente de excitación o inhibición frente a la aplicación de 5-HT. Sin embargo, algunas células mostraron un efecto de 5-HT marcado, mientras que otras variaron su frecuencia de descarga en forma más leve. No obstante, estos valores no resultaron ser estadísticamente significativos ($p=0,0378$; prueba t, $n=24$).

De la misma manera, la disminución en la FDN promedio tras la aplicación de 5-HT fue de $3,65 \pm 1,5$ veces el valor basal. Se aprecia nuevamente una disminución más marcada de la frecuencia de disparos en los registros intracelulares (5,15 veces el valor de la basal) que en aquellos extracelulares (2,15 veces el valor de la basal), pero ahora de manera estadísticamente significativa ($p=0,0003$; prueba t, $n=29$). Esta diferencia probablemente se deba a un efecto producido por el tipo de registro intracelular, en donde se lavan y pierden factores citosólicos claves como segundos mensajeros posiblemente involucrados en la transducción de señales gatilladas por 5-HT, a diferencia de los experimentos extracelulares en que el medio intracelular permanece intacto.

EL EFECTO DE 5-HT ES COMPLETAMENTE REVERSIBLE

En las células que sufrieron una modificación de su FDN espontánea posterior a la aplicación de 5-HT se observó una recuperación de la misma después de un período de superfusión con FCEA de aproximadamente 2,5 a 5 minutos. Los valores promedio de las FDN basal versus aquellos de lavado con FCEA de los distintos grupos neuronales no mostraron diferencias estadísticamente significativas a la prueba t de Student ($p=0,261$, $n=52$). Solo en un experimento extracelular y en uno intracelular no se logró la recuperación

total de la célula dentro de ese tiempo, excluyéndose del estudio. Estos resultados permiten concluir que el efecto de 5-HT es totalmente reversible.

POSIBLES EXPLICACIONES DE LOS EFECTOS OPUESTOS DE 5-HT SOBRE LA EXCITABILIDAD DE LAS CELULAS M/P.

Nuestros resultados nos permiten deducir la presencia de dos tipos neuronales de distribución y morfología similar, que responden en forma opuesta a la aplicación de 5-HT. Estos resultados pueden deberse a una acción directa de 5-HT mediada por la activación de receptores serotoninérgicos excitatorios o inhibitorios presentes en las neuronas M/P y/o a una acción indirecta de 5-HT sobre receptores serotoninérgicos presentes en interneuronas (IN) periglomerulares o granulares del BO, las que a su vez, producen una acción inhibitoria sobre la FDN de las neuronas de proyección M/P del BO. De esta manera, la 5-HT generaría últimamente una inhibición en estas neuronas o bien una inhibición de esta inhibición y por lo tanto una excitación final.

La preponderancia de estos efectos directos o indirectos dependerá de la predominancia diferencial de receptores de 5-HT en una u otra población celular.

La evidencia previa de la activación de receptores de 5-HT en células del BO es prácticamente nula, el único estudio disponible de la acción de 5-HT consistió en un experimento realizado en ratas anestesiadas, en donde se inyectó mediante iontoforesis 5-HT en el BO, demostrándose una acción inhibitoria sobre la descarga espontánea de las células mitrales (17).

En el BO se han descrito 4 tipos de receptores serotoninérgicos diferentes: 5-HT_{1A} (11), 5-HT_{2A/2C} (12) y 5-HT₃ (13) distribuidos preferentemente en la CG y CGr. Sin embargo, las consecuencias de su activación en el BO no han sido determinadas. Estudios electrofisiológicos y bioquímicos en otras regiones del encéfalo han caracterizado la respuesta neuronal de la activación diferencial de estos receptores (10, 18, 19). Así, la consecuencia de esta activación sería excitatoria (5-HT₃), inhibitoria (5-HT_{1A}) o ambas (5-HT_{2A/2C}), dependiendo de la ruta de transducción acoplada a ellos.

Por otra parte, observaciones experimentales muestran que las fibras centrífugas serotoninérgicas tienen una importante distribución terminal en IN inhibitorias en diversas regiones encefálicas de la rata, como la corteza cerebral (20), la corteza visual (21), el tálamo (18), la amígdala basolateral (22) y el núcleo del rafe dorsal (23). En el BO la vía serotoninérgica se distribuye preferentemente en la Capa Glomerular (CG) y secundariamente en la capa Granular (CGr) y capa plexiforme interna (CPI) (3). Por lo tanto, es probable que sus receptores también se encuentren primariamente en IN periglomerulares y secundariamente en IN granulares, lo cual sugiere una acción de 5-HT fundamentalmente indirecta a nivel de las neuronas M/P del BO. Incluso si no existieran receptores serotoninérgicos en células mitrales el efecto observado en este estudio podría estar explicado sólo a

través de IN, debido al tipo de conectividad recíproca dendrodendrítica que presenta el BO (15, 16, 24, 1). De hecho, gracias a este tipo de circuito neuronal, se ha observado que también se producen respuestas complejas en las células M/P, tras la estimulación por odorantes en las neuronas receptoras olfatorias (NRO; 25, 26). De esta manera, las neuronas M/P bajo ciertas circunstancias, responden ya sea con una inhibición seguida por una excitación, o bien, con una excitación seguida de un período de inhibición (27). Este circuito bulbar interconectado permite que en todo el BO la respuesta también consista en una secuencia excitatoria e inhibitoria con frecuencia similar a la de las neuronas M/P. En definitiva, este tipo de conectividad neuronal, sumado a los distintos tipos de receptores serotoninérgicos descritos en el BO, podrían explicar los resultados opuestos que hemos encontrado en neuronas M/P frente a la aplicación de 5-HT.

Una explicación alternativa de los efectos opuestos de la 5-HT en las neuronas de proyección, aunque menos probable, podría atribuirse al efecto de la técnica de corte utilizada en este estudio, ya que podría generar alteración de la conectividad neuronal de las células M/P en forma diferencial. El hecho de que cada célula mitral se proyecte a un glomérulo (28, 29) determina que es probable que en el corte este glomérulo se pueda eliminar sinápticamente de la neurona M/P y así esta perder una importante zona de modulación como es la CG, donde se distribuye principalmente la vía serotoninérgica y donde existe una gran inhibición de las interneuronas periglomerulares sobre las células M/P, generando un desbalance entre excitación e inhibición en un grupo de células de proyección.

Por otra parte el efecto múltiple y opuesto de serotonina no es exclusivo del BO, estudios realizados en otras zonas del SNC han descrito un efecto similar de 5-HT en diversos tipos neuronales, es así como Andrade (1987) (30) reportó la acción de 5-HT en células piramidales de la región CA1 del hipocampo de ratas *in vitro* mediante el uso de 5-HT, agonistas y antagonistas específicos y caracterizó las respuestas evocadas como bifásicas, consistentes en una hiperpolarización, mediada por receptores 5-HT_{1A}, seguida de una despolarización de larga duración atribuida a una disminución de la conductancia al K⁺, no determinando si es mediada por otro o el mismo receptor.

En la corteza cerebral de ratas se han encontrado diversas acciones de 5-HT en neuronas piramidales e interneuronas. Un estudio de Zhou y Hablitz (1999) determinó, mediante el uso de la técnica de *patch clamp*, que pulsos cortos de 5-HT inducen inhibición de estas neuronas, mediante la activación de receptores 5-HT_{2A}, mientras que pulsos prolongados resultan en excitación de las mismas. En nuestros experimentos todos los pulsos pueden considerarse similares.

En un estudio más reciente, Liu y col. (2000) caracterizaron las corrientes sinápticas inducidas por 5-HT en células del núcleo del rafe dorsal (origen de la vía centrífuga serotoninérgica), determinando un aumento dosis dependiente de la frecuencia de corrientes postsinápticas inhibitorias, las cuales son bloqueadas por antagonistas de

receptores GABA_A (bicuculina 10 mM) y por bloqueadores de canales de Na⁺, sugiriendo que 5-HT podría haber incrementado la actividad de interneuronas GABAérgicas. Mediante el uso de agonistas y antagonistas específicos determinaron que estos efectos serotoninérgicos eran mediados vía receptores 5-HT_{2A} y en menor grado 5-HT_{2C}.

Estos posibles mecanismos de acción directa o indirecta de la 5-HT no se han estudiado aún para el BO y es probable que siga un patrón similar a lo que ocurre en otras regiones del SNC. Una forma de determinar los posibles mecanismos de los resultados obtenidos en este estudio es la caracterización de los receptores de 5-HT en las distintas células del BO y la consecuencia electrofisiológica de su activación, para esto, los futuros experimentos deberían considerar, primero, el aislamiento sináptico de las neuronas M/P del BO mediante el empleo de bloqueadores de receptores de los neurotransmisores GABA y Glutamato y, segundo, el uso de agonistas y antagonistas específicos de los diferentes tipos de receptores de 5-HT, para así poder identificar los receptores que median las respuestas caracterizadas en este trabajo.

CONCLUSIONES

Sobre la base de las evidencias expuestas en este trabajo, concluimos que las consecuencias de la activación de receptores serotoninérgicos en el BO, determinadas a través de la técnica *patch clamp* en rebanadas de BO de rata, contemplan efectos opuestos (tanto excitatorios como inhibitorios) en dos poblaciones distintas de neuronas de proyección M/P. Una población de células aumenta su frecuencia de descarga de potenciales de acción y otra población celular disminuye dicha frecuencia en presencia de 5-HT.

Consideramos que los resultados presentados en este trabajo son un aporte importante en la comprensión de los efectos fisiológicos que tendría la vía serotoninérgica en las neuronas de proyección del BO, en el contexto de circuito neuronal real, contribuyendo a la determinación de los posibles efectos moduladores de esta vía en la actividad neuronal del BO de la rata. Así mismo, nuestros resultados nos permiten postular los posibles mecanismos que dan origen a los distintos comportamientos de las neuronas M/P frente a 5-HT. Estos mecanismos propuestos apuntan a efectos directos a través de la activación de distintos receptores serotoninérgicos en las neuronas M/P del BO y/o a efectos indirectos, a través de la activación de receptores de 5-HT en interneuronas inhibitorias sobre las neuronas de proyección M/P.

Futuros experimentos deberán estar orientados a dilucidar estos mecanismos de acción de 5-HT sobre las neuronas de proyección del BO y así poder determinar cuales son los cambios que ocurren en este nivel de procesamiento de la señal olfatoria y definir concretamente una posible modulación centrífuga serotoninérgica, determinante en el proceso de percepción olfatoria.

BIBLIOGRAFIA

1. **Shepherd G.M.** (1998) The synaptic organization of the brain. (4^o Ed.) New York, U.S.A.: Oxford University Press. Ch. 5. pp:159-203.
2. **McLean J.H., A. Darby-King, R.M. Sullivan and S.R. King** (1993). Serotonergic influence on olfactory learning in neonate rat. *Behav. Neural Bio.* 60:152-162.
3. **Shibley M.T. and Ennis M** (1996) Functional Organization of Olfactory System. *J. Neurosci.* 30(1):123-176.
4. **Jiang M., E.R. Griff, M. Ennis, L.A. Zimmer and M.T. Shibley.** (1996). Activation of locus coeruleus enhances the responses of olfactory bulb mitral cells to weak olfactory nerve input. *J. Neurosci.* 16:6319-6329.
5. **Moriizumi T., Tsukatani T., Sakashita H. & Miwa T.** (1994) Olfactory disturbance induced by deafferentation of serotonergic fibers in the olfactory bulb. *Neurosci.* 61:733-738.
6. **McLean J.H., Darby-King A., Hodge E.** (1996) 5-HT₂ receptor involvement in conditioned olfactory learning in the neonate rat pup. *Behav. Neurosci.* 110(6):1426-34
7. **Price T.L., Darby-King A, Harley C.W., McLean J.H.** (1998) Serotonin plays a permissive role in conditioned olfactory learning induced by norepinephrine in the neonate rat. *Behav. Neurosci.* 112(6):1430-1437.
8. **Castillo P. E., Carleton A., Vincent J-D. and Lledo P-M.** (1999) Multiple and Opposing Roles of Cholinergic Transmission in the Main Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* 19(21):9180-9191.
9. **Mori K.** (1987) Membrane and Synaptic properties of identified neurons in the olfactory bulb. *Prog. in neurobiol.* 29:275-320.
10. **Barnes NM, Sharp T.** (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology.* 1999 Aug;38(8):1083-152.
11. **Pompeiano M., Palacios J.M. and Mengod G** (1992) Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: Correlation with receptor binding. *J. Neurosci.* 12:440-453.
12. **Morilak D.A., Garlow S.J. & Ciaranello R.D.** (1993) Immunocytochemical localization and description of neurons expressing serotonin 2 receptors in rat brain. *Neurosci.* 54:701-717.
13. **Gehlert D.R., Gaclenheimer S.L., Wong D.T. and Robertson D.W.** (1991) Localization of 5-HT₃ receptors in the rat brain using [3H]LY278584. *Brain Res.* 553:149-154.
14. **Berkowicz D.A., P.Q. Trombley and G.M. Shepherd.** (1994). Evidence for glutamate as the olfactory receptor cell neurotransmitter. *J Neurophysiol.* 71:2557-2561.
15. **Cotman C.W., D.T. Monaghan, O.P. Ottersen and J. Storm-Mathisen.** (1987). Anatomical organization of excitatory amino acids receptors and their pathways. *Trends Neurosci.* 10:273-280.
16. **Ribak C.E., J.E. Vaughn, K. Saito, R. Barber & E. Roberts.** (1977) Glutamate decarboxylase localization in neurons in the olfactory bulb. *Brain Res.* 126:1-18.
17. **Bloom FE y Costa E.** (1971). The effects of drugs on serotonergic nerve terminals. *Adv Cytoparmacol.* 1971 May;1:379-95.
18. **Andrade R.** (1998) Regulation of membrane excitability in the central nervous system by serotonin receptor subtypes. *In: Advances in Serotonin receptor research.* *Ann.of N.Y. Acad. of Sci.* 861:190-203.
19. **North R.A. and N. Uchimura.** (1989). 5-Hydroxytryptamine acts at 5-HT₂ receptors to decrease potassium conductance in rat nucleus accumbens neurons. *J. Physiol.* 417:1-12.
20. **Zhou FM, Hablitz JJ.** (1999). Activation of serotonin receptors modulates synaptic transmission in rat cerebral cortex. *J.Neurophysiol.* 1999 Dec;82(6):2989-99.
21. **Xiang Z, Prince DA.** (2003). Heterogeneous actions of serotonin on interneurons in rat visual cortex. *J Neurophysiol.* 2003 Mar; 89(3): 1278-87.
22. **Rainnie D.** (1999). Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat basolateral amygdala. *J.Neurophysiol.* Jul;82(1):69-85.
23. **Liu R., Jolas T., Aghajanian G.** (2000). Serotonin 5-HT₂ receptors activate local GABA inhibitory inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. *Brain Res.* 873:34-18.
24. **Martin J. H.** (1999) *Neuroanatomía.* (2^o Ed.) PRENTICE HALL, Madrid, España. Cap. 2. pp:234-240.
25. **Aroniadou-Anderjaska V., M. Ennis and M. T. Shibley.** (1997). Glomerular synaptic responses to olfactory nerve input in rat olfactory bulb slices. *Neurosci.* 79:425-434.
26. **Hamilton K. A. and J. S. Kauer** (1985). Intracellular potentials of salamander mitral/tufted neurons in response to odor stimulation. *Brain Res.* 338:181-185.
27. **Wellis D. P. and J. W. Scott** (1990). Intracellular responses of identified rat olfactory bulb interneurons to electrical and odor stimulation. *J.Neurophysiol.* 64:932-947.
28. **Ressler K. J., S. L. Sullivan and L. B. Buck** (1994) Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* 79:1245-1255.
29. **Vassar R., S. K. Chao, R. Sitcheran, J. M. Nuñez, L. B. Vosshall and R. Axel** (1994). Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* 79:981-991.
30. **Andrade R and Nicoll RA.** (1987). Pharmacologically distinct actions of serotonin on single pyramidal neurones of the rat hippocampus recorded in vitro. *J.Physiol.* 394:99-124.

EXPRESIÓN DE RECEPTORES ESFEROIDALES Y COACTIVADORES EN ENDOMETRIOS OBTENIDOS DE PACIENTES CON SD. DE OVARIO POLIQUÍSTICO. POTENCIALES CONSECUENCIAS EN EL DESARROLLO DE HIPERPLASIA ENDOMETRIAL

NATALIA ITURAIN M¹, NATALIA SILVA A¹, DRA. MARGARITA VEGA², DR. FERNANDO GABLER², ALEJANDRA VILLAVICENCIO².

RESUMEN

Las mujeres que padecen SOP presentan alto riesgo de desarrollar hiperplasia endometrial. Esto puede evidenciarse a través de factores de transcripción como los receptores esteroidales, RA y REá, cuyas acciones están influenciadas por co-reguladores. Lo anterior conduce a un control diferente de la expresión génica, regulando el crecimiento y la diferenciación endometrial. Objetivo: Evaluar en endometrios de mujeres SOP si la expresión de RA, REá y el co-activador AIB1 se relaciona con el desarrollo de hiperplasia endometrial. Metodología: Se determinó la expresión génica (RT-PCR) de RA y REá, y la expresión proteica (IHQ) de RA, REá y AIB1, en endometrios obtenidos de mujeres normales durante la Fase Proliferativa (FP) (EN, n = 6), endometrios de pacientes SOP (ESOP, n = 6), endometrios de mujeres SOP con hiperplasia endometrial (ESOPH, n = 6), y endometrios no SOP con hiperplasia (EH, n = 6); previo consentimiento escrito y aprobado por el Comité de Ética-HCSBA. Resultados: La expresión génica y proteica del REá no difiere entre los grupos estudiados; sin embargo, su expresión proteica es mayor en la fracción nuclear que en la citoplasmática de todos los grupos ($P < 0.05$). Además se observa una mayor expresión de AIB1 en núcleo de células epiteliales y estromales ESOP (60,4%) y EH (43%), al comparar con EN ($P < 0.05$). Por otro lado, la expresión génica del RA aumenta 2,2 veces en ESOPH vs EN, siendo también mayor su expresión en ESOPH vs ESOP ($P < 0.05$). Sin embargo, la expresión proteica de RA no se modifica. Conclusión: El incremento en la expresión de AIB1 en ESOP puede dar al endometrio mayor sensibilidad a la acción estrogénica, lo que podría conducir al desarrollo de hiperplasia endometrial en pacientes SOP.

FONDECYT 1010821, RE-ENTRY GRANT PLACIRH: PRE-070/2003

Palabras Claves: síndrome de ovario poliquístico, receptores esteroidales, endometriosis.

INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP), es uno de los desórdenes endocrino-reproductivos más comunes en las mujeres en edad fértil (1), afectando entre el 5 al 10% de este grupo de mujeres. Se caracteriza por cuatro disfunciones globales: 1) hiperandrogenismo, 2) irregularidades menstruales (amenorrea, oligomenorrea), 3) hiperinsulinemia asociada a insulino resistencia (en el 50 - 60% de los casos) (2).

Consecuencia de lo anterior, el útero de las mujeres que padecen SOP presenta un comportamiento diferente al de las normales, que se relaciona con aumento de abortos recurrentes (1%) comparado con la población normal (0,34%), con infertilidad, así como, con hiperplasia y cáncer endometrial (3). El riesgo relativo de estas mujeres de desarrollar cáncer endometrial es 3.1.

Como el carcinoma endometrial normalmente está precedido por hiperplasia, ello permite identificar eventos moleculares asociados con conversión a la malignidad. En este contexto, se ha encontrado asociación entre mujeres nulíparas que padecen SOP e hiperplasia endometrial (4). Además, un reporte indicó que el 35,7% de las mujeres SOP estudiadas tiene hiperplasia endometrial. Por lo tanto, el SOP

es un factor de riesgo para el desarrollo de hiperplasia endometrial, con y sin atipia citológica (5).

La conversión del exceso de andrógenos a estrógenos contribuye a incrementar el riesgo de hiperplasia endometrial. Además, los elevados niveles séricos de testosterona inducen una disminución en la concentración circulante de la SHBG (*steroid hormone binding globulin*), lo cual conduce a un incremento en la concentración de estradiol libre. De esta forma, la exposición endometrial continua a estrógeno, no opuesta por progesterona, estimula la proliferación endometrial, lo cual conduce a que este tejido esté expuesto a un crecimiento no controlado (4).

Las acciones de los esteroides en el endometrio humano están mediadas en gran parte por receptores específicos y la expresión celular de éstos está altamente regulada por los esteroides circulantes. Así, el aumento exponencial de la concentración de estradiol (E_2) durante la fase proliferativa (FP) del ciclo menstrual, induce la expresión del receptor de E_2 (RE) (regulación positiva) y luego del receptor de progesterona (RP). Mientras que durante la fase secretora (FS), la alta concentración de progesterona (P_4) disminuye la

¹ Estudiante 3° año Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

² Programa de reproducción humana. ICBM. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

expresión del RE e induce la pérdida de su propio receptor (regulación negativa).

De esta forma, los estrógenos ejercen sus efectos a través de dos isoformas de receptores (RE α y RE β) (6), los cuales provienen de distintos genes. Ambos subtipos se encuentran en endometrio humano, siendo predominante la expresión del subtipo α en endometrio humano normal (6, 7).

Además, se ha descrito la expresión de receptores de andrógenos (RA), los cuales experimenta cambios cíclicos durante el ciclo menstrual (8, 9), siendo regulados positivamente por E $_2$ en FP (10, 11).

Como se indicó anteriormente, en las mujeres con SOP hay un aumento de los niveles séricos de andrógenos y estrógenos, lo que explicaría en parte que los receptores correspondientes tengan una mayor expresión en los endometrios de dichas pacientes.

Por otro lado, la condición hiperandrogénica puede conducir a hiperplasia (12), ya que los andrógenos pueden ser aromatizados a estrógenos. Por lo tanto, se especula que los andrógenos pueden estar involucrados en el desarrollo de hiperplasia endometrial en mujeres que padecen SOP.

Estudios *ex vivo* realizados recientemente en endometrios de pacientes SOP, sugieren que el hiperestrogenismo es prevalente sobre los altos niveles de andrógenos en inducir la expresión de receptores esteroidales (13). Probablemente lo que tenga mayor importancia en el SOP sea la condición hiperestrogénica relativa que presentan estas mujeres (14), debido a la falta de la acción compensadora de P $_4$.

Además, existen cofactores llamados co-activadores y co-represores, que regulan las acciones de los receptores esteroidales (15, 16, 17) activando o reprimiendo la transcripción mediada por ellos. Recientemente, se ha demostrado que la expresión de un co-activador relacionado con RE, co-activador AIB 1 (amplified in breast cancer-1), está regulada a lo largo del ciclo menstrual normal, aumentando su expresión en las células endometriales provenientes de mujeres SOP tratadas con citrato de clomifeno (3).

Por lo tanto, cambios en los niveles de expresión de receptores esteroidales y co-activadores, podrían jugar roles importantes en el desarrollo de hiperplasia endometrial en pacientes SOP.

MATERIALES Y MÉTODOS

I.- Pacientes

1. Endometrios Normales

Los endometrios fueron obtenidos de pacientes normales en edad fértil, en FP del ciclo menstrual, con fertilidad probada y sin terapia hormonal en los tres meses anteriores a la obtención de la muestra. Ellas fueron sometidas a salpingoligadura, biopsia o histerectomía por causas no neoplásicas, en el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Clínico San Borja-Arriarán, Campus Centro. Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Tabla 1).

2. Endometrios de mujeres con Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP)

Las muestras de endometrio fueron obtenidas de mujeres con SOP sin tratamiento, que asistieron al Consultorio de Infertilidad y Gineco-Endocrinología del Hospital Clínico San Borja-Arriarán.

Los criterios de inclusión fueron: 1) Clínicos: pacientes con signos clínicos de hiperandrogenismo (acné, hirsutismo, seborrea), sin virilización, ciclos con irregularidad menstrual. 2) Bioquímicos: Testosterona total >0.6 ng/ml, índice andrógenos libres >5, progesterona <3 ng/ml (día 22 en oligomenorreicas o al azar en amenorreicas), insulinemias indicativas de insulino-resistencia (insulinemia 2 h post sobrecarga de glucosa >60 UI/ml y glicemia/insulinemia en ayunas <4.5). 3) Ecográficos: volumen ovárico aumentado, estroma aumentado, presencia de 13 o más folículos por ovario no > 10 mm en el estroma ovárico.

Se excluyeron pacientes con PRL >20 ng/ml, testosterona total >2 ng/ml, DHEAS >4000 μ g/ml, 17-OH progesterona >2.5 ng/ml, TSH >5 mUI/L o con diabetes franca. Las mediciones hormonales fueron determinadas por RIA o IRMA convencionales (Tabla 1).

3. Pacientes SOP con Hiperplasia Endometrial

Las muestras fueron obtenidas de pacientes SOP con hiperplasia endometrial, luego de realización del legrado endometrial y/o histerectomía (Tabla 1).

4. Pacientes con Hiperplasia Endometrial

Las muestras de tejido endometrial fueron obtenidas posterior al procedimiento quirúrgico (legrado endometrial y/o pieza de histerectomía), según el criterio médico (Tabla 1).

Los tejidos fueron clasificados según la fecha de la última regla (FUR), concentraciones plasmáticas de E $_2$ y P $_4$ y mediante estudio histológico de acuerdo a los criterios de Noyes (18).

Al obtener los tejidos, una fracción (t = 0) fue congelada en N $_2$ líquido y guardada a -70° C (estudios de expresión de mRNA) o fijada en formalina e incluida en parafina (estudios de expresión proteica). Cada situación experimental se realizó en duplicado o triplicado.

Todas las muestras fueron obtenidas previo consentimiento escrito e informado de las pacientes. Cabe destacar que este proyecto ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, y por el Comité de Ética del Hospital Clínico San Borja Arriarán, de donde provienen las pacientes.

Tabla 1: Características generales de los sujetos participantes del estudio.

	EN	ESOP	ESOPH	EH
n	6	6	6	6
Edad	35.2 \pm 6.8	32.5 \pm 4.0	27.2 \pm 3.5	45.2 \pm 4.6
IMC	28.8 \pm 6.8	31.5 \pm 7.4	37.0 \pm 4.5	25.0 \pm 1.6

Valores expresados en promedio \pm EEM

II.- Estudios de Expresión

Reacción de polimerización en cadena de DNA complementario (RT-PCR)

El RNA total se preparó utilizando TRIzol (Gibco BRL, Life Technology) y el DNA complementario (cDNA) se sintetizó a partir de RNA tratado con DNasa I, utilizando la enzima Super Script II Transcriptasa Reversa (Gibco BRL, Life Technology). De 100 a 300 ng de cDNA fueron amplificados utilizando los primers específicos de cada gen a estudiar:

·RE α :AGG CTG CGC GTT CGG C
AGC CAT ACT TCC CTT GTC AT
·RA :ATG GCT GTC ATT CAG TAC TCC TGG A
AGA TGG GCT TGA CTT TCC CAG AAA G
·GAPDH: CCA TGG AGA AGG CTG GGG
CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC

El cDNA fue amplificado en una mezcla que contenía:

·RE α : Buffer PCR, MgCl $_2$ 2 mM, desoxinucleótidos (dNTP) 0.15 mM, 60 mU/ μ l de Taq polimerasa (Gibco BRL, Life Technology), 0.8 μ M de mezcla primer de RE α .

RESULTADOS

I) Receptor de Estrógenos alfa (REá)

a. Expresión génica del REá mediante RT-PCR:

La Figura 1 muestra los niveles de mRNA del REá en endometrios de los cuatro grupos estudiados: EN, ESOP, ESOPH y EH.

Se observa que si bien existe una tendencia a una mayor expresión del gen de este receptor en ESOP (42% vs EN), la misma no es significativa al comparar con la expresión en los otros grupos de endometrios.

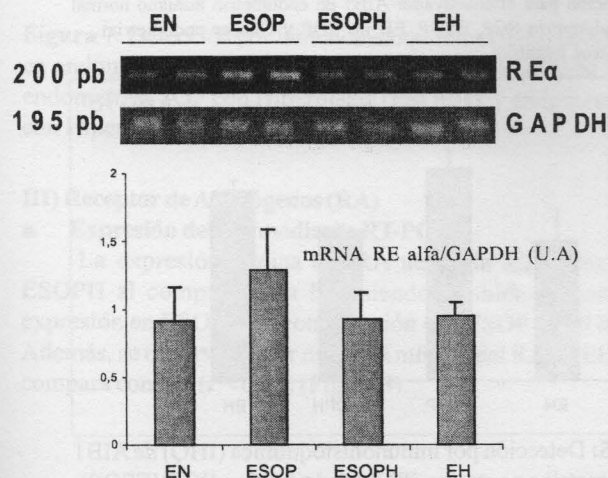


Figura 1: Niveles del mRNA del REá en endometrios normales (EN), endometrios SOP (ESOP), endometrios SOP con Hiperplasia endometrial (ESOPH), y endometrios con Hiperplasia no SOP (EH).

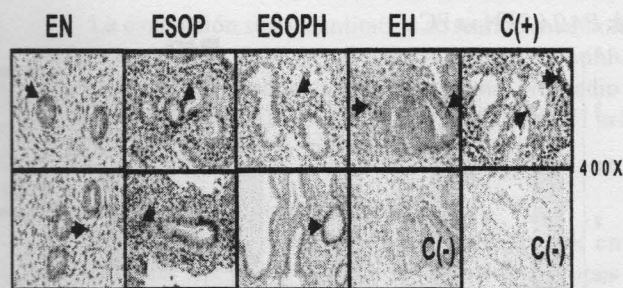
La evaluación semicuantitativa se realizó mediante la razón entre el mRNA del REá y el mRNA del gen constitutivo GAPDH. Los resultados se expresan como promedio de unidades arbitrarias (U.A.) ± EEM.

b. Expresión proteica del REá por Inmuntinción:

Como se observa en la Figura 2, la expresión proteica del REá (Fracción nuclear, FN + Fracción citoplasmática, FC) en los diferentes grupos de pacientes, no se modifica de manera notoria, aunque si existe un aumento significativo de la expresión del REá en ESOP en comparación con ESOPH ($P < 0,05$).

Además, el REá está localizado principalmente en el núcleo de las células del epitelio y del estroma endometrial ($P < 0,05$) (Figura 3), observándose una mayor expresión de éste en epitelio de EN (43,9%) y de EH (42,7%) en comparación con el estroma ($P < 0,05$) (Figura 4).

Además, si se analiza la expresión del receptor a nivel epitelial, se observa que éste se encuentra mayormente expresado en ESOP que en ESOPH ($P < 0,05$). Por otro lado, a nivel estromal, existe una expresión mayor del REá en ESOP al comparar con EN y con EH ($P < 0,05$) (Figura 4).



Inmuntinción para el REá en endometrio humano normal en FP, endometrio SOP, ESOPH, EH no SOP y cáncer endometrial. 400X. C(-): control negativo. C(+): Cáncer de endometrio.

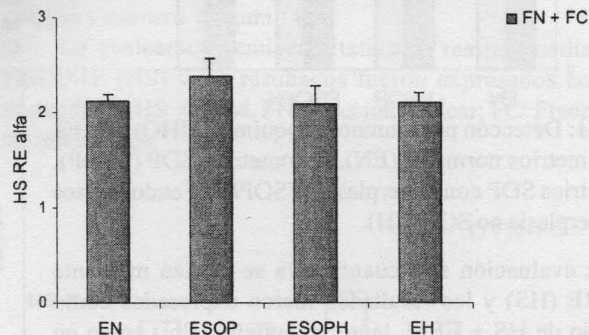


Figura 2: Detección por inmunohistoquímica (IHQ) del REá en endometrios normales (EN), endometrios SOP (ESOP), endometrios SOP con Hiperplasia (ESOPH), y endometrios con Hiperplasia ni SOP (EH).

La evaluación semicuantitativa se realizó mediante HSCORE (HS) y los resultados fueron expresados como promedio de HS ± EEM. FN: Fracción nuclear, FC: Fracción citoplasmática.

La evaluación semicuantitativa se realizó mediante HSORE (HS) y los resultados fueron expresados como promedio de HS ± EEM. FN: Fracción nuclear y FC: Fracción citoplasmática.

(a) $P < 0,05$ ESOP vs ESOPH

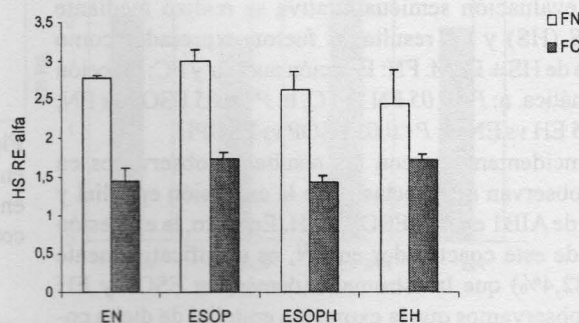


Figura 3: detección por inmunohistoquímica (IHQ) de REá en endometrios normales (EN), endometrios SOP (ESOP), endometrios SOP con Hiperplasia (ESOPH), y endometrios con Hiperplasia no SOP (EH).

a, b, c, d: $P < 0.05$ FN vs FC.

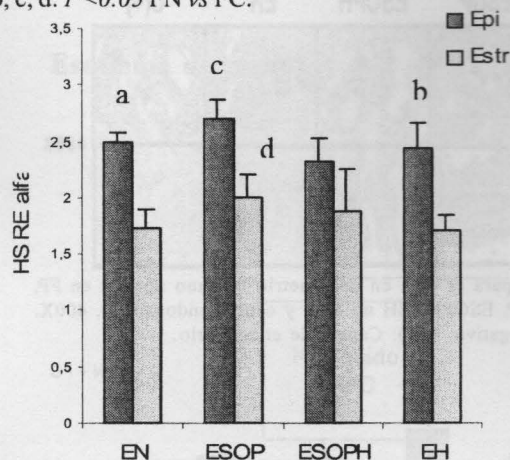


Figura 4: Detección por inmunohistoquímica (IHQ) de REA en endometrios normales (EN), endometrios SOP (ESOP), endometrios SOP con Hiperplasia (ESOPH), y endometrios con Hiperplasia no SOP (EH).

La evaluación semicuantitativa se realizó mediante HSCORE (HS) y los resultados fueron expresados como promedio de $HS \pm EEM$, tanto en epitelio (Epi) como en estroma (Estr). a: $P < 0.05$ EN (epi vs estr), b: $P < 0.05$ EH (epi vs estr), c: $P < 0.05$ ESOP (epi) ESOPH (epi), d: $P < 0.05$ ESOP (estr) vs EH (estr).

II) Coactivador AIB1:

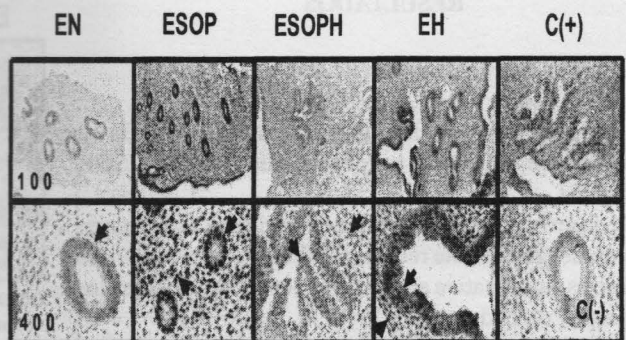
Los resultados indican una mayor expresión del coactivador (FN + FC) en ESOP (52%) al comparar con EN ($P < 0.05$). La Figura 5 muestra la inmunotinción de AIB1.

La evaluación semicuantitativa se realizó mediante HSCORE (HS) y los resultados fueron expresados como promedio de $HS \pm EEM$. FN: Fracción nuclear; FC: Fracción citoplasmática. a: $P < 0.05$ ESOP vs EN.

También, se observan diferencias significativas en la expresión proteica del coactivador, entre la FN y la FC de ESOP y EH. En el caso de ESOP, la expresión nuclear supera a la citoplasmática en un 32,2%; mientras que en el caso de EH la diferencia es de un 31,3% a favor de la FN ($P < 0.05$) (Figura 6).

La evaluación semicuantitativa se realizó mediante HSCORE (HS) y los resultados fueron expresados como promedio de $HS \pm EEM$. FN: Fracción nuclear y FC: Fracción citoplasmática. a: $P < 0.05$ FN vs FC, b: $P < 0.05$ ESOP vs EN, c: $P < 0.05$ EH vs EN, d: $P < 0.05$ ESOP vs ESOPH.

Coincidentemente con los resultados observados en REA, se observan diferencias entre la expresión epitelial y estromal de AIB1 en EN, ESOP y EH. En efecto, la expresión epitelial de este coactivador en EN, es significativamente mayor (82,4%) que la estromal. Además, en ESOP y EH también observamos que la expresión epitelial de dicho co-regulador se encuentra aumentada de forma significativa al comparar con la expresión a nivel estromal. Dentro de este análisis, es importante destacar que existe una mayor expresión estromal del coactivador en ESOP (86,1%) al comparar con EN ($P < 0.05$) (Figura 7).



Inmunotinción para el coactivador AIB1 en endometrio humano normal en FP, endometrio SOP, ESOP, EH no SOP y Cáncer endometrial. C(-): control negativo.

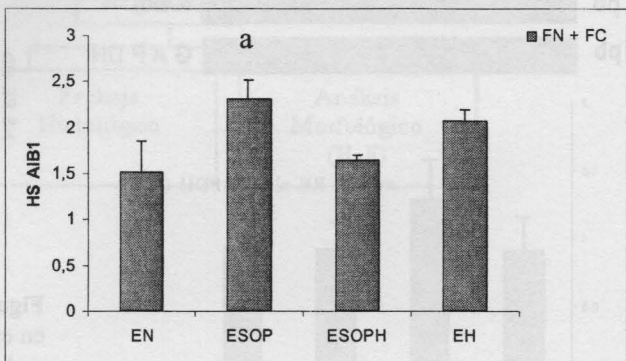


Figura 5: Detección por inmunohistoquímica (IHQ) de AIB1 en endometrios normales (EN), endometrios SOP (ESOP), endometrios SOP con Hiperplasia (ESOPH), y endometrios con Hiperplasia no SOP (EH).

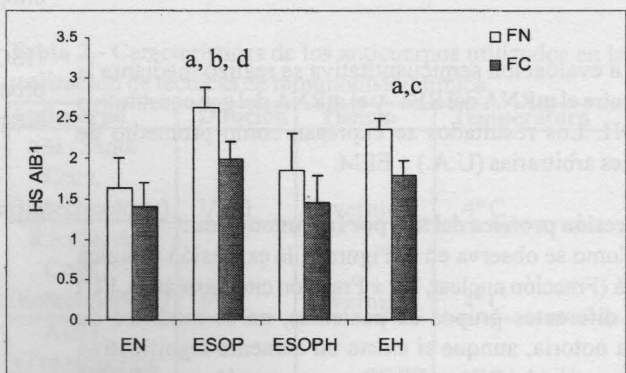


Figura 6: Detección por inmunohistoquímica (IHQ) de AIB1 en endometrios normales (EN), endometrios SOP (ESOP), endometrios SOP con Hiperplasia (ESOPH), y endometrios con Hiperplasia no SOP (EH).

La evaluación semicuantitativa se realizó mediante HSCORE y los resultados fueron expresados como promedio de $HSCORE \pm EEM$, en epitelio (Epi) y estroma (Estr). a: $P < 0.05$ (epi vs estr), b: $P < 0.05$ ESOP vs EN.

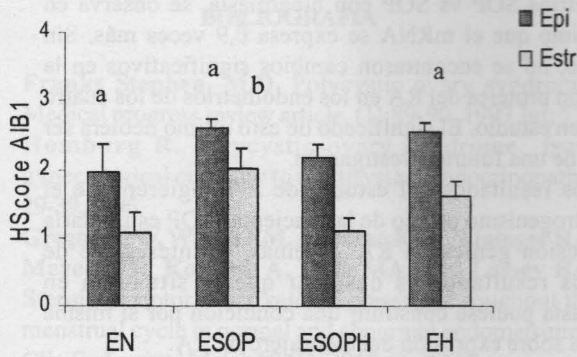


Figura 7: Detección por inmunohistoquímica (IHQ) de AIB1 en endometrios normales (EN), endometrios SOP (ESOP), endometrios SOP con Hiperplasia (ESOPH), y endometrios con Hiperplasia no SOP (EH).

III) Receptor de Andr6genos (RA)

a. Expresi3n del RA mediante RT-PCR:

La expresi3n g6nica del RA aumenta 2,2 veces en ESOPH al comparar con EN, siendo tambi6n mayor su expresi3n en ESOPH en comparaci3n con ESOP ($P < 0.05$). Adem6s, se observa mayor nivel del mRNA del RA en EH al compara con EN ($P < 0.05$) (Figura 8).

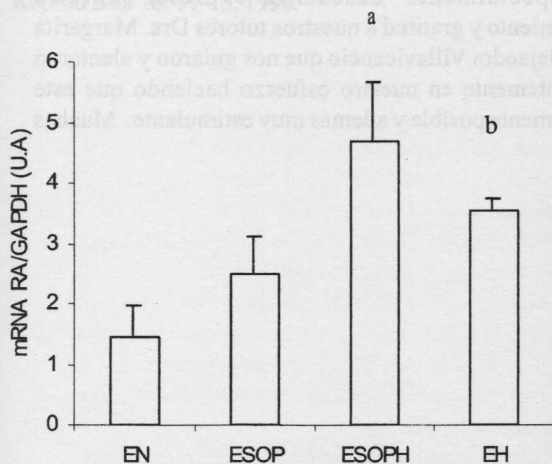
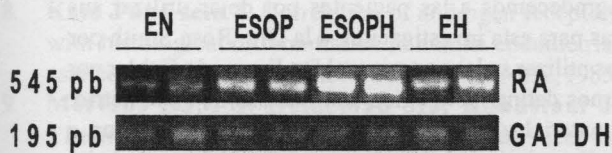


Figura 8: Niveles del mRNA del RA en endometrios normales (EN), endometrios SOP (ESOP), endometrios SOP con Hiperplasia endometrial (ESOPH) y endometrios con Hiperplasia no SOP (EH).

La evaluaci3n semicuantitativa se realiz3 mediante la raz3n entre mRNA del RA y el mRNA del gen constitutivo GAPDH. Los resultados se expresan como promedio de unidades arbitrarias (U.A.) \pm EEM. a: $P < 0.05$ ESOPH vs EN y ESOPH vs ESOP; b: $P < 0.05$ EH vs EN.

a. Expresi3n del RA por inmunotinci3n:

No se observan diferencias significativas en la expresi3n del RA (FN + FC) en los diferentes grupos de pacientes, aunque los resultados muestran una ligera tendencia a aumentar su expresi3n en ESOPH (Figura 9 y 10). Lo mismo ocurre al comparar la expresi3n del RA entre epitelio y estroma (Figura 11).

La evaluaci3n semicuantitativa se realiz3 mediante HSCORE (HS) y los resultados fueron expresados como promedio de HS \pm EEM. FN: Fracci3n nuclear; FC: Fracci3n citoplasm6tica.

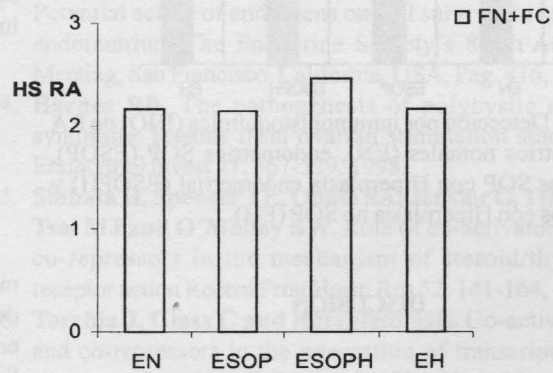


Figura 9: Detecci3n por inmunohistoquímica (IHQ) de RA en endometrios normales (EN), endometrios SOP (ESOP), endometrios SOP con Hiperplasia endometrial (ESOPH) y endometrios con Hiperplasia no SOP (EH).

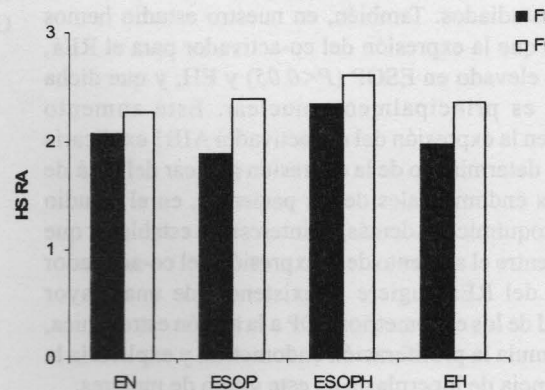


Figura 10: Detecci3n por inmunohistoquímica (IHQ) de RA en endometrios normales (EN), endometrios SOP (ESOP), endometrios SOP con Hiperplasia endometrial (ESOPH) y endometrios con Hiperplasia no SOP (EH).

La evaluación semicuantitativa se realizó mediante HSCORE (HS) y los resultados fueron expresados como promedio de HS \pm EEM. FN: Fracción nuclear y FC: Fracción citoplasmática.

La evaluación semicuantitativa se realizó mediante HSCORE (HS) y los resultados fueron expresados como promedio de HS \pm EEM, en epitelio (Epi) y (Estr).

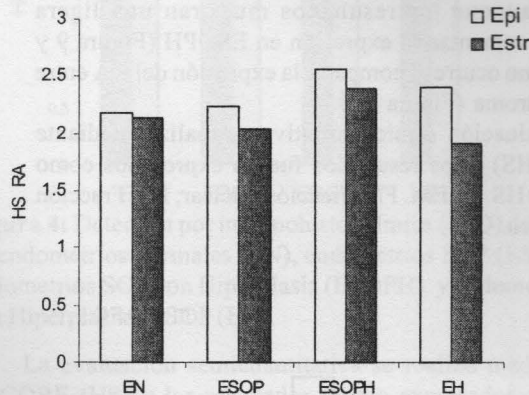


Figura 11: Detección por inmunohistoquímica (IHQ) de RA en endometrios normales (EN), endometrios SOP (ESOP), endometrios SOP con Hiperplasia endometrial (ESOPH) y endometrios con Hiperplasia no SOP (EH).

DISCUSIÓN

En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en la expresión génica y proteica del REá entre los distintos grupos de pacientes, aunque sí una tendencia en ESOP a expresar más dicho receptor. Además, el REá se encuentra significativamente más expresado en la fracción nuclear de las células endometriales de los cuatro grupos de pacientes estudiados. También, en nuestro estudio hemos encontrado que la expresión del co-activador para el REá, AIB1, está elevado en ESOP ($P < 0.05$) y EH, y que dicha expresión es principalmente nuclear. Este aumento observado en la expresión del co-activador AIB1 explicaría el aumento determinado de la expresión nuclear del REá de las biopsias endometriales de las pacientes, en el estudio inmunohistoquímico. Además, es interesante establecer que la relación entre el aumento de la expresión del co-activador AIB1 y el del REá sugiere la existencia de una mayor sensibilidad de los endometrios SOP a la acción estrogénica, lo cual estimula la proliferación endometrial y explicaría la gran incidencia de hiperplasia en este grupo de mujeres.

Por otro lado, los niveles del mRNA del RA están significativamente elevados en ESOPH y EH en comparación con los de EN. En efecto, en ESOPH, el mRNA del RA se encuentra expresado 2,2 veces más que en endometrios normales, y en endometrios con Hiperplasia no SOP se encuentra 1,4 veces más expresado que en los normales. Así mismo, al comparar los niveles del mRNA de RA en

endometrios SOP vs SOP con hiperplasia, se observa en este último que el mRNA se expresa 0,9 veces más. Sin embargo, no se encontraron cambios significativos en la expresión proteica del RA en los endometrios de los cuatro grupos en estudio. El significado de esto último debiera ser motivo de una futura investigación.

Los resultados del estudio de RA sugieren que el hiperestrogenismo propio de las pacientes SOP estimularía la expresión génica de RA. Además, lo interesante de nuestros resultados es destacar que la situación en hiperplasia pudiese constituir una condición por sí misma para una sobre expresión del mensajero de RA.

En conjunto, estos resultados sugieren que la acción inapropiada de estrógenos a nivel endometrial puede alterar el patrón de expresión de genes y proteínas importantes en el control de la homeostasis tisular, conduciendo a un crecimiento incontrolado lo que puede llevar al desarrollo de hiperplasia endometrial en pacientes SOP. Futuros estudios serán necesarios para poder entender completamente las implicaciones de nuestras observaciones.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a las pacientes por dejar utilizar sus muestras para esta investigación, a la Dra. Rosa Smith por dejarnos utilizar su laboratorio y al Dr. Fernando Gabler por enseñarnos dating histológico en muestras de endometrio. Sin el material y los métodos que todos ellos pusieron a nuestra disposición habría sido muy difícil nuestro trabajo. Muy especialmente deseamos expresar nuestro reconocimiento y gratitud a nuestros tutores Dra. Margarita Vega y Alejandra Villavicencio que nos guiaron y alentaron permanentemente en nuestro esfuerzo haciendo que este fuera realmente posible y además muy estimulante. Muchas Gracias.

BIBLIOGRAFIA

1. **Franks Stephen, M.D.** Polycystic ovary syndrome. Medical progress review article. (1):89-90. 1997 Jul; 77.
2. **Homburg R.** Polycystic ovary syndrome from gynecological curiosity to multisystem endocrinopathy, 29-39, 1996.
3. **Gregory CW, Wilson EM, Apparao KBC, Lininger RA, Meyer WR, Kowalik A, Fritz MA, and Lessey BA.** Steroid receptor coactivator expression throughout the menstrual cycle in normal and abnormal endometrium J Clin Endocrinol Metab 87 (6): 2960-66, 2002.
4. **Segreti EM.** Endometrial hyperplasia and carcinoma in women with androgen excess disorders Androgen Excess Disorders in Women Capitulo 64: 667-672, 1997
5. **Balen A** Polycystic ovary syndrome and cancer Hum Reprod Update 7 (6): 522-525, 2001.
6. **Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjold M, and Gustafsson JA.** Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern J Clin Endocrinol Metab 82: 4258-65, 1997.
7. **Fujimoto J, Sakaguchi H, Aoki I, Toyoki H, and Tamaya T.** Clinical implications of the expression of estrogen receptor- α and - β in primary and metastatic lesions of uterine endometrial cancers Oncology 62: 269-77, 2002
8. **Kato J and seto T.** Correlation of androgen receptors with histological differentiation in human endometrial carcinomas Acta Obstet Gynecol Scand 64: 209-212, 1985.
9. **Mertens HJMM, Heineman MJ, Koudstaal J, Theunissen P, and Evers JLH.** Androgen receptor content in human endometrium Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 70: 11-13, 1996.
10. **Fujimoto J, Nishigaki M, Hori M, Ichigo S, Itoh T, and Tamaya T.** The effect of estrogen and androgen on androgen receptors and mRNA levels in uterine leiomyoma, myometrium and endometrium of human subjects J Steroid Biochem Mol Biol 50: 137-143, 1994.
11. **Lovely LP, Appa Rao KBC, Gui Y, and Lessey BA.** Characterization of the androgen receptor in a well-differentiated endometrial adenocarcinoma cell line (Ishikawa) J Steroid Biochem Mol Biol 74: 235-241, 2000.
12. **Sherman AI and Brown S.** Androgen-uterine interactions: an assessment of androgen interactions with the testosterone and estrogen receptor systems and stimulation of uterine growth and progesterone receptor synthesis Mol Cell Endocrinol 15: 91-108, 1979.
13. **Vega M, Maliqueo M, Anido M, Clementi M, Palomino A, Sir-Petermann T, Gabler F, and Johnson MC.** Potential action of androgens on cell survival in human endometrium The Endocrine Society's 84 th Annual Meeting, San Francisco, California, USA, Pag. 416, 2002.
14. **Barnes RB.** The pathogenesis of polycystic ovary syndrome: lessons from ovarian stimulation studies J Endocrinol Invest 21: 567-579, 1998.
15. **Shibata H, Spencer TE, Onate SA, Jenster G, Tsai SY, Tsai MJ and O'Malley BW.** Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action Recent Prog Horm Res 52: 141-164, 1997.
16. **Torchia J, Glass C and Rosenfeld MG.** Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses Curr Opin Cell Biol 10: 373-383, 1998
17. **Parker MG** Transcriptional activation by oestrogen receptors Biochem Soc Symp 63: 45-50, 1998.
18. **Noyes RW, Hertig DT and Rock J.** Dating the endometrial biopsy Fertil Steril 1: 3-25, 1950.

EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LACTANTES CON CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS QUE CURSAN INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS BAJAS.

JOSÉ MIGUEL FLORES M¹, ANGELA GALLARDO E¹, CAROLINA SELMAN¹, DR. HERNÁN SEPÚLVEDA², E.U. EVELYN PALOMINOS L³.

RESUMEN

Introducción: Los lactantes con cardiopatías congénitas (CC) presentan enfermedad pulmonar con mayor frecuencia que los lactantes sanos. **Objetivo:** Estudio de infecciones respiratorias agudas bajas (IRAB) en pacientes con cardiopatías congénitas atendidos en el servicio de lactantes Hospital Luis Calvo Mackenna. **Materiales y método:** Se realizó estudio retrospectivo descriptivo. **Recolección de datos de fichas clínicas.** Se elaboró protocolo de trabajo. Los datos fueron ingresados a una planilla Excel. **Resultados:** Total 45 casos, Promedio edad 7.7 meses. CC más frecuentes fueron la comunicación interauricular y comunicación interventricular. Los factores de riesgo más frecuentes fueron las hospitalizaciones previas y la desnutrición. **Requirió UCI** 51.25%, 20% ventilación mecánica, 28.8% oxígeno mayor a 0.4. **Complicaciones** 71.15%, más frecuentes atelectasia y sobreinfección. **La mortalidad** 6.65% de los casos. **Discusión:** Pacientes con Cardiopatía congénita que cursan con cuadros respiratorios agudos bajos en un alto porcentaje evolucionan con complicaciones, sin embargo, la sobrevida es alta.

Palabras Claves: babies, congenital cardiopathies, low respiratory disease

INTRODUCCIÓN

Durante el invierno, las enfermedades respiratorias son el diagnóstico prevalente tanto en las salas de hospitalización de adultos como en las infantiles de nuestro país.

Dentro de la población infantil hospitalizada por esta causa, llama la atención la gran cantidad de niños con genopatías que se encuentran, siendo el Síndrome de Down, la genopatía más frecuentemente observada.

Es asimismo llamativo que dentro de los niños con síndrome de Down la estadía hospitalaria sea en general prolongada, y que dentro de este grupo la presencia de cardiopatía congénita sea uno de los factores asociados más importantes para la hospitalización.

Es así como al buscar más acuciosamente factores de hospitalización prolongada por enfermedad respiratoria, se encuentre que la cardiopatía congénita es uno de los factores determinantes, tanto en niños con genopatías como en aquellos que nos las poseen.

Las Cardiopatías congénitas (CC) son malformaciones del corazón presentes en el momento del nacimiento y se deben a una detención del desarrollo embriológico normal en los 3 primeros meses de la gestación. Es la malformación más común (0.5-1% de los recién nacidos vivos) y generalmente no única.

Embriológicamente, el desarrollo del corazón ocurre en forma temprana dentro de la gestación, el día 18 después de

la fecundación; aparece el esbozo cardiaco, delante de la placa neural, es la llamada placa cardiogénica, de ésta se forman dos tubos endocárdicos, los cuales, hacia el día 23 se fusionan y comienza la circulación. Con el desarrollo embrionario posterior se llega, primariamente a una incurvación de los tubos endocárdicos fusionados y posteriormente, a la forma del corazón adulto.

La etiología de las CC es frecuentemente desconocida, en menos de una cuarta parte de los pacientes se llega a saber la causa. La existencia de riesgos de recurrencia mucho menores que los de la herencia mendeliana hizo que tradicionalmente se creyese que el 90% de las CC eran debidas a herencia poligénica o multifactorial. Estudios más recientes, no están de acuerdo con este modelo y cada día se van encontrando más mutaciones en un solo gen responsables de CC. Otras veces las CC son causadas por anomalías cromosómicas, bien por alteraciones visibles con las técnicas citogenéticas convencionales o bien por síndromes de microdelección.

Como ejemplos, la región cromosómica a la que se ha asignado la cardiopatía en el síndrome de Down es 21q22.1-qter, hay microdelecciones en 22q11.2 que se presentan asociadas a malformación cardiaca y en el síndrome de Turner las cardiopatías ocurren en pacientes que retienen el cromosoma X materno.

¹ Internos 7º año Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

² Servicio Lactantes Hospital Luis Calvo Mackenna,

³ Enfermera Universitaria Hospital Luis Calvo Mackenna, Hospital del Profesor

Hospital Luis Calvo Mackenna, Departamento de Pediatría, Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Sede Oriente

Las CC se pueden clasificar en cardiopatías congénitas acianóticas y cianóticas, las primeras pueden ser con cortocircuito de izquierda a derecha (comunicación interauricular e interventricular), obstructivas y con insuficiencia valvular; las segundas se clasifican en obstructivas del corazón derecho, cardiopatía con mezcla total (ventrículo único) y cardiopatía sin mezcla (Transposición de grandes arterias). Otra clasificación de las CC cianóticas las determina con hipo o hiperflujo pulmonar

Es conocido que los lactantes con CC presentan enfermedad pulmonar con mayor frecuencia que los lactantes sanos y dentro de las cardiopatías, las que más se asocian a enfermedad pulmonar son las con hiperflujo pulmonar³. Esto se debería a la broncoconstricción y el edema dado por el hiperflujo pulmonar, además es frecuente que los lactantes que padecen cardiopatía congénita tengan además asociados otros factores de riesgo como prematuridad, displasia broncopulmonar o inmunosupresión que son determinantes en la producción de infecciones en estos pacientes. Muchos de los pacientes cardiopatas además tienen asociadas enfermedad genética, siendo la más común el síndrome de Down.

Dentro de los lactantes sanos la enfermedad viral pulmonar es lo más frecuente, Virus Respiratorio Sincicial (VRS) el agente más común a lo igual que en cardiopatas. De acuerdo a la literatura la morbilidad y mortalidad por VRS es mayor en los primeros 3 meses de vida y en los niños con factores de riesgo conocidos. La mortalidad en lactantes sanos es 1%, pero en los lactantes con enfermedad cardiopulmonar es 3 veces mayor⁵.

Objetivo:

General

Estudio de infecciones respiratorias agudas bajas (IRAB) en pacientes con cardiopatías congénitas atendidos en el servicio de lactantes del Hospital Luis Calvo Mackenna entre Marzo del 2002 a Octubre del 2003.

Específicos:

- Ø Determinar las CC más frecuentes.
- Ø Determinar el promedio de días de hospitalización.
- Ø Evaluar los factores de riesgo presentes.
- Ø Determinar evolución y complicaciones presentes.

MATERIALES Y MÉTODO

Se realizó un estudio retrospectivo descriptivo, para lo cual se procedió a la recolección de datos de fichas clínicas de lactantes atendidos entre Marzo del 2002 a Octubre del 2003 en el Servicio de Lactantes del Hospital Luis Calvo Mackenna.

Se elaboró un protocolo de trabajo, donde se procedió al análisis de sexo, edad, promedio de hospitalización, factores de riesgo presentes (oxígeno dependencia, displasia broncopulmonar, inmunodeficiencia, prematuro, lactante menor de 6 meses, enfermedades neurológicas, metabólicas o genopatas, desnutrición, hospitalizaciones previas), evolución presentada (días en sala, en intermedio, en Unidad de Cuidados Intensivos, requerimiento de ventilación mecánica, oxigenoterapia mayor a 0.4, estudio viral,

hemocultivos, tratamientos recibidos) y complicaciones presentadas (apneas, neumotórax, sobreinfección, atelectasia, neumomediastino, insuficiencia cardiaca, shock cardiogénico, hipertensión pulmonar (HTP), cianosis, crisis anoxémica, muerte, Otra).

Los datos fueron ingresados a una planilla Excel, para el análisis estadístico se utilizó este mismo programa.

RESULTADOS

Se analizaron un total de 45 casos, de los cuales, 51% correspondió a sexo masculino y 49% a sexo femenino (Gráfico 1), con un promedio de edad de 7.7 meses.

El promedio de hospitalización fue de 33.1 días, con un rango de 2 a 158 días, sólo un 26.6% de los pacientes presentaba alguna cardiocirugía correctora o de soporte.

Dentro de las CC destaca la comunicación interauricular (CIA) con un 46.6% y comunicación interventricular (CIV) 35.5% como las CC más frecuentes, la tercera frecuencia la tuvo la estenosis pulmonar (Gráfico 2). El promedio de anomalías congénitas cardíacas por paciente fue de 2.6 anomalías.

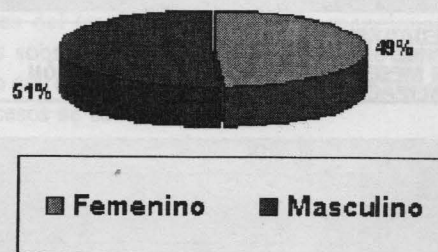


Gráfico 1 Distribución por sexo de pacientes lactantes con cardiopatía congénita atendidos en el servicio de Lactantes del Hospital Luis Calvo Mackenna que cursaron con infección respiratoria aguda baja.

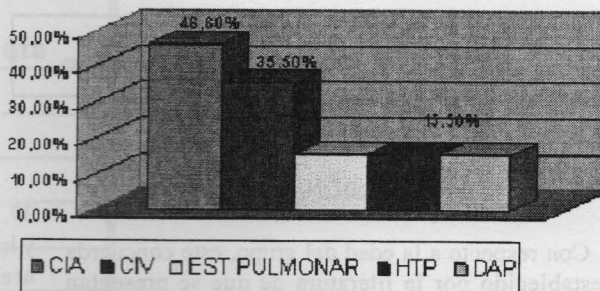


Gráfico 2 Cardiopatías Congénitas más frecuentes encontradas en pacientes lactantes con cardiopatía congénita atendidos en el servicio de Lactantes del Hospital Luis Calvo Mackenna que cursaron con infección respiratoria aguda baja. CIA: Comunicación Interauricular, CIV: Comunicación Interventricular, Est: Estenosis, HTP: Hipertensión Pulmonar, DAP: Ductus Arterioso Persistente

Dentro de los factores de riesgo encontrados las hospitalizaciones previas tuvieron 75.5%, la desnutrición un 55.5%, lactante menor de 6 meses un 42.2% y las genopatías un 37,7%, dentro de estas, la principal hallada fue el Síndrome de Down y como otro factor de riesgo destacó la prematurez con un 22.2% (Gráfico 3).

La evolución en sala registró en promedio 23.3 días, 51.25% de los pacientes requirió UCI, con un promedio de 19.7 días, 20% requirió ventilación mecánica (VM) y 28.8% oxígeno mayor de 0,4. En cuanto al tratamiento principalmente

se utilizó Salbutamol puff 71.1 %, kinesioterapia 62.2%, diuréticos 60% y uso de antibióticos en un 51.1% (Tabla 1). El estudio viral se realizó en un 84.4% de los casos, de estos 31.57% correspondió a VRS positivo, la toma de hemocultivos se realizó en un 22.2% de los casos, y dentro de estos 30% fue positivo.

Las complicaciones se presentaron en un 71.15% de los casos, las más frecuentes fueron atelectasia y sobreinfección con un 22.2% cada una, la muerte se presentó en el 6.65% de los casos (Gráfico 4).

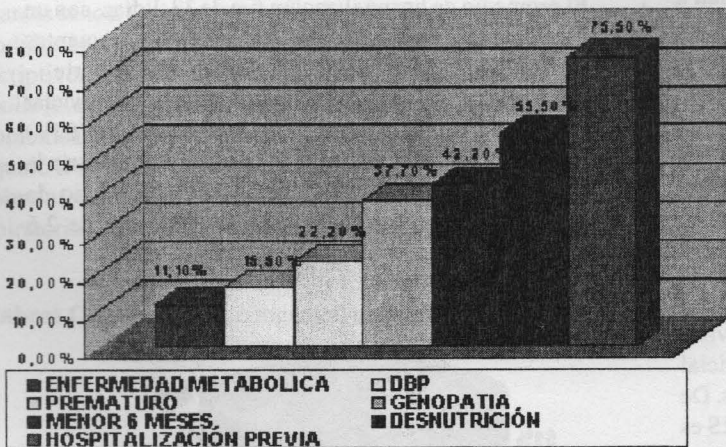


Gráfico 3 Factores de riesgo más frecuentes encontradas en pacientes lactantes con cardiopatía congénita atendidos en el servicio de Lactantes del Hospital Luis Calvo Mackenna que cursaron con infección respiratoria aguda baja. DBP: Displasia Broncopulmonar

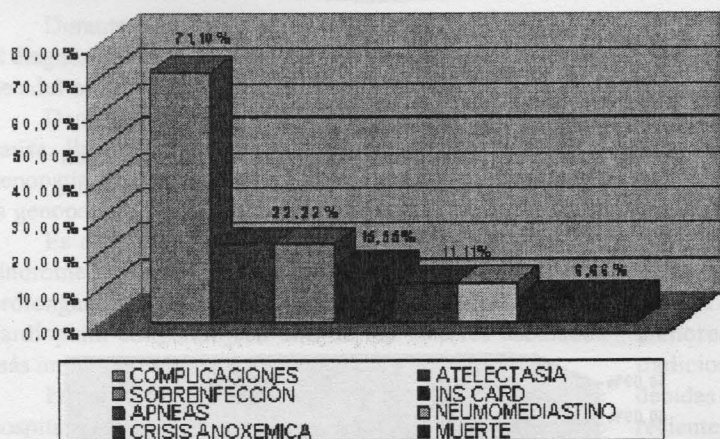


Gráfico 4 Complicaciones más frecuentes encontradas en pacientes lactantes con cardiopatía congénita atendidos en el servicio de Lactantes del Hospital Luis Calvo Mackenna que cursaron con infección respiratoria aguda baja.

DISCUSIÓN

Con respecto a la edad del grupo, este concuerda con lo establecido por la literatura de que se presentan sintomáticas a edad temprana, generalmente antes del año de vida, siendo el promedio de edad en nuestro grupo de 7.7 meses. El sexo, en nuestro grupo de estudio se dividió en masculino y femenino prácticamente en proporción 1:1, como lo menciona la literatura, siendo levemente mayor para el sexo masculino (51%), siendo esto también referido por la bibliografía encontrada.

Tal como apreciamos en las salas de hospitalización un 37.7% de los niños tuvo como factor de riesgo la genopatía y la principal fue el síndrome de Down, sin embargo, llama la atención que los principales factores de riesgo de hospitalización antes que la genopatía, sean la hospitalización previa y la desnutrición, sin embargo, en parte esto se explica porque los niños con cardiopatía congénita y los niños con síndrome de Down son, independientemente, desnutridos y han estado hospitalizados por alguna razón previa, pero pese a esto, la cifra incluye a otros niños que no tienen genopatía y que comparten la desnutrición, ya sea como parte del cuadro

de cardiopatía o independiente de éste, dentro de estos hallamos a los menores de 6 meses y a los niños prematuros.

Como habíamos podido observar, el promedio de hospitalización es al menos, de un mes en la mayoría de los niños (33.1 días) probablemente por los factores asociados y las complicaciones.

Llamó la atención que el defecto más frecuente haya sido la CIA con un 46.6%, ya que éste defecto es descrito con un 10% en la literatura, esto puede ser explicado porque los pacientes estudiados en su gran mayoría tenían más de una cardiopatía congénita, habían sido hospitalizados previamente y que un 22.6% ya había sido intervenido quirúrgicamente para corregir el defecto principal, por lo que la CIA puede ser tan prevalente en esta población como un defecto residual de la corrección o un defecto en espera de reparación, ya que cuando es sintomático, en general, se realiza la cirugía correctiva entre los 2 y 4 años de edad y durante la infancia es un defecto poco sintomático y que puede haber sido pesquisado como hallazgo en la ecocardiografía.

La CIV fue la segunda cardiopatía congénita encontrada y esto se corresponde con la literatura que la menciona como la de primera prevalencia con un 30% del total de las CC, al igual que la tercera en importancia hallada en nuestro trabajo, la estenosis pulmonar que corresponde a un 10% en la literatura.

Con respecto a la morbimortalidad, Navas et al reportaron en un estudio de 260 pacientes que 33% de los niños cardiopatas afectados por VRS necesitaron UCI, 19% requirió VM y 3.4% falleció. En un estudio de 1563 pacientes infectados por VRS, 8 niños murieron, de los cuales 3 padecían cardiopatía. La tasa de mortalidad fue 0.3% en niños sin factor de riesgo y 1% en los con factor de riesgo. En nuestro estudio, un número cercano a la mitad requirió UCI, esta cifra puede ser mayor dado que en países desarrollados como en los que se realizaron los estudios mencionados, la

disponibilidad de recursos en sala de hospitalización e intermedio es mayor y por tanto, un número menor de pacientes requiere cuidados intensivos y sólo los que requieren estabilización hemodinámica invasiva y ventilación mecánica son trasladados a UCI. Cabe destacar que para los niños no cardiopatas y sin factores de riesgo la necesidad de UCI se da sólo en un 7% de los casos.

Altman reportó en un estudio de 56 pacientes que 25% requirió UCI y que la edad de admisión promedio fue de 16 meses, explicado por infección con VRS en cardiopatas aún durante el segundo año de vida por cardiopatías no corregidas o no completamente reparadas. Esto también se presentó en nuestro trabajo, ya que niños mayores de un año, portadores de canal AV, no habían sido resueltos aún en forma quirúrgica.

El uso de VM es mayor en estos pacientes, en este estudio, alrededor de un 20% de los casos, en comparación a población sin factores de riesgo, donde aproximadamente 7% requiere VM.

La patología respiratoria es mayormente de causa viral al igual como lo muestran diversos estudios, siendo el VRS la causa más frecuente, en aproximadamente 1/3 de nuestros casos.

El uso de salbutamol y kinesiterapia respiratoria fueron las bases del tratamiento, tal como mencionan muchos trabajos sobre IRAB, pero destaca en este estudio que a pesar de que el principal agente fue viral, en más de la mitad de los casos se usó antibióticos.

Con respecto a las complicaciones, estas se presentaron más de 2/3 de los pacientes estudiados (71.15%) las más frecuentes fueron la atelectasia y la Sobreinfección, esto explicado tanto por la calidad de hipersecretores de la mayoría de los pacientes y la frecuente obstrucción que sufren, creando un ambiente lleno de secreciones de fácil colonización para agentes bacterianos como por las condiciones en que se encuentran hospitalizados, tanto por el largo tiempo que requieren como por la fácil transmisión de agentes en la sala, ya que durante las campañas de

	%	Días Promedio
SBT puff	71,1%	18,6
NBZ SBT	35,5%	6,8
NBZ Adrenalina	11,1%	7,4
Prednisona	11,4%	5,4
Metilprednisolona	4,4%	2
Hidrocortisona	11,1%	9,2
Antibiótico	51,1%	16,6
Diuréticos	60%	
KTR	62,2%	
Otro	11,1%	

Tabla 1 Tratamiento utilizado en pacientes lactantes con cardiopatía congénita atendidos en el servicio de Lactantes del Hospital Luis Calvo Mackenna que cursaron con infección respiratoria aguda baja. SBT: Salbutamol, NBZ: Nebulización, KTR: Kinesioterapia respiratoria

invierno, el número de camas por sala es el mínimo para mantener un aislamiento aéreo apropiado.

La mortalidad se presentó en el 6.65% de los pacientes, esta es una cifra elevada aún para nuestro país en comparación con los estudios de países desarrollados, en que no alcanza más allá del 1%, sin embargo, esto nos demuestra que los pacientes con cardiopatías congénitas y que cursan con cuadros respiratorios agudos bajos en un alto porcentaje evolucionan con complicaciones, muchas de ellas graves y que requieren soporte vital, pero que, sin embargo, la sobrevida de estos paciente es alta, siendo la muerte una complicación que es poco frecuente.

Es por esto, que es importante visualizar el futuro de estos pacientes desde que nacen, ya que el porcentaje de niños que nacen con cardiopatías congénitas desde el

desarrollo de las unidades de neonatología en los últimos 20 años se ha mantenido estable en un 1% de los recién nacidos vivos y que no decrecerá, ya que los niños que fallecen en general son por cardiopatías incompatibles con la vida.

A futuro podría ser estudiada además la distribución de una población de lactantes divididos según cardiopatía congénita, por edad, sexo, según complicaciones presentes, evolución presentada y con ello establecer quiénes son los pacientes que deben preocuparnos realmente por las complicaciones respiratorias futuras y poder identificar así a quienes entregar medidas anticipatorias como la cirugía correctiva a edad temprana, el manejo médico en consultorio preventivo, kinesiterapia respiratoria para mejorar el drenaje de secreciones, entre otros muchos factores para un mejor manejo.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Lowther SA, Shay DK, Holman RC, Clarke MJ, Kaufman SF, Anderson LJ.** Bronchiolitis-associated hospitalizations among American Indian and Alaska Native children., *Pediatr Infect Dis J.* 2000 Jan;19(1):11-7.
2. **Aujard Y, Fauroux B., Hopital Robert Debre.** Risk factors for severe respiratory syncytial virus infection in infants., *Assistance Publique-Hopitaux de Paris, France, Respir Med.* 2002 Apr; 96 Suppl B:S9-14
3. **Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ.** Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996, *JAMA.* 1999 Oct 20;282(15):1440-6
4. **Dagan O, Birk E, Katz Y, Gelber O, Vidne B.** Relationship between caseload and morbidity and mortality in pediatric cardiac surgery—a four year experience, *Isr Med Assoc J.* 2003 Jul;5(7):471-4.
5. **Eric A. F. Simoes, MD, and Xavier Carbonell-Estrany, MD.** Impact of severe disease caused by respiratory syncytial virus in children living in developed Countries, *Pediatr Infect Dis J,* 2003;22:S13-20
6. **Howard B. Panitch, MD.** Respiratory syncytial virus bronchiolitis: supportive care and therapies designed

- to overcome airway obstruction, *Pediatr Infect Dis J,* 2003;22:S83-8
7. **Leonard E. Weisman, MD.** Populations at risk for developing respiratory syncytial virus and risk factors for respiratory syncytial virus severity: infants with predisposing conditions., *Pediatr Infect Dis J,* 2003;22:S33-9
8. **H. Cody Meissner, MD.** Selected populations at increased risk from respiratory Sincicial virus infection, *Pediatric Infect Dis J,* 2003; 22:S40-5
9. **Robert C. Welliver, MD.** Respiratory Sincicial virus and other respiratory viruses, *Pediatric Infect Dis J,* 2003;22:S6-12
10. **Hernán Sepúlveda et al.** Ventilación mecánica en lactantes con infección grave por virus respiratorio sincicial en UCI. Brote invierno 2000. Unidad de Cuidados Intensivos Hospital Roberto del Río, año 2000.
11. **M. Moreno García, M.J. Gómez Rodríguez y E. Barreiro Miranda.** *An Esp Pediatr* 2000; 53: 30-39.
12. **Lecciones de anatomía patológica,** Benedicto chuaqui, ed. universidad católica, 1999.
13. **Manual de pediatría,** ed. universidad católica, 1999.

Correspondencia:
José Miguel Flores Martínez
Email: floresj@terra.cl

TASAS DE INCIDENCIA Y CARACTERIZACIÓN DE SARCOMAS EN LA PROVINCIA DE VALDIVIA (1999-2003)

SERGIO VARELA C¹, PAULA VALENZUELA S¹, MATÍAS MIRALLES¹, DR. CRISTIÁN CARRASCO L².

RESUMEN

Antecedentes: Los sarcomas primarios de hueso y de tejidos blandos son neoplasias infrecuentes. Los sarcomas de tejidos blandos más comunes son fibrohistiocitoma maligno, liposarcoma y leiomiomasarcoma, los sarcomas de hueso más comunes son osteosarcoma, condrosarcoma y sarcoma de Ewing. La frecuencia relativa de cada tipo histológico presenta variaciones etáreas. **Método:** Identificamos los casos de sarcomas diagnosticados en la provincia de Valdivia en el período 1999-2003, analizando incidencia y características generales. **Resultados:** Encontramos una incidencia de entre 2,8-6,2/100.000 hab. Hubo predominio de la población masculina (55%). La edad de presentación promedio fue 50,4 años. El tipo histológico más frecuente fue el fibrohistiocitoma maligno y la localización más frecuente fue la visceral. **Discusión:** Encontramos similitudes con la literatura internacional en cuanto a incidencia, edad de presentación, tipo histológico más frecuente y tipo de tejido de origen. Se observó diferencias en cuanto a localización anatómica y distribución por sexo.

Palabras Claves: *Pneumocystis jiroveci*, surfactante, síndrome de muerte súbita.

INTRODUCCIÓN

Los tumores malignos de origen mesenquimal, representan menos del 1% de las neoplasias malignas, tradicionalmente se han dividido en dos grandes grupos, aquellos originados de partes blandas y los originados en hueso. La mayoría de los sarcomas se originan de novo, pero un pequeño porcentaje se origina en tejidos dañados como cicatrices o áreas expuestas a radiación (1).

La documentación sobre la incidencia de sarcoma es escasa. Las tasas de incidencia publicadas varían dependiendo de que tumores son clasificados como sarcomas, aunque algunas publicaciones coinciden en una incidencia de 2-3/100,000 habitantes en EEUU (2).

El Servicio de Salud de Valdivia cuenta con el "Registro poblacional de cáncer de la provincia de Valdivia" que publicó el informe trienio 1998-2000, en él que se describieron 15 nuevos casos de neoplasias malignas de ubicación primaria en tejidos blandos y 16 casos de localización primaria en hueso y articulaciones (3). Estas estadísticas aunque proveen cierta orientación no permite conocer si se trata exclusivamente de sarcomas, no incluye a los sarcomas originados en otros tejidos y no permite caracterizar estas neoplasias.

Los sarcomas de tejidos blandos más comunes son fibrohistiocitoma maligno, liposarcoma y leiomiomasarcoma. Los sarcomas de hueso más comunes son osteosarcoma, condrosarcoma y sarcoma de Ewing.

La localización más frecuente es en extremidades inferiores (45%), seguido por extremidades superiores (15%), cabeza y cuello (10%), retroperitoneo (15%), pared abdominal y torácica (15%). Sarcomas viscerales que se originan en tejido conectivo de órganos parenquimatosos constituyen la minoría de los casos (4).

La distribución de los distintos tipos histológicos varía de acuerdo a los grupos etáreas estudiados. Los rhabdomyosarcomas se presentan más frecuentemente en niños y adultos jóvenes. Los sarcomas sinoviales se presentan en adultos jóvenes. El fibrohistiocitoma maligno y liposarcoma son más comunes en adultos mayores (4).

En un estudio que comprendía 1.789 casos diagnosticados como sarcoma entre el 1 de Enero de 1987 a 31 de Diciembre de 1996, el 52% correspondían a mujeres. Este grupo describió un 37.9% con localización primaria en tejidos blandos, 14.2% derivaban de hueso y 47.9% se encontró en otros tejidos. En cuanto a distribución etárea se observó que un 1% de los pacientes tenían menos de 1 año y el 75% de los casos diagnosticados tenían más de 35 años. La edad promedio de diagnóstico fue 52.4 años y la mediana se estableció en 57 años (5).

En nuestro país existen escasos reportes respecto de la incidencia y distribución de los distintos tipos de sarcomas, por lo tanto para manejo de tasas nos basamos en estudios internacionales que no representan la realidad

¹ Estudiante 6° año Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.

² Médico Cirujano, Especialista en Anatomía Patológica, Hospital Clínico Regional Valdivia, Profesor Adjunto del Instituto de Anatomía y Patología de la Universidad Austral de Chile.

geográfica y étnica de nuestro país. Los objetivos de este estudio son determinar la incidencia de los sarcomas y caracterizar a la población afectada según sexo, edad, tejido de origen, tipo histológico y localización anatómica, en la provincia de Valdivia.

Se infiere que los sarcomas en la población chilena en general, y en la provincia de Valdivia en particular, son neoplasias de baja incidencia. Estas neoplasias presentan una distribución propia a cada grupo étnico.

MATERIAL Y MÉTODO

Se revisó todas las biopsias enviadas al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Regional de Valdivia y al Laboratorio de Histología y Citología de Valdivia (entidad privada), durante el periodo comprendido entre el 01 de Enero de 1999 y 31 de Diciembre de 2003. Se incluyó en el estudio a aquellos pacientes cuya fecha de incidencia estuviese comprendida en el periodo de tiempo establecido.

En el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Valdivia se reciben biopsias de todos los hospitales pertenecientes al Servicio de Salud de Valdivia y en el Laboratorio de Histología y Citología de Valdivia se reciben biopsias de la población privada de la provincia. Ambos servicios reciben biopsias de otras procedencias distintas a la provincia de Valdivia, las que fueron descartadas para este trabajo.

Las tasas de incidencia se calcularon por 100 000 habitantes, considerando la población de la provincia de Valdivia, para cada año estudiando de acuerdo al INE (6): 353.433 habitantes el año 1999, 355.609 el año 2000, 357.625 el año 2001, 359.626 el año 2002 y 361.594 el año 2003. El error estándar para cada una de ellas se calculó según $\bar{O}^{(p \times q) / n}$

En cada caso de sarcoma se registraron datos generales como edad, sexo, procedencia del paciente. En el análisis de los hallazgos histológicos se determinó el tejido de origen: hueso, tejidos blandos (incluyendo sarcomas viscerales en el grupo de tejidos blandos) y origen incierto, definidos estos últimos como aquellos tumores en que no es posible especificar origen óseo o en tejidos blandos dado la extensión de la lesión; también se estableció tipo histológico y localización anatómica.

RESULTADOS

1. Tasas de incidencia de Sarcomas

La incidencia de los sarcomas por 100.000 habitantes se determinó para cada año estudiado, como se muestra en la figura 1. Y se determinó el error estándar para cada una de ellas.

2. Distribución de Sarcomas

Se encontraron 73 biopsias positivas para sarcomas, que cumplieran con los requisitos establecidos en el método, estas fueron distribuidas según tipo histológico de acuerdo a la clasificación establecida por Enzinger (7). Destaca un predominio del fibrohistiocitoma maligno lo que se corresponde con lo observado en series internacionales, seguido por leiomioma, osteosarcoma y condrosarcoma (figura 2).

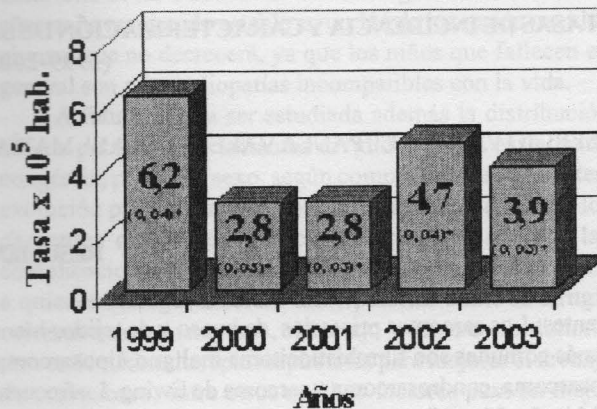


Figura 1: incidencia de sarcomas en la provincia de Valdivia (1999-2003)

* error estándar (0/0000)

La distribución según el tejido de origen se muestra en la figura 3.

3. Análisis por sexo y por edad

3.1 Distribución por sexo:

Considerando la totalidad de sarcomas y su distribución por sexo, se observa un leve predominio en la población masculina correspondiendo a un 55% (figura 4).

3.2 Distribución por Edad:

En cuanto a la edad de presentación para ambos sexos, como se ve en la figura 5, existe un predominio en edades medias de la vida, con un peak en el intervalo de 40-59 años. Con un promedio de edad de presentación de 50,4 años y una mediana de 52 años.

3.3 Distribución según sexo y edad

La edad de presentación promedio para la población femenina, fue de 52 años y para la población masculina de 49 años. La mediana para la edad de presentación masculina fue 51,5 años y para la población femenina 52 años (figura 5).

4. Localización Anatómica.

En cuanto a la localización corporal de los sarcomas de tejidos blandos, estos se encuentran en mayor proporción en vísceras, correspondiendo al 34,0%, seguido de extremidades inferiores con un 20,8%, como se muestra en la figura 6. En el caso de los sarcomas de hueso la localización predominante es la pelvis, con un 50,0%, seguido de las extremidades inferiores con 22,2% (figura 6).

5. Distribución según grupo étnico y diagnóstico histológico

En edad pediátrica y adolescente (0-19 años) el tipo histológico predominante es el rhabdomyosarcoma, con un 36,4%. En la edad adulta (20-59 años) predomina el leiomyosarcoma, con un 11,1%. En el adulto mayor (60-99 años) destaca el fibrohistiocitoma maligno con un 23,1% (figura 7).

DIAGNOSTICO HISTOLOGICO	N° DE CASOS	DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL (%)
FIBROSARCOMA	1	1,37
DERMATOFIBROSARCOMA PROTUBERANS	2	2,74
FIBROHISTIOCITOMA MALIGNO	9	12,33
LIPOSARCOMA	4	5,48
LEIOMIOSARCOMA	8	10,96
RABDOMIOSARCOMA	4	5,48
ANGIOSARCOMA	4	5,48
SARCOMA DE KAPOSI	3	4,11
MESOTELIOMA	4	5,48
SARCOMA DE CELULAS CLARAS	2	2,74
SARCOMA DE EWING	3	4,11
CONDROSARCOMA	6	8,22
OSTEOSARCOMA	6	8,22
SARCOMA SINOVIAL	3	4,11
SARCOMA EPITELOIDEO	1	1,37
SARCOMA INDIFERENCIADO	4	5,48
SARCOMA DE TEJIDO NERVIOSO (*)	5	6,85
SARCOMA DE ESTROMA ENDOMETRIAL	4	5,48
TOTAL	73	100,01

Figura 2: distribución de sarcomas según diagnostico histológico en la provincia de valdivia (1999-2003)

* sarcoma de tejido nervioso (incluye tmvnp, neuroblastoma, neuroblastoma olfatorio)

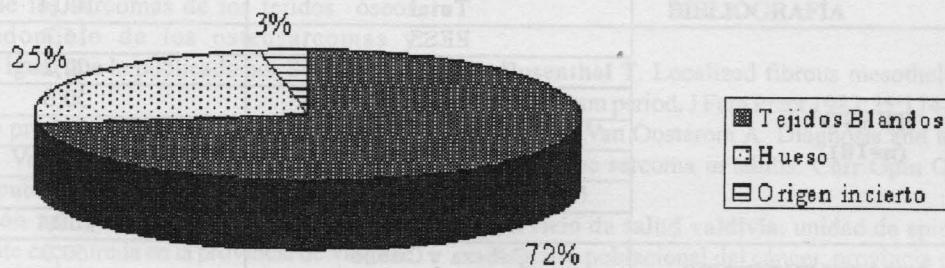


Figura 3: Distribución de sarcomas según tejido de origen, provincia de Valdivia (1999-2003)

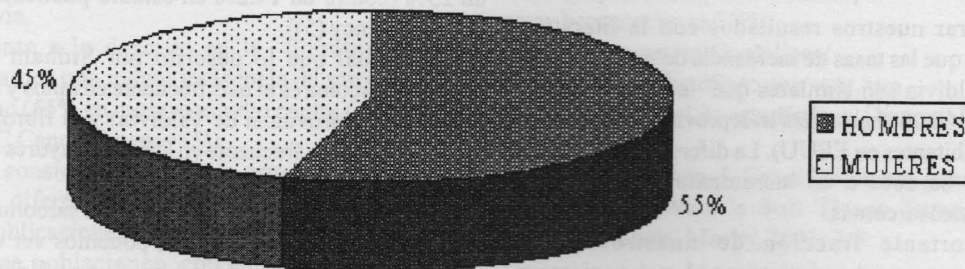


Figura 4: Distribución de sarcomas según sexo, provincia de Valdivia (1999-2003)

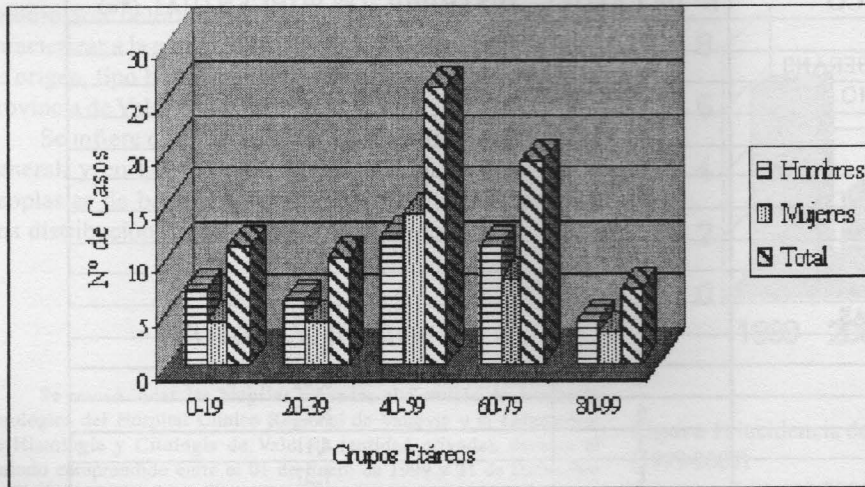


Figura 5: Distribución de sarcomas según grupo etáreo y sexo en la provincia de valdivia (1999-2003)

TEJIDOS BLANDOS (n=53)	Cabeza y Cuello	9,4
	Retroperitoneo	1,9
	EES	15,1
	EII	20,8
	Viscerales	34,0
	Pared torácica y Abdominal	11,3
	Paratesticulares	3,8
	Otras	3,8
Total	100,1	
HUESO (n=18)	EES	16,7
	EII	22,2
	Pelvis	50,0
	Columna Vertebral	0,0
	Cráneo y Cara	5,6
	Caja Torácica	5,6
	Total	100,1
TEJIDOS ORIGEN INCIERTO (n=2)	Cabeza y Cuello	50,0
	Tórax	50,0
	Total	100,0

Figura 6: Distribución de la localización anatómica de los sarcomas según tejido de origen, provincia de valdivia (1999-2003)

DISCUSIÓN

Al comparar nuestros resultados con la literatura revisada, vemos que las tasas de incidencia de sarcoma en la provincia de Valdivia son similares que las reportadas en EEUU (2,8-6,2/100.000 habitantes en la provincia de Valdivia, 2-3/100.000 habitantes en EEUU). La diferencia observada en el año 1999 se debe a un incremento puntual de la incidencia de osteosarcomas.

Una importante fracción de nuestros casos correspondió a sarcomas de origen visceral, que no siempre son incluidos por todos los autores.

Con respecto a los tejidos de origen, el 72% de estos corresponde a los tejidos blandos, dato que no es comparable con la literatura internacional por no existir consenso con respecto a la inclusión de algunos tumores como sarcomas

de tejidos blandos. El tejido óseo estaba comprometido en un 25% (contra un 14.2% en estudio publicado por la BC Cancer Agency (5)).

Al igual que lo descrito por Sidham et al (4) el rhabdomyosarcoma es el más frecuente en niños y adolescentes (36.4% en la provincia de Valdivia) y el fibrohistiocitoma maligno es el más frecuente en adultos mayores (23.1% en la provincia de Valdivia).

Al analizar la distribución de los sarcomas de tejidos blandos según tipo histológico, podemos ver coincidencia entre nuestro estudio y lo publicado por Sidham et al. (4) respecto al tipo histológico más frecuente, el fibrohistiocitoma maligno.

Además en nuestro estudio vimos una importante incidencia de leiomyosarcoma (10.96%) que probablemente se debe a la inclusión de los sarcomas viscerales. En relación

DIAGNOSTICO HISTOLOGICO	DISTRIBUCION (%)		
	0-19 años	20-59 años	60-99 años
FIBROSARCOMA	0,0	2,8	0,0
DERMATOFIBROSARCOMA PROTUBERANS	0,0	2,8	3,8
FIBROHISTIOCITOMA MALIGNO	0,0	8,3	23,1
LIPOSARCOMA	0,0	5,6	7,7
LEIOMIOSARCOMA	0,0	11,1	15,4
RABDOMIOSARCOMA	36,4	0,0	0,0
ANGIOSARCOMA	0,0	8,3	3,8
SARCOMA DE KAPOSI	0,0	2,8	7,7
MESOTELIOMA	0,0	5,6	7,7
SARCOMA DE CELULAS CLARAS	9,1	2,8	0,0
SARCOMA DE EWING	18,2	2,8	0,0
CONDROSARCOMA	0,0	8,3	11,5
OSTEOSARCOMA	18,2	8,3	3,8
SARCOMA SINOVIAL	0,0	5,6	3,8
SARCOMA EPITELOIDEO	0,0	2,8	0,0
SARCOMA INDIFERENCIADO	0,0	8,3	3,8
SARCOMA DE TEJIDO NERVIOSO (*)	18,2	5,6	3,8
SARCOMA DE ESTROMA ENDOMETRIAL	0,0	8,3	3,8
TOTAL	100,1	100,1	99,7

Figura 7: Distribución de sarcomas según tipo histológico y grupo etáreo, provincia de Valdivia (1999-2003)

* sarcoma de tejido nervioso (incluye tmvnp, neuroblastoma, neuroblastoma olfatorio)

a la distribución de los sarcomas de los tejidos óseos encontramos predominio de los osteosarcomas y condrosarcomas, al igual que lo publicado por Sidham et al (4).

Las edades de presentación de sarcomas encontradas en la provincia de Valdivia prácticamente no presentan diferencias con las publicadas por BC Cancer Agency (5).

La localización anatómica de sarcoma de tejidos blandos más frecuente encontrada en la provincia de Valdivia fue la visceral (34,0%), seguido por la de extremidades inferiores con un 20,8%. Sidham et al (4) presenta como localización más habitual las extremidades inferiores (45%) y al contrario de nuestros resultados los sarcomas viscerales representan una pequeña minoría. En cuanto a la localización anatómica de los sarcomas óseos los lugares más frecuentes son pelvis (50%) y extremidades inferiores (22, 2%) en la provincia de Valdivia.

Contrariamente a lo descrito en la literatura ya publicada encontramos una mayor incidencia de sarcomas en el sexo masculino (55% en nuestro estudio contra un 48% publicado por la BC Cancer Agency (5)).

Tomando en consideración el bajo error estándar, y que no existe una diferencia significativa entre nuestros resultados y las publicaciones internacionales, a pesar de tratarse de distintas poblaciones, creemos que nuestros resultados pueden ser extrapolados a la población nacional general. Con excepción de la localización anatómica de los sarcomas de tejidos blandos, que presenta valores propios de la provincia, que podrían asociarse a una diferencia en la clasificación u a otro factor no determinado.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Rosenthal T.** Localized fibrous mesothelioma in the postpartum period. *J Fam Pract* 1987;25:174-5.
2. **Dirix L, Van Oosterom A.** Diagnosis and treatment of soft tissue sarcoma in adults. *Curr Opin Oncol* 1994; 6:372-383.
3. **Servicio de salud valdivia,** unidad de epidemiología. Registro poblacional del cáncer, provincia de Valdivia, informe trienio 1998-2000. Marzo 2003.
4. **Shidham V, Sacker S, Vesole D, Hackbarth D.** Benign and Malignant Soft Tissue Tumors. *Neoplasms, orthopedic surgery, emedicine specialties.* Disponible en: <http://www.emedicine.com/orthoped/topic377.htm>
5. **Bc cancer agency.** Musculoskeletal and Sarcoma. 1. Demographics. Disponible en: <http://www.bccancer.bc.ca/HPI/CancerManagementGuidelines/MusculoskeletalandSarcoma/start.htm>
6. **Instituto nacional de estadísticas.** Disponible en: <http://www.ine.cl>
7. **Weiss S, Goldblum J.** Consideraciones generales. En: *Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors, fourth edition.* St. Louis: Mosby, 2001; 7-8.

Correspondencia:

Regimiento Membrillar, Coronel Santiago Bueras s/n, Valdivia.
063-208239, 95196815. Sergiovarelac@surnet.cl,
sergiovarelac@hotmail.com.

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ALGUCIDA DE LA BACTERIA *Cytophaga* sp. ASOCIADA AL DINOFLAGELADO TÓXICO *Alexandrium catenella*

SOLEDAD P. UGARTE¹, ADELHEIT B. SCHNEIDER¹, ALICIA I. SCIARAFFIA¹, DRA. ANA M. AMARO²

RESUMEN

Alexandrium catenella ACCO1, es una microalga tóxica causante de los florecimientos algales nocivos (FAN) en el sur de Chile. Asociada a ella, se han aislado e identificado, las bacterias, *Cytophaga* sp. AMA-01. *Pseudoalteromonas* sp. AMA-02. y *Ruegeria atlantica* AMA-03. El género *Cytophaga* ha sido previamente aislado de muestras de agua obtenidas al término de los florecimientos algales de diatomeas, rafidofitos y dinoflagelados lo cual ha llevado a algunos autores a sugerir que posee una propiedad alguicida contra microalgas tóxicas. En este estudio se determinó la actividad citolítica de *Cytophaga* s.p AMA-01, observando el efecto del sobrenadante del cultivo bacteriano crecido hasta fase estacionaria, sobre un cultivo de *Alexandrium catenella*. Las proteínas del sobrenadante, aisladas por precipitación con sulfato de amonio, presentaron una actividad citolítica de un 90% a las 48 horas. Las actividades enzimáticas encontradas en el sobrenadante fueron: Fosfatasa alcalina, Esterasa lipasa, Lipasa, Leucina arilamidasa, Fosfatasa ácida y Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa.

Palabras Claves: alexandrium catenella, cytophaga, actividad bacteriana alguicida.

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son parte integral del ecosistema marino, sin embargo, bajo ciertas condiciones ambientales, 60 especies causan una proliferación explosiva nociva, denominada "Floraciones Algales Nocivas" (FAN), liberando toxinas al mar. Las FAN son conocidas comúnmente como Marea Roja por el cambio de coloración del agua. En Chile, las FAN serían causadas por los dinoflagelados tóxicos *Alexandrium catenella* y *Dinophysis acuta* y, por otro lado algunas diatomeas del género *Pseudo-nitzschia*; las que generan toxinas marinas, (toxina paralizante o PSP, diarreica o DSP y amnésica o ASP, respectivamente). Investigaciones recientes muestran que existen bacterias en simbiosis con dinoflagelados tóxicos, siendo parte integral de su ambiente físico. El rol de ellas en la dinámica de las FAN no está claramente establecido; sin embargo, se señala que podrían ser importantes reguladores de su crecimiento y toxicidad.⁽¹⁾⁽²⁾⁽⁹⁾ Algunos autores postulan que algunas bacterias presentarían un efecto alguicida directo, para el cual es necesario un contacto físico⁽¹⁾, otros estudios revelan evidencias suficientes para postular que el efecto alguicida sería indirecto, a través de la liberación de sustancias capaces de desintegrar la

microalga⁽²⁾, siendo esto último lo más aceptado. El rol bacteriano en los niveles de toxicidad de las microalgas es complejo ya que se ha demostrado que ambos organismos son capaces de sintetizar toxinas de forma independiente⁽³⁾.

Alexandrium catenella se asocia a las FAN en Chile desde 1972. Asociada a ella, se han aislado e identificado, en el Laboratorio de Toxinas Marinas, la bacteria, *Cytophaga* sp. AMA-01⁽⁷⁾⁽⁸⁾. El rol que ella desempeña no es aún claro. Estudios demuestran que a medida que el cultivo de *Alexandrium catenella* llega a fase estacionaria, hay un aumento en el conteo y ataque de las bacterias sobre el dinoflagelado, desconociéndose el mecanismo que gatilla el ataque⁽⁴⁾. Se postula que las bacterias requieren cierta densidad numérica o "quórum sensing" antes de que el factor alguicida se exprese.⁽⁵⁾ Si bien se describe un efecto alguicida por parte *Cytophaga* sp. sobre la microalga, se desconoce aún cómo es capaz de matar al dinoflagelado.

El objetivo de nuestra investigación es determinar y analizar las características de la actividad alguicida de la bacteria *Cytophaga* sp. sobre cultivos del dinoflagelado tóxico *Alexandrium catenella* y sobre cultivos de un dinoflagelado no tóxico.

¹ Estudiantes 4º año Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

² Laboratorio de Toxinas Marinas, Programa de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de las microalgas: Dos algas fueron utilizadas en el presente estudio: *Alexandrium catenella* cepa ACC01, aislada por el Laboratorio del Instituto de Fomento Pesquero, IFOP, Puerto Montt, Chile; de una muestra colectada en abril de 1994 desde los mares de la región de Aysén, Chile (45° 32' S, 73° 34' O) (fotografía 1). La cepa fue cultivada en F/2, a 12°C, bajo ciclos de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. El dinoflagelado no tóxico *Heterocapsa* sp. SGMO1 obtenido desde los estanques del Centro de Cultivo de Abalón de la Universidad Católica del Norte, sede Coquimbo, fue cultivada y mantenida en laboratorio bajo las mismas condiciones que *A. catenella*. Para determinar las fases de latencia, exponencial y estacionaria de ambas algas se utilizó una curva de crecimiento realizada en el Laboratorio de Toxinas Marinas (2002), que mide la densidad celular por conteo directo de la población celular en una cámara de Sedgewick Rafter S50 (Graticules Ltd., Tonbridge, England).

Cultivo bacteriano: *Cytophaga* sp. fue aislada en el Laboratorio de Toxinas Marinas desde un cultivo de *Alexandrium catenella* ACC01. Para su crecimiento se empleó Agar Marino® como medio sólido, y F/2 suplementado con 0,25% de bactopectona, como medio líquido. Estos últimos fueron agitados a 25°C en un incubador termoregulado Environ Shaker Orbit a 120 r.p.m. Las fases de latencia, exponencial y estacionaria de *Cytophaga* sp. cultivada en medio líquido, se obtuvieron por una curva de crecimiento bacteriano, midiendo el crecimiento celular, por el aumento en la Absorbancia a 620nm de las muestras del cultivo tomadas cada 1 hora, para lo que se utilizó un Espectrofotómetro 4049 LKB Blochroom Novaspec.

Determinación del Efecto Alguicida Indirecto. Para eliminar la bactopectona del medio de cultivo, el sobrenadante libre de células obtenido por centrifugación a 10.000 xg, por 10 minutos, fue dializado en una membrana semipermeable SnakeSkin® de 10 KDa, contra F/2, en una relación 1:10 con tres cambios de F/2, durante 24 horas, en frío y con agitación. El sobrenadante dializado se esterilizó por filtración en membranas de nitrocelulosa de 0,2 mm (Advantec MFS, Inc.). A este sobrenadante se le llamó Sobrenadante Filtrado Dializado (SFD). La actividad alguicida se midió enfrentando el SFD a cultivos de *Alexandrium catenella* ACC01 en crecimiento exponencial (20000 células/ml), bajo condiciones normales de incubación de microalgas y en una relación de volumen 1:1 (volumen SFD / volumen cultivo de *A. catenella*). La sobrevivencia de la microalga se determinó por conteo directo en cámara de Sedgewick Rafter a las 24, 48 y 72 horas de incubación de las microalgas que sobreviven en presencia del sobrenadante.

Determinación de proteínas: La concentración de éstas en el sobrenadante del cultivo de *Cytophaga* sp., se determinó mediante el Método del Ac. Bicinconínico (Ref).

Detección de las actividades enzimáticas presentes en cultivos de *Cytophaga* sp: Para el análisis de las endo y exoenzimas presentes en el sobrenadante, se utilizó un kit comercial ApiZym (Biomerieux®) que corresponde a un micrométodo semicuantitativo, para detección rápida y simultánea de hasta 19 actividades enzimáticas.

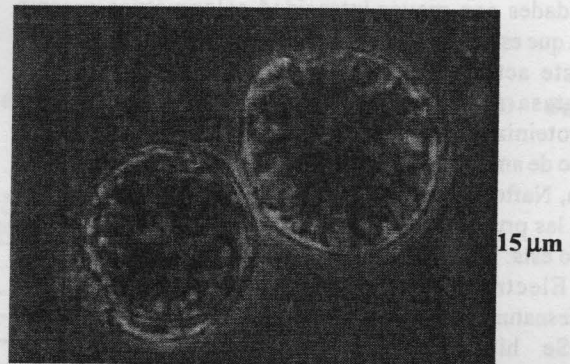
Obtención de proteínas concentradas y sobrenadante desproteínizado: Para determinar si el factor alguicida del sobrenadante de *Cytophaga* sp es de tipo proteico, se realizó una precipitación de proteínas con sulfato de amonio al 85% de saturación (5,59g cada 10ml de sobrenadante), obteniendo un pellet de proteínas concentradas y un sobrenadante desproteínizado.

Determinación del efecto alguicida de proteínas concentradas y sobrenadante desproteínizado: Se utilizó un cultivo de *Alexandrium catenella* en fase exponencial con concentración de 16000 cel/ml, del cual fueron obtenidas las muestras para ser enfrentadas a: a) sobrenadante desproteínizado del cultivo bacteriano de *Cytophaga* sp. previamente dializados contra F/2 y filtrado (Experimental 1), b) proteínas concentradas previamente dializadas contra F/2 y filtradas (Experimental 2), c) F/2 (Control). La sobrevivencia de la microalga se determinará por conteo directo en una cámara de Sedgewick Rafter a las 24, 48 y 72 horas de incubación de las microalgas que sobreviven en presencia del sobrenadante.

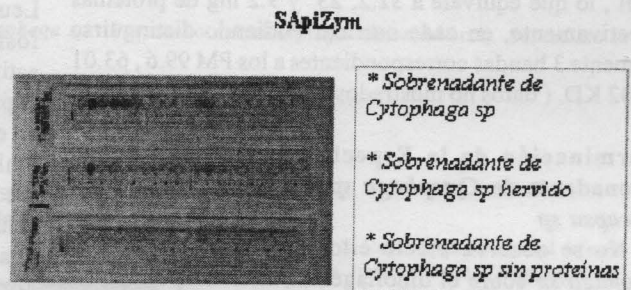
Patrones electroforéticos: Para analizar las proteínas presentes en los sobrenadante del cultivo bacteriano de *Cytophaga* sp se realizó electroforesis unidimensional (Laemli, 1970) en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE), utilizando geles de poliacrilamida al 15% y proteínas concentradas liofilizadas previamente.

Especificidad del efecto alguicida: El mismo procedimiento realizado para determinar la actividad alguicida en *A. Catenella*, se efectuó con el dinoflagelado *Heterocapsa* sp., para así determinar si el efecto alguicida de *Cytophaga* sp es específico para *A. catenella*.

Estadística: Dado el tiempo limitado para realizar los experimentos, sólo se hicieron en duplicado, y esto sólo permitió realizar un análisis porcentual de sobrevivencia.



Fotografía 1. Microfotografía de *Alexandrium catenella* cepa ACC01, Microscopio de Luz Invertido (40x) (Laboratorio de Toxinas Marinas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, 2004)



Fotografía 2. kit ApiZym (Biomerieux®)

RESULTADOS

Efecto Alguicida Indirecto.

Actividad Alguicida SFD de *Cytophaga* sp en Cultivo de *A. catenella*. El Gráfico 1 muestra el efecto alguicida que ejerce el SFD de *Cytophaga* sp AMA-01, sobre las células de un cultivo en crecimiento exponencial de *A. catenella* ACC01. El control negativo F/2-Si, mostró crecimiento celular a las 24 y 48 horas. Se verifica la existencia de actividad alguicida presente en el SFD *Cytophaga* sp al disminuir la población de células de *A. catenella* expuesto a SFD por un período de 72 horas bajo las condiciones antes descritas, a la vez que es posible observar el crecimiento normal de la población control. Creo que para esto es bueno explicar aquí en una sola figura

el efecto alguicida del sobrenadante total, del las proteínas del sobrenadante concentradas y del sobrenadante desproteinizado.

Caracterización del efecto alguicida. *Cytophaga sp*

a) Determinación las actividades enzimáticas presentes en el sobrenadante del cultivo bacteriano (ApiZym).

El sobrenadante de *Cytophaga que* contenía 0,9280 mg/ml de proteínas, presentó las actividades enzimáticas señaladas en la Tabla 1. El SFD completo presenta actividad: Fosfatasa alcalina, Esterasa, Esterasa lipasa, Lipasa, Leucina arilamidasa, Fosfatasa ácida, Naftol AS-BI- fosfohidrolasa. Las proteínas concentradas presentan las mismas actividades con mayor intensidad colorimétrica excepto lipasa que está ausente. En el SFD hervido durante 7 minutos persiste actividad fosfatasa alcalina, Esterasa lipasa, Fosfatasa ácida, Naftol AS BI fosfohidrolasa. Tras desproteinizar persisten en el sobrenadante tratado con sulfato de amonio las actividades fosfatasa alcalina, Esterasa lipasa, Naftol AS BI fosfohidrolasa. Cabe destacar que en todas las pruebas enzimáticas se mantiene la actividad 12, siendo ésta: Naftol-AS- BI fosfohidrolasa.

b) Electroforesis unidimensional en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE).

Se hicieron dos electroforesis de las proteínas concentradas obtenidas del cultivo de *Cytophaga sp* en fase exponencial. La primera en gel al 12% obteniéndose sólo 2 bandas con PM de 63.09 y 54.95 KD. Luego se utilizó un gel al 15% y se corrieron muestras de distintos volúmenes 35,25 y 10ml, lo que equivale a 32.2, 23 y 9.2 mg de proteínas respectivamente, en cada corrida. Pudiendo distinguirse claramente 3 bandas correspondientes a los PM 99.6, 63.01 y 56.02 KD. (datos no mostrados)

Determinación de la Especificidad Alguicida del Sobrenadante de *Cytophaga sp* sobre el dinoflagelado *Heterocapsa sp*

No se observa efecto citolítico del sobrenadante *Cytophaga sp* sobre el dinoflagelado *Heterocapsa sp*. La población aumenta en ambas condiciones.

DISCUSIÓN

El objetivo de esta investigación fue determinar la existencia de un efecto alguicida por parte del sobrenadante del cultivo bacteriano de *Cytophaga sp* sobre el dinoflagelado *A.catenella*, de manera tal de poder ser utilizado en investigaciones posteriores que pudieran hacer uso de este rol alguicida como método de control de la Marea Roja. Esto ya ha sido descrito por otros autores (Kim et al., 1998; Yoshinaga et al, 1999; Nagasaki et al, 2000), y actualmente hay variadas investigaciones en curso.

El efecto de la bacteria sobre la toxicidad de los dinoflagelados del género *A.catenella* en cultivo ha sido un tema controversial por décadas (Gallacher & Smith, 1999),

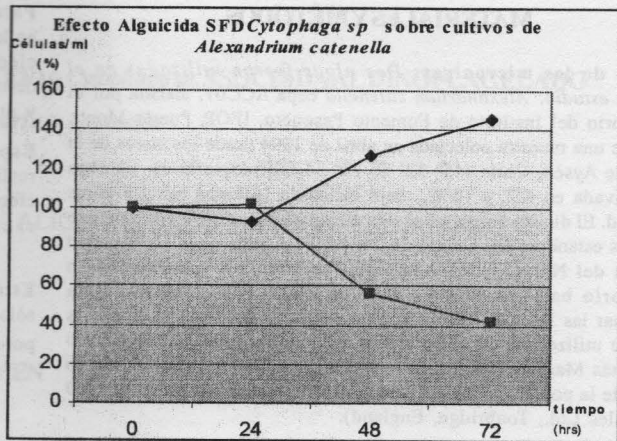


Gráfico 1: Determinación del Efecto Alguicida Indirecto: Efecto Alguicida de *Cytophaga sp*. AMA-01 sobre *Alexandrium catenella* cepa ACC01. Evalúa la sobrevivencia del dinoflagelado en condiciones control en F/2 y en presencia del SFD de *Cytophaga sp* a las 0, 24, 48 y 72 hrs.

centrándose sólo en las bacterias como tal y no en los compuesto(s) excretados por éstas. En esta investigación se encontró que compuesto(s) liberados por *Cytophaga sp* en contacto directo (sobrenadante completo) con cultivos de *A. catenella* si afectan en el crecimiento. Este sobrenadante del cultivo bacteriano poseería algún tipo de compuesto(s) que afectan negativamente el crecimiento de *A. Catenella*., produciéndose la lisis de gran parte de la población del cultivo. El SFD presentaba las siguientes actividades enzimáticas: Fosfatasa alcalina, Esterasa lipasa, Lipasa, Leucina arilamidasa, Fosfatasa ácida y Naftol-AS-BI- fosfohidrolasa, éstas podrían estar participando en la actividad citolítica presente en el sobrenadante. Posterior a la precipitación de la mayor parte de las proteínas presentes en este sobrenadante, la actividad citolítica se redujo. Sin embargo la fracción de proteínas concentradas por precipitación con sulfato de amonio produjo también lisis celular, pese a perder las actividades enzimáticas esterasa, lipasa, fosfatasa ácida y leucina arilamidasa; las que podrían corresponder a actividades propias de las proteínas precipitadas. La electroforesis reveló la presencia de 3 bandas que corresponderían a proteínas de PM 100, 63.09 y 54.95.

Se debe hacer mención a que, en el sobrenadante desproteinizado se siguió observando la actividad alguicida, lo que nos lleva a postular que, o bien habrían persistido proteínas en el, posterior a la precipitación de estas, o bien, que existiría otro factor, no proteico, involucrado en la actividad citolítica de *Cytophaga sp*.

Skerratt et al, 2002 postula que el mecanismo alguicida de las bacterias no es enzimático, ya que sometió un sobrenadante alguicida a distintas temperaturas, encontrando que no desaparecía el efecto tóxico después de ser tratados con calor (hasta 120°C), sin embargo en nuestra investigación, pudimos determinar que si se sometía el sobrenadante de *Cytophaga sp* a ebullición a 110°C por 7 minutos, persistían las actividades enzimáticas esterasa, lipasa, leucina arilamidasa, fosfatasa ácida y Naftol-AS- BI- fosfohidrolasa.

Para usar las propiedades líticas relacionadas con *Cytophaga sp.* como posible método de control de Mareas Rojas es preciso determinar si su actividad alguicida es específica para el dinoflagelado *A. catenella*. Para esto, se enfrentó al dinoflagelado *Heterocapsa sp.* al SFD de *Cytophaga sp.* comprobándose que, al menos en este caso, el compuesto(s) lítico carecen de efecto. Deben realizarse otros estudios que determinen de manera global la especificidad de *Cytophaga sp.* sobre *A. Catenella*, pues el que en nuestra investigación hayamos descartado a *Heterocapsa sp* no significa que todos los dinoflagelados no sean afectados por la acción lítica de *Cytophaga sp.*

En la actualidad ya ha quedado claro que las interacciones bacteria-fitoplancton son mucho más complejas de lo que se pensaba originalmente (e.g. Dantzer & Levin, 1997; Gallacher & Smith, 1999; Hold y col., 2001), y esto determina que múltiples investigaciones deberán realizarse antes de poder llegar a vislumbrar su uso como método de control de las FAN.

Este estudio es simplemente uno más entre ellos y esperamos pueda ser utilizado como paso inicial a futuras investigaciones las que puedan repetirlo y determinar su validez estadística.

Tabla 1: Actividades Enzimáticas extracelulares (exoenzimas) obtenidas del SFD de *Cytophaga sp.*-

ENZIMA	REACCION	SFD <i>Cytophaga sp.</i> COMPLETO	SFD <i>Cytophaga sp.</i> DESPROTEINIZADO	SFD HERVIDO	Proteínas Concentradas
control	-	-	-	-	-
Fosfatasa alcalina	Violeta	+++	+	+	+++
Esterasa	Violeta	++	-	-	++
Esterasa lipasa	Violeta	+++	+	+	++
Lipasa	Violeta	+++	-	-	-
Leucina arilamidasa	Naranja	++	-	-	++
Fosfatasa acida	Violeta	+	-	+	++
Nafol AS BI fosfolidolasa	Azul	+	+	+	+++

Detección de las actividades enzimáticas presentes en cultivos de *Cytophaga sp.* Por medio del kit ApiZym (Biomerieux). Se analizó la actividad enzimática presente en el sobrenadante *Cytophaga sp.*

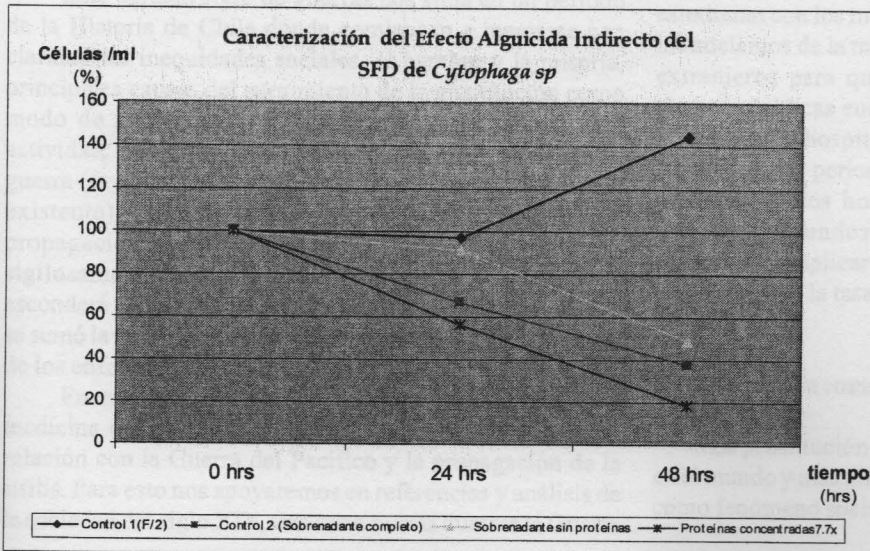


Gráfico 2 Caracterización del efecto alguicida indirecto de *Cytophaga sp.* Evaluó la sobrevivencia del dinoflagelado en condiciones control en F/2, sobrenadante filtrado dializado (SFD) completo, SFD desproteínizado y proteínas concentradas, de manera de determinar dónde radica el factor alguicida de *Cytophaga sp.* **CONTROL 1:** 5ml *A. Catenella* + 3ml F/2, **CONTROL 2:** 5ml *A. Catenella* + 3ml sobrenadante completo. **SOBRENADANTE DESPROTEINIZADO:** 5ml *A. Catenella* + 3ml sobrenadante desproteínizado. **CONCENTRADO DE PROTEINAS:** 5ml *A. Catenella* + 3ml proteínas concentradas del sobrenadante de *Cytophaga sp.* Se registraron los conteos a las 0, 24 y 48 hrs. en todos los grupos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Doctora Ana María Amaro del Departamento de Fisiología Celular, Universidad de Chile, a Daniel Carrasco y Sandra Ogalde por su colaboración y facilitación de laboratorio para la investigación. Financiado por FONDECYT.

BIBLIOGRAFÍA

1. LOVEJOY, C.; BOWMAN, J. 1998. Algicidal effects of a novel marine *Cytophaga* isolate (class *Proteobacteria*, Gamma subdivision) on Harmful Algal Bloom Species of the Genera *Chattonella*, *Gymnodium* and *Heterosigma*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(8): 2806-2812.
2. DOUCETTE, G.; KODAMA, M.; FRANCA, S.; GALLAGHER, S. 1998. Bacterial interactions with Harmful Algal Bloom Species: Bloom Ecology, Toxigenesis, and Cytology. *In: Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. D.M. Anderson, A.D.
3. SHIMIZU, Y.; GIORGIO, C.; KOERTING-WALKER, C.; OGATA, T. 1996. Non conformity of bacterial production of paralytic shellfish poisons-neosaxitoxin production by a bacterium strain from *Alexandrium tamarensis* Ipswich strain and its significance. *In: Harmful and Toxic Algal Blooms*. Yasumoto, T. Oshima, Y. Fukuyo, Y. (eds) IOC of UNESCO, Sendai, Japan, pp 359-362.
4. SIMON, N.; BIEGALA, I.; SMITH, I.; VAULOT, D. 2002. Kinetics of attachment of potentially toxic bacteria to *Alexandrium tamarensis*. *Aquat. Microb. Ecol.* 28:249-256.
5. SCHAUDER, S.; SHOKAT, K.; SURETTE, M.G.; BASSLER, B.L. 2001. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Molecular Microbiology*. 41(2):463-476.
6. AMARO, A.M.; VIDAL-ALVAREZ, R.; SUAREZ-ISLA, B.A.; FUENTES, S.; OGALDE, S.; 2001. Bacterial isolation and characterization from flora associated with the toxic Dinoflagellates. *In: 149 th Meeting Society for General Microbiology*. Norwich, England. 10-13 September 2001. University of East Anglia. U.K.
7. AMARO, A.M.; OGALDE, S.; FUENTES, S.; QUINTEROS, J.; SUAREZ-ISLA, B.A. 2002. Algicidal effects of two bacterial strains isolated from *Alexandrium catenella* cultures. *In: X International Conference on Harmful Algal*. St. Pette Beach, Florida, U.S.A. 21-25 October 2002.
8. BABIÑCHAK, J.A., E. R. MCGOVERN, AND G. J. DOUCETTE. 1998. Isolation and characterization of the bacterial flora associated with PSP-related dinoflagellate species, p. 410-413. *In: B. Reguera, J. Blanco, M. L. Fernández and T. Wyatt. (ed.), Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.

GUERRA, PROSTITUCIÓN Y SÍFILIS, UNA SOMBRA EN EL SIGLO XX

ERIKA T BECERRA C¹, MARÍA ANGÉLICA BELLO F¹, XIMENA CAMPOS M¹, CÉSAR LEYTON R².

RESUMEN

El siglo XIX es un periodo de profundos cambios, donde por las inequidades sociales, surge la prostitución como un modo de subsistir en las clases más desposeídas, siendo una actividad difícil de controlar, cuya consecuencia más funesta era el contagio de enfermedades venéreas, como la sífilis. Pese a existir preocupación entre las autoridades de la época, existía un total desconocimiento en la población general.

Durante la Guerra del Pacífico, la sífilis causa estragos en el reclutamiento de voluntarios, y muchas veces, no era detectada precozmente o los soldados se contagiaban estando en Campaña por la llegada de prostitutas enfermas, es así como en julio de 1879, se prohíbe que las tropas fuesen acompañadas por mujeres, medida que no fue seguida. Lamentablemente, las medidas tomadas para detener la expansión de la sífilis fueron tardías e insuficientes, y la tasa de infección se mantuvo alta durante toda la guerra.

Palabras Claves: sífilis, prostitución, venereología.

INTRODUCCIÓN

El siglo XIX comienza como un período pleno en decisiones de gran importancia para el futuro de nuestro país como Nación independiente; es durante ese siglo que cobran sentido palabras como: libertad, autonomía y patriotismo, que serán la base para la fuerte defensa desarrollada durante la Guerra del Pacífico. Es también un periodo de gran florecimiento económico, social, científico y cultural. Mas, pese a lo que pudiera esperarse, esta creciente época no sembró paz entre sus habitantes, sino muy por el contrario, generó una constante lucha por el poder.

Este agitado siglo de guerras nos sitúa en un período de la Historia de Chile donde comienzan a marcarse con claridad las inequidades sociales, el hambre y la miseria, principales causas del surgimiento de la prostitución como modo de subsistir de las clases más desposeídas. Esta actividad, que se ve incrementada durante las épocas de guerra (favorecida además por la casi nula reglamentación existente), llegando a ser un foco muy importante de propagación de enfermedades venéreas, arrastrándolas sigilosamente hacia el interior de las tropas, donde se esconderá un terrible enemigo: la sífilis, a cuya propagación se sumó la ignorancia, la vergüenza y la discriminación social de los enfermos.

En esta investigación revisaremos el desarrollo de la medicina del siglo XIX, el estado de la prostitución y su relación con la Guerra del Pacífico y la propagación de la sífilis. Para esto nos apoyaremos en referencias y análisis de la sociedad del siglo XIX, una carta escrita durante la Guerra

del Pacífico y un artículo publicado en el Diario "La Aurora de Chile".

Medicina de la Época

La medicina en Chile durante la segunda mitad del siglo XIX seguía la inquietud científica reinante en Europa y estaba haciendo grandes avances, particularmente en el desarrollo de las especialidades médicas. Bajo el decano J.J. Aguirre, la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile comenzó a enviar, a partir de 1874, médicos becados a Europa, para que estudiaran con los mejores profesores de la época y trajeran los adelantos de la medicina. A su vez se contrató a médicos extranjeros para que enseñaran las nuevas y modernas técnicas médicas europeas.

Nuevos hospitales se construyeron en Chile, y los hospitales del periodo Colonial fueron modernizados. La medicina en los hospitales había mejorado mucho y se realizan profundos avances en la cirugía. Además se empezaron a aplicar los conceptos de antisepsia y asepsia disminuyendo la tasa de mortalidad en los establecimientos de salud.

La Prostitución como Fuente de Contagio

La prostitución es una de las actividades más antiguas en el mundo y más difícil de controlar, ya que, la prostitución, como fenómeno social y humano, está ligada a la Historia y

¹ Estudiante 4º año Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

² Profesor de Estado e Historia, Geografía y Educación Cívica y Lic. en educación de la Universidad de Frontera, Temuco. Candidato a Magister en Historia de Chile en la Universidad de Chile. Diplomado en Pensamiento de la Universidad Diego Portales

tiene diferentes dimensiones que deben considerarse, además de su multicausalidad en que confluyen una diversidad de elementos personales, familiares y sociales (1). Es tan complejo el tema que muchos autores al intentar simplificarlo han dejado de lado lo esencial de este problema y han relegado su causa a la miseria y el hambre hoy en día

El comercio sexual es una actividad difícil de reglamentar, tal vez el primer intento de reglamentación pueda hallarse en la antigüedad, cuando estas mujeres debían utilizar vestidos especiales, se les rasuraba la cabeza y eran obligadas a vivir en determinados sectores de la ciudad (2). En Chile, sin embargo, este tema es más complejo, basta recordar la servidumbre doméstica, el inquilinaje y otros servicios, en donde el patrón aprovechaba su condición de autoridad para satisfacer sus necesidades sexuales; lo cual era aceptado por la sociedad de la época, ya que los sirvientes pertenecían a sus dueños y éstos podían hacer con ellos lo que quisieran. Al llegar el siglo XIX, el término "prostitución" se fue masificando y aclarando, a la vez que se consolidaba un fuerte repudio social hacia él, asociándolo muchas veces con otros vicios de las clases sociales más pobres.

En 1836 se establecía en Chile el médico francés Francois-Julien Lafargue, verdadero iniciador de los trabajos anatómicos en nuestro país. Comenta sobre el estado de la prostitución en Chile y la pobre vigilancia existente: *"Es de extraordinaria frecuencia y gravedad, lo que es debido, por una parte, a la incuria de la policía, que jamás toma medidas sanitarias; por otra, a que apenas empiezan las mujeres afectadas un tratamiento cuando lo abandonan para continuar su oficio de cortesanas (...)* La prostitución no está vigilada ni reglamentada. Aquí todos miran la visita sanitaria como una opresión impía, como un atentado contra el pudor... la idea que se tiene sobre la dignidad de la mujer la sobrepone a todas las consideraciones higiénicas, y por más degradada que sea la prostitución, el carácter sagrado de su sexo las sustrae a visitas que la opinión condenaría como inmorales y opresivas" (3). Aquí observamos como la moral de esa época imputaba al sexo femenino un Tabú, del cual era "indigno" hablar y mucho más "mirar", lo cual complicaba los intentos por impartir un control sanitario sobre dicha actividad.

Sigue diciendo Lafargue: *"(...) reglamentar la prostitución es sancionarla, y la autoridad que descendiese hasta disciplinar las mujeres públicas pasaría por tiránica. En Chile se habla de la sífilis como si se tratara de un resfriado (...) en el hospital de mujeres una sifilitica pide su alta antes de su restablecimiento; no hay derecho alguno para detenerla contra su voluntad. En general, todo chileno, instruido o no, cree que el mal venéreo no merece que se ocupen de él hasta el punto de coartar la libertad y de alarmar el pudor del bello sexo"* (3). Podemos observar que la mentalidad de la época en Chile llevaba la "preocupación" por la enfermedad sólo cuando ésta, en cierta manera, les molestaba, es decir, no existía preocupación por prevenir, sólo se aplicaban tratamientos curativos; no existía en el pensamiento, el concepto de Higiene, ni siquiera entre las autoridades.

Lo cierto es que la sífilis reinaba espantosamente en Chile. Esto lo demuestran algunas estadísticas realizadas en la época. Así, por ejemplo, en 1814 ingresaban al Hospital de Nuestro Padre San Juan de Dios 2.101 enfermos, de los cuales 804 eran sifilíticos, es decir más de la tercera parte. Faltaban hospitales de enfermedades venéreas para acoger a todos los afectados que sufrían y seguían propagando la enfermedad. Sin embargo, como hace ver el Dr. Enrique Laval, bajo esta denominación se encontraban otras afecciones a la piel. Medio siglo después, Wenceslao Díaz, en una publicación que estudia las enfermedades que más afectan al soldado en Chile, coloca en primer lugar a las afecciones sifilíticas y venéreas (4).

Pero no toda la culpa recaía en las autoridades por no promover medidas de higiene, salubridad y control sobre la prostitución y el cumplimiento de los tratamientos. La excesiva propagación de este mal residía también en la ignorancia del pueblo. Para ellos, esta patología, era algo propio de los humores "todos nacían con una parte de humor venéreo", como algo fisiológico, integrante e incluso necesario del organismo, el cual los curanderos, yerbateros y meicas sabían curar mejor que el médico. Para ellos una "gonorrea sifilitica", no era más que una gripe, producida por una mala pisada o torcedura de cuerdas; y el chancro, una simple peladura por galopar en un caballo chúcaro con una estribera demasiado corta. Se propagaba de madre a hijos; *"Hacia sus conquistas buscando su morada en el asilo de la hermosura y del amor, estaba particularmente amalgamado con el humor prolífico, se transmitía hacia los hijos sin que estos pudieran purificarse en los momentos de la concepción"* (4). Tiernos infantes envenenados por las nodrizas sifilíticas. Y no sólo aparecía en el pueblo, sumido en un ambiente pobre y antihigiénico, pues tampoco respetaba a las familias adineradas, morales y religiosas. No se hablaba de ella, era un mal repugnante. La palabra "sífilis" estaba proscripta, pese a la grave amenaza que representaba, gracias a esto pudo causar estragos y gobernar tranquilamente durante este largo periodo.

En el año 1874, el médico Ramón Allende Padín, presidente del Consejo de Higiene Pública desde 1876, es el primero en llamar públicamente la atención sobre la necesidad de dictar un reglamento que combatiera los funestos estragos de la prostitución en la sociedad chilena, ya que según un trabajo suyo publicado un año antes, *"Un hombre sobrio de vida activa y de trabajo diario que desarrolla sus fuerzas y órganos por el trabajo regular y continuo, alternado con un descanso proporcionado, es siempre honrado, virtuoso, moral: esta por su ocupación misma apartado de la molición que engendra el ocio y arrastra a los vicios que embrutecen la inteligencia y degradan al hombre"* (5). Es fácil darse cuenta que entre los vicios a los que el doctor Allende Padín hace referencia, está ciertamente la prostitución. En ese mismo trabajo al que hemos hecho mención aparece un párrafo brillante que sigue vigente a través de los años *"La aplicación y observancia de los preceptos de la higiene pública determinan la salubridad de las ciudades, evitan las enfermedades y alejan las epidemias"* (5). Esto nos

demuestra que pese a lo que pudiera pensarse, existía plena conciencia en la época de la prostitución y los efectos que ésta podía tener en la salud de los habitantes como medio de propagación de diversas enfermedades.

Pese a todos los males que puede acarrear para una sociedad la prostitución sin ninguna reglamentación, probablemente una de las consecuencias más funestas es facilitar el contagio de afecciones de diversa naturaleza, sobre todo la propagación de enfermedades venéreas, las cuales a través del curso de la Historia, han sido tan difíciles de controlar. Es así como en 1822, el diputado Camilo Henríquez dice: *"El mal venéreo está extendido espantosamente entre las mujeres plebeyas, poco hace que los soldados se curen si no se extingue aquella sentina de enfermedad. Muchos hijos de familia se desgracian por esta misma causa"* (6), estableciendo en forma definitiva una estrecha relación entre las enfermedades venéreas y la prostitución y olvidando que si las clases más acomodadas de la sociedad se contagiaban, era porque ellas mismas requerían esta clase de servicios. Otro tópico relevante en las declaraciones del diputado es la relación entre las enfermedades venéreas y los soldados, tema que desarrollaremos más adelante.

Es interesante revisar un artículo aparecido en el año 1813 en el Diario La Aurora de Chile, donde un autor desconocido de iniciales J. M. S. escribe, refiriéndose a la sífilis y al estado de dicha enfermedad en Chile:

"El virus sifilitico se recibe con un inmediato contacto con la persona afecta: las acciones lasivas aumentan la accion del sistema sanguineo; el sistema vascular de la periferia esta en un estado de turgecencia, que comunica á las papilas nerviosas un gran eretismo; esta sensibilidad aumentada dispone al virus á ser introducido por el sistema absorbente de los organos genitales, y partes adyacentes en el cuerpo humano; de tal modo, que es necesaria una exaltacion en la sensibilidad para facilitar su contagio. Esta reflexion pathologica sirve mucho para demostrar que la lue venerea dificilmente se propaga de otro modo: y que el beber en vasos de personas afectas de ulceras venéreas en la boca, pocas veces ha introducido el virus en la constitución. Sin embargo debe cuidadosamente evitarse. Asi debe siempre atribuirse al desorden su introducción" (7). Nos podemos dar cuenta, por lo tanto, que en aquella época había una tendencia a identificar al "desorden" como el medio de contagio de dicha enfermedad, más adelante en el artículo el autor detalla al tipo de "desorden" al que se refiere diciendo...

"La inevitable prostitucion debiera esconderse de la vista de las familias pudicas y el gobierno tendria bajo un golpe de ojo el estado de salud de sus individuos" para luego continuar *"puede el Gobierno vigilar sobre la salud de aquellas infelices que se hallan contaminadas, y procurarlas un asilo para su curacion, comisionando á este fin á los Alcaldes de Barrios para su secreto informe con intervencion de algunos facultativos"*. Pero el autor del artículo "La Sífilis Causa Estragos en la Sociedad Chilena" no se detiene en sus afirmaciones y escribe *"La lue venerea seria mas benigna y no tan facil de propagarse si los baños*

fuesen mas comunes, y accesibles á la clase inferior" (7) mostrando claramente cual era la visión del siglo XIX hacia las clases más desprotegidas y el nivel de discriminación, ya que, si bien se puede decir que la higiene de la época era muy deficiente, sin duda lo era en todas las clases sociales y no en una, en particular.

La Sífilis y la Despreocupación

En un principio se pensaba que la sífilis era "un azote de la divina justicia", tal como se escribió en 1813 en el informe de la comisión médica que había sido formada para estudiar sus alcances en el país. Aunque dentro del mundo científico había preocupación por su extensa propagación y efectos, había una notable ausencia de alarma en la población general, ya que al estar acostumbrada a los estragos de un sinnúmero de epidemias, esta "nueva enfermedad" era sólo una más de las muchas que habían debido enfrentar. Por lo tanto, resultaba aún más crítico el informar a la población general acerca de esta patología.

El problema de las enfermedades venéreas, y específicamente la sífilis, estaba muy extendido en Chile durante el siglo XIX, debido en gran parte a que los enfermos ocultaban su mal sin darle la importancia que realmente tenía, y por lo tanto, no seguían los tratamientos médicos ni respetaban las precauciones que hubieran detenido su expansión. Incluso era frecuente que se burlara la disposición legal que impedía a los enfermos de sífilis contraer matrimonio (2).

Antes de 1850, la enfermedad no se había caracterizado bien. Sin embargo, en la segunda mitad del siglo XIX dos médicos destacaron por su trabajo e investigación acerca de la sífilis: Joaquín Zelaya y Ramón Elguero. El Dr. Zelaya, alumno de Lorenzo Sazié, distinguió la sífilis de otras enfermedades venéreas, pero destacó que ellas sí tenían el mismo origen de contagio, que era el contacto sexual. Junto con Elguero, que había egresado de la Facultad de Medicina, intentó describir la sífilis lo más posible. Tenían claro que se trataba de una enfermedad altamente contagiosa y que su modo de transmisión era sexual, aunque no descartaban otras formas de contagio, tal como a través de la leche materna o de madre a feto. Además agregaron que todos los individuos la podían contraer no importando su clase social, estado físico o edad, lo que constituyó un gran avance para derribar las erradas ideas que se tenían en la época. Elguero escribió todo lo que sabía de la sífilis en su "Tratado Práctico", con el fin de que los médicos de la época pudieran instruirse sobre este mal. Gracias a los aportes de Elguero y Zelaya, se incrementó el conocimiento sobre las enfermedades venéreas en Chile después de 1850.

En aquella época, muchos de los enfermos de sífilis no eran diagnosticados precozmente, debido al prejuicio social que era asociado al contraer esta clase de enfermedad. Muchos sifilíticos preferían usar remedios o curaciones caseras y poco eficaces antes de reconocerse como

portadores de tal enfermedad. La vergüenza llegaba a tal grado que era común que los familiares de un difunto de sífilis otorgaran información falsa acerca de la verdadera causa de muerte. Además era complicado su diagnóstico, debido a la multitud de síntomas que presentaba o la aparente ausencia de ellos durante los estados de latencia.

Los tratamientos existentes para la sífilis no eran del todo eficaces, pero algunos servían para detener su avance o por lo menos disminuir sus efectos. No hay duda de que el mercurio era el mejor remedio para la sífilis por esos años, el cual se aplicaba bajo la forma de píldoras, o a través de frotaciones, baños y fumigaciones. Sin embargo, el uso de mercurio provocaba malestares y complicaciones, por lo que era necesario seguir reglas estrictas para establecer la dosis y el tiempo de administración. *"Un buen médico debe atender á muchas circunstancias en la administración del mercurio, pues es una sustancia muy activa, y nada indiferente; Diariamente veo las tristes víctimas de un mal método mercurial, y lo peor es que se hace más rebelde pues siendo un principio asentado que un continuo estímulo embota el sentido, con el mercurio administrado por una mano inexperta el virus sífilítico se hace mas tenaz, y no obedece ya á la acción de este agente"* (7). No se pretendía curar la sífilis sino manejarla de la mejor forma posible.

La Peor Arma contra el Ejército Chileno estaba en sus propias filas

Al comenzar la Guerra del Pacífico en 1879 se dieron numerosos avances en la medicina militar. Se estructuró una Sanidad Militar compuesta por los médicos Aguirre, Díaz y Gutiérrez. Se organizaron hospitales de campaña en el Norte donde estaban los ejércitos en campaña. Además se formaron hospitales de sangre para ayudar a los hospitales militares y se dictaron normas sanitarias que debían seguir los médicos y cirujanos. Se introdujo la antisepsia de Lister disminuyendo significativamente la mortalidad de los soldados heridos por infección, y como se sabía que la sobrevivencia de los heridos en los campos de batalla es proporcional a la rapidez de rescate, se desarrollaron los servicios de ambulancias. El uso de la anestesia, que consistía en cloroformo y éter, permitió un mejor manejo del dolor además de revolucionar la cirugía militar al permitir realizar amputaciones menos traumáticas. Todo esto era pensando en el herido de guerra y no en el soldado enfermo de sífilis, ya que estos no podían ingresar como voluntarios al Ejército.

Los enfermos de sífilis en el siglo XIX eran tantos, que al comenzar la Guerra del Pacífico en el año 1879, el Intendente de Valparaíso y a su vez Comandante General de Armas, Eulogio Altamirano, pudo constatar la real extensión de la sífilis entre los voluntarios, *"Centenares de voluntarios hubo que negarles el ingreso, porque llevaban en su cuerpo la marca fatal de la desgracia propia y el anuncio de la infelicidad de su prole, estimando el porcentaje de rechazados en 60% a 70%... y continua, el mismo transporte que conducía al norte un regimiento, debía volver con la*

tercera y cuarta parte de la gente declarada inútil para el servicio" (6).

Pero la sífilis no sólo causaba estragos en el reclutamiento de voluntarios, ya que muchas veces esta no era debidamente detectada o los voluntarios se contagiaban de dicha enfermedad estando en Campaña debido al ingreso a las plazas de prostitutas que servían para difundir la enfermedad, es así como en junio de 1879 las autoridades sanitarias del ejército deciden obligar a las prostitutas a realizarse exámenes médicos periódicos, tarea que recayó en los cirujanos de los regimientos, quienes debían entregarles su certificado de salud. En julio de aquel mismo año se prohíbe que las tropas enviadas al norte fuesen acompañadas por mujeres⁸, medida que al parecer, no fue debidamente seguida, como queda en evidencia en una carta enviada por R. Sotomayor, Ministro de Guerra en Campaña, al General en Jefe del Ejército, desde Pisagua en diciembre de 1879, de la cual rescataremos algunos fragmentos muy interesantes:

"Voy a llamar la atención de S.S. sobre un punto de vital importancia, que se relaciona íntimamente con la higiene general del ejército: Me refiero a la causa que determina la generalización del mal venéreo de la tropa."

Luego describe la importancia de detener esta enfermedad debido a los graves daños que puede generar entre los soldados y que podrían ser relevantes en el éxito de la Guerra del Pacífico diciendo: *"... cuando se destruye al soldado por afecciones que, como la sífilítica, atacan en variadas formas todo el organismo, aniquilan sus fuerzas y le inutilizan siempre por un largo tiempo, cuando no absolutamente."*

Más adelante en la carta deja entrever la gravedad y expansión que tiene la sífilis entre los soldados y la posibilidad de que muchos de ellos hayan llegado enfermos desde sus ciudades de origen, *"Actualmente puede fijarse en cincuenta por ciento el número de estos enfermos en el Hospital de Pisagua, sin duda que gran parte de estos, deben haber venido enfermos del Sur, pues si la recluta no se ha hecho con sujeción a las siglas científicas y que en el campo de Antofagasta, no se tomaron medidas habiendo allí afluencia de mujeres para morigerar en cuanto hubiera sido posible sus peligrosas relaciones"*. Haciendo una clara asociación entre la sífilis y la prostitución, más adelante señala con mayor fuerza, escribiendo:

"Hoy ya comienza a poblarse Pisagua, siendo franca la entrada para toda clase de gente, y eso propicia el momento para impedir la internación de mujeres que debemos suponer infectadas, y que pueden traer la ruina y descomposición de nuestro ejército, siendo el germen de desarrollo y medio de propagación de los males que he apuntado, como de las afecciones gonorreicas, y los bubones y reumatismos que de estos se derivan."

Por último señala el remedio más eficaz para detener esta grave situación: *"... necesidad de impedir absolutamente la entrada de mujeres a la plaza de Pisagua, como único y eficaz remedio de evitar en su origen, el mal que debemos evitar a toda costa. Una sola mujer enferma*

puede infestar a un regimiento- este es el hecho en su fría realidad y desnudez."

Lamentablemente, las medidas que fueron tomadas con el fin de detener la expansión de las enfermedades venéreas fueron tardías e insuficientes y la tasa de infección venérea se mantuvo alta durante toda la guerra (8), aunque no se debe descartar que las pocas y a veces insuficientes medidas tomadas, al menos lograron controlar, en cierta medida, la enfermedad y esto de no haberse llevado a cabo, probablemente hubiese hecho muy difícil la victoria de las armas chilenas en la Guerra del Pacífico.

CONCLUSIONES

La Sífilis desde su aparición desconcertó a los médicos de la época, a quienes se presentaba como una entidad nueva e ignorada por los autores clásicos. Su rapidísima difusión, que no perdonaba jerarquías, y también los quebrantos y la mortandad con que atacaba a sus víctimas aterrorizaron a la sociedad entera: la inequidad traía hambre, el hambre acarrearaba la prostitución, y ella diseminaba las semillas de este mal, de persona en persona, de ciudad en ciudad, cimentando finalmente el origen de esta enfermedad en los problemas sociales de la época.

Empero, la difusión de esta enfermedad permitió el desarrollo de observaciones y estudios más certeros respecto a su caracterización, origen y propagación, pudiéndose así elaborar mejores medidas para su tratamiento, identificación de otras enfermedades venéreas, y sobre todo, control. Se logró cubrir el abismo de la ignorancia con soluciones más eficaces que la discriminación, la mentira y la vergüenza que ocasionaba en las personas de esta sociedad, tratándola como la enfermedad que es y no como el castigo a un "pecado" o atribuyéndola a un mal de toda la sociedad y no sólo de las clases más desvalidas.

Así podemos ver como el estudio y la comprensión de esta enfermedad hacen notar la importancia de que el Estado deba crear una normativa para el control de prostitutas, como una medida para combatir el problema de la propagación, que alcanzó hasta las huestes del ejército.

Es de notar también la importancia que se otorga a la Higiene Pública como forma de control para este tipo de enfermedades venéreas, ya que si bien la prostitución era una actividad desarrollada principalmente por las clases más bajas como una forma de trabajo, ello no quita el hecho de que las clases altas requerían de estos servicios "ofrecidos", llevando el mal desde prostitutas a "caballeros", y de estos a sus nobles esposas, aumentando la diseminación de este mal a cada rincón de la sociedad, sin discriminación.

Así, conociendo nuestra historia deberíamos ser capaces de prevenir que situaciones similares se repitan, evitando de este modo, el resurgimiento de esta enfermedad, como también la aparición de nuevas epidemias venéreas que hoy en día conocemos. Cabe destacar que no debemos bajar la guardia ante esta situación, pues el inminente aumento de pacientes con sífilis nos recuerda que aún no

hemos aprendido la lección sobre las medidas de higiene pública.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- **Beltrán Y.** Sexo, Dolor y Lagrimas. La Prostitución en Chile durante la primera mitad del siglo XX. <http://www.geocities.com/historiaenchile/prostitutas.htm>.
- 2.- **Maira O.** 1887. La reglamentación de la prostitución desde el punto de vista de Higiene Pública. Memoria presentada para graduarse de licenciado en la Facultad de Medicina y Farmacia. Santiago de Chile, Imprenta nacional.
- 3.- **Beniveni A.** De algunas causas ocultas y extrañas de enfermedades y curaciones. Capítulo I: De la enfermedad vulgarmente llamada gálica. SÍFILIS, Archivo Paralelo. Biblioteca de Historia de la Medicina Chilena. Universidad de Chile.
- 4.- **Reccius A.** 1967. Capítulo II, pág. 29-43 y Capítulo XVIII, pág 191-205, Esculapio en Chile, Editorial Zig-Zag.
- 5.- **Allende R.** 1873. De la Higiene en Jeneral, Imprenta de la Patria de Valparaíso, pág. 10- 21.
- 6.- **Góngora A.** 1999. La Prostitución en Santiago 1813- 1931: La Mirada de las Elites, Editorial Universitaria, pág. 61-111.
- 7.- **J.M.S.** Aurora de Chile, Jueves 4 de febrero de 1813, páginas 1 y 2. Artículo: "La sífilis causa estragos en la sociedad chilena".
- 8.- **Huerte I.** La Medicina Militar Chilena durante la Guerra del Pacífico (1879-1884). ARS Médica: Revista de Estudios Médicos Humanísticos. Vol. 4 (4)

Correspondencia:
 María Angélica Bello
angeb19@hotmail.com

... de la medicina militar chilena durante la guerra...

... de la medicina militar chilena durante la guerra...

... de la medicina militar chilena durante la guerra...

... de la medicina militar chilena durante la guerra...

... de la medicina militar chilena durante la guerra...

... de la medicina militar chilena durante la guerra...

... de la medicina militar chilena durante la guerra...

... de la medicina militar chilena durante la guerra...

... de la medicina militar chilena durante la guerra...

... de la medicina militar chilena durante la guerra...