



Avances Biomedicina

ene - jun 2012 volumen 1 número 1

revistas.saber.ula.ve/index.php/biomedicina

EDIFICIO
LOUIS PASTEUR



Depósito Legal: ppi201102ME3935

ISSN: 2244-7881



Sobre la Portada

El Instituto de Inmunología Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes, creado en 1993, es una dependencia orientada por los principios de la excelencia, la innovación y el desarrollo técnico y científico en pro del bienestar de la colectividad nacional en general y andina en particular. Su quehacer institucional se concentra en el cumplimiento de las tareas de docencia, investigación y servicio asistencial. Su sede es la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes, en el Edificio Louis Pasteur, adyacente al Hospital Universitario de Los Andes de la ciudad de Mérida.

www.medic.ulb.ve/idic

AVANCES EN BIOMEDICINA

Publicación Oficial del Instituto de Inmunología Clínica

Autoridades ULA

Dr. Mario Bonucci

Rector de la Universidad de los Andes

Dr. Patricia Rosenzweig Levy

Vicerrector Académico

Dr. Manuel Aranguren

Vicerrector Administrativo

Dr. José María Andérez

Secretaría

Dr. Gerardo Tovitto

Decano de la Facultad de Medicina

Dra. Lisbeth Berrueta Carrillo

*Directora del Instituto de Inmunología
Clínica*

Consejo Editorial

Director Editorial

Siham Salmen Halabi

Editor Adjunto

Lisbeth Berrueta Carrillo

Comité Editorial

Daniela Montes-Berrueta

Guillermo Terán-Ángel

Joselyn Rojas Quintero

Leidith Berrueta Carrillo

Luisa Barboza Carrillo

Comisión de Arbitraje

Andrés Soyano

Barbara E Bierer

Carmen Mazei de Dávila

Darrell L Peterson

Diego F Dávila Spinetti

Jesús Alfonso Osuna

José H Donis

Librado Ortiz-Ortiz

Mercedes González Coira

Miguel Aguirre

Morella C Bouchard

Yuleima Díaz

Avances en Biomedicina es el órgano divulgativo oficial del Instituto de Inmunología Clínica – ULA. Esta publicación periódica busca la promoción, difusión y discusión del impacto de los trabajos realizados por los miembros de la comunidad científica regional, nacional e internacional. Pretende además fomentar la actividad científica de difusión de resultados en los investigadores novedosos, tanto en el área de pregrado como de postgrado.

Es una revista científica online, de periodicidad semestral que cuenta con las siguientes secciones: Revisiones, artículos originales, casos clínicos, cartas al editor, comunicaciones rápidas; y dos secciones destinadas a los investigadores novedosos y a los pioneros en los diferentes campos de las ciencias de la medicina, biología y biotecnología. Esta revista cuenta con sistema de arbitraje, llevado a cabo por al menos dos revisores expertos en el área, seleccionados por el Consejo Editorial.

Avances en Biomedicina no se hace responsable del contenido, opiniones, aplicaciones o material que sea suministrado por los autores. Además, se asume que todas las publicaciones recibidas se rigen por las normas de honestidad científica y ética profesional, por lo que la revista no se hace responsable en el caso de que algún autor incurra en la infracción de las mismas.

Indizada en:

1. Repositorio Institucional de la Universidad de los Andes – SABER-ULA.
2. Índice Mexicano de Revistas Biomédicas Latinoamericanas (Inbiomed).

VOLUMEN 1, N°1, ENERO – JUNIO 2012

DEPÓSITO LEGAL: PPI201102ME3935

ISSN: 2244-7881

Red:

avanbiomed.idic@ula.ve

avanbiomed.idic@gmail.com

<http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/biomedicina>

<http://www.imbiomed.com.mx>

Instituto de Inmunología Clínica:

Dirección: Edificio Luis Pasteur, al lado del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes. Mérida 5101. Apartado postal N° 566. Venezuela.

Copyright:

Derechos reservados. Queda prohibida la reproducción total o parcial de todo el material contenido en la revista sin el consentimiento por escrito de los editores.

Tabla de contenido

- 1 EDITORIAL
- 2-3 CARTAS AL EDITOR
Dificultades en la enseñanza de prácticas de sexo seguro y en la adherencia al uso del preservativo
Guillermo Terán-Angel, Nubia Silva Gutiérrez
- ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN**
- 4-8 **Purificación de fibroblastos gingivales a partir de tejido de la mucosa bucal**
Gingival fibroblast purification from oral mucose tissue
Karla Padrón, Siham Salmen, Lisbeth Berrueta, Erika González, Lorena Dávila, Joselyn Rojas, Lisbeth Sosa, Daniela Olávez, Eduvigis Solórzano
- 9-17 **Muerte celular inducida por condiciones ambientales adversas en *Calibrachoa parviflora* (Petunia)**
Cell death induced by adverse environmental conditions in Calibrachoa parviflora (Petunia)
Daniela Montes-Berrueta, Sofía Dugarte-Da Silva, Nathaly Rojas-Duque, Siham Salmen, Lisbeth Berrueta
- REVISIONES**
- 18-29 **Inflamasomes – Fighting the enemy from within**
Inflamasomas – atacando al enemigo desde adentro
Joselyn Rojas
- 30-37 **Anisakidosis, inflamación e hipersensibilidad**
Anisakidosis, inflammation and hypersensitivity
Guillermo Terán-Angel, Joselyn Rojas
- CASOS CLÍNICOS**
- 38-41 **Apósitos de quitosano para el tratamiento de pie diabético**
Chitosan films for the diabetic foot treatment
Gladys Velazco, Anajulia González, Reynaldo Ortiz
- 42-45 **Fascitis necrotizante de punto de partida abdominal: a propósito de un caso**
Necrotizing fasciitis from abdominal starting point: purpose of case
Dayyorsem Canelón, Andrea Fargier, Gustavo León, Maria A. Silva, Estrella Uzcátegui
- 46-50 **Enfermedad de Moyamoya y embarazo gemelar. Presentación de un caso y revisión de literatura**
Moyamoya disease and twin pregnancy. Case report and literature revision
Airam Amoroso, Gustavo Frontado, Hilarión Araujo, Verónica Montilla
- 51 INSTRUCCIONES A LOS AUTORES
- 52 INSTRUCTIONS FOR AUTHORS



Editorial

El Instituto de Inmunología Clínica (IDIC) es una dependencia de la Facultad de Medicina de la Universidad de los Andes, que ha venido desarrollando sus actividades de manera ininterrumpida desde sus inicios hace mas de 30 años, como Unidad de Inmunología Clínica, adscrita al departamento de medicina del Hospital Universitario de los Andes, hasta su creación y aprobación por el Consejo Nacional de Universidades en 1993, constituyéndose en un verdadero centro de referencia tanto regional como nacional, con sus múltiples contribuciones en los campos de la Investigación, docencia y extensión.

Basados en la premisa que tanto la formación de profesionales de pregrado y postgrado, como la atención médica especializada, requieren de la innovación constante sustentada en líneas de investigación consolidadas, el personal docente y de investigación del IDIC, aunque limitado en número y en recursos, ha dedicado los mayores esfuerzos por alcanzar niveles óptimos de productividad en la generación de conocimientos básicos y de aplicación directa, formación de nuevas generaciones y asistencia tanto diagnóstica como clínica de alto nivel, en el estudio y seguimiento de problemas de salud pública de interés en nuestra comunidad.

Los conocimientos y productos paulatinamente generados han sido objeto de publicaciones en órganos divulgativos tanto nacionales como internacionales, los mismos han generado reconocimientos de estímulo tanto individual como grupal, reforzando la determinación de continuar con sus metas. La Institución a través de su postgrado: Maestría en Inmunología, aporta sus espacios para que investigadores procedentes de otros centros, comuniquen sus experiencias a través de seminarios y charlas que semanalmente se desarrollan como parte de las actividades docentes, pero que han permitido la colaboración y creación de nuevas líneas de investigación, trascendiendo más allá de los laboratorios del IDIC, y de las áreas respectivas de conocimiento.

Paralelamente, el IDIC a través de sus miembros, ha fungido repetidamente en procesos de arbitraje de comunicaciones originales y proyectos de investigación tanto a nivel nacional como internacional, que inexorablemente han generado no solo un cúmulo importante de experiencias, sino también la inquietud de ofrecer nuevos espacios para la comunicación de resultados y productos que cubran no solo el área de la inmunología sino el de las ciencias biomédicas en general, dejando de lado los esfuerzos individuales por los grupales, en la búsqueda de la excelencia e innovación, en una sociedad abrumada con necesidades mas allá de lo meramente existencial.

Sobre estas premisas surge la inquietud de crear un órgano divulgativo oficial del IDIC: Avances en Biomedicina, una publicación periódica, arbitrada y en versión digital, cuyo objetivo es la comunicación de: artículos originales, estado del arte, cartas al editor, casos clínicos y comunicaciones breves, con una sección especial para los investigadores nóveles en proceso de formación, de fácil acceso tanto para la comunidad científica como para el público en general, que promueva la divulgación de conocimientos y actividades de vanguardia y la integración de nuevos grupos de trabajo, con visibilidad y trascendencia internacional.

Sin más preámbulos, y con un gran sentido de responsabilidad y convicción en los propósitos de quienes diariamente se dedican a la investigación, y quieren hacer de la misma una labor compartida y universal, damos la bienvenida a esta nueva Revista científica, augurándole el mejor de los éxitos, teniendo presente que “la mayoría de nuestros logros son solo mentales... hagámoslos reales”.

Dra. Lisbeth Berrueta Carrillo

Directora del Instituto de Inmunología Clínica
Instituto de Inmunología Clínica, Facultad de Medicina,
Universidad de los Andes, e-mail: lberruet@ula.ve

Cartas al Editor

Dificultades en la enseñanza de prácticas de sexo seguro y en la adherencia al uso del preservativo

Guillermo Teran-Angel¹✉, Nubia Silva Gutiérrez²

¹ Sociedad Wills Wilde AC. ² Fundación Niños en Positivo.
Mérida-Venezuela

Felicitaciones a todo el equipo editorial por el lanzamiento de la Revista Avances en Biomedicina, publicación oficial del Instituto de Inmunología Clínica de la Universidad de los Andes. Nuestros mejores augurios para que este órgano de divulgación se consolide nacional e internacionalmente en la difusión de la producción científica de nuestra región. Les agradecemos profundamente la oportunidad que nos ofrecen al sector comunitario, permitiéndonos exponer nuestros puntos de vista que, en este caso en particular, se generan en el seno de las organizaciones que hacemos vida en la respuesta a la epidemia del VIH/sida.

En esta ocasión hemos querido plantear una problemática que surge como una barrera al abordaje efectivo de la prevención a través de la adherencia a las prácticas de sexo seguro.

En el último informe sobre la situación mundial de la epidemia de sida publicado por ONUSIDA (1), se evidencia que aunque el uso del preservativo ha aumentado en muchas regiones del planeta, aun existen regiones en donde los grupos vulnerables se rehúsan al uso del condón de forma sistemática. Y peor aún, en estos grupos, el aumento en la incidencia de la infección por VIH se asocia a prácticas sexuales desprotegidas.

Ante la no disponibilidad de vacunas tanto profilácticas como terapéuticas en el mediano y largo plazo, es más que evidente que la herramienta de primera mano y de efectividad demostrada en la lucha preventiva en contra el VIH/sida, lo constituye (entre otras) la promoción de prácticas seguras en el plano sexual, usando los preservativos o condones. Esta realidad ha sido una de las constantes en el trabajo de miles de organizaciones, gubernamentales o no; que durante décadas han desarrollado campañas de información y promoción de prácticas de sexo seguro.

No es fácil promover el uso del preservativo; por un lado, la ultranza en la negativa hacia ésta práctica por parte de instituciones que dicen capitalizar la fe y la religiosidad de sus seguidores, sabotea una y otra vez el trabajo preventivo; por otra parte, la percepción en el colectivo está plagada de calificativos (el condón aprieta, es incomodo, produce alergias, disminuye sensibilidad, etc.) que condicionan el rechazo al uso del condón. Así pues, lograr el aumento en la cobertura de uso

del condón es una meta difícil, pero alcanzable, y solo se logra educando y dando información veraz. Y justamente en este punto estriban los inconvenientes, pues no existe garantía de que la avalancha de información veraz disponible en un momento determinado sea valida para producir los efectos necesarios.

En la última Conferencia Internacional sobre el sida (Austria, 2010) además de las correspondientes revisiones para actualizar y unificar criterios en materia de estadísticas, prevención e intervención social en la lucha contra el VIH/sida; fueron presentados dos trabajos científicos muy particulares: el primero, el estudio CAPRISA 004 (2), relacionado con la "seguridad y efectividad de un gel vaginal microbídica (1% Tenofovir) evaluado en mujeres surafricanas", y el segundo relacionado con los "nuevos conceptos en la patogénesis del VIH/sida", compilación presentada por el Dr. Anthony S. Fauci. En ambos trabajos resaltan los aportes al conocimiento y a las nuevas opciones terapéuticas y profilácticas, reafirmando su gran valor científico. No obstante, hemos querido realizar algunas consideraciones a las implicaciones de estos hallazgos científicos.

El estudio CAPRISA 004 es un ensayo en fase clínica IIb, en donde se determinan parámetros de seguridad y de dosificación del nuevo fármaco en pequeños grupos poblacionales. Luego de esta fase deben ejecutarse las fases III y IV (de varios años de duración) antes de ser liberado finalmente como producto de uso masivo. Es decir, el uso rutinario y a gran escala del gel contenido de Tenofovir es aun bastante distante (de superar las fases pendientes). No obstante, los investigadores hicieron una afirmación temeraria: el gel vaginal se constituye como una alternativa al uso del preservativo. Por otra parte, en el segundo trabajo presentado, resaltaron algunas evidencias experimentales que indican una baja infectividad del VIH por vía sexual (3). Estos hallazgos son argumentos adicionales para reforzar la "corriente" nacida en Suiza hace algunos años que plantea la interrupción, en condiciones de carga viral reducida, del uso del preservativo entre parejas "serodiscordantes", es decir parejas en que solo una persona vive con VIH (4).

Es indudable que siempre escuchamos mejor aquello que queremos escuchar. Es por esto que las reseñas noticiosas que se han hecho de los trabajos científicos mencionados, han creado una matriz de opinión colectiva (muy preocupante) en donde el aspecto principal, el más resaltante, ajeno al saber científico, es la posibilidad y la justificación para no usar los preservativos.

El preservativo o condón no solo es una barrera para evitar la infección por VIH, impide también la entrada de otros patógenos causantes de enfermedades como las hepatitis B y C, herpes, sífilis, gonorrea, entre otras; además de evitar embarazos no deseados. Adicionalmente, las situaciones de riesgo (sexual) para la infección por VIH son las mismas que para las demás ITS (infecciones de transmisión sexual), entonces cabe la pregunta, el gel con Tenofovir, en fase de experimentación, y pendiente aun por años de estudio para confirmar su efectividad real, es una alternativa para la lucha en contra del VIH y de las demás ITS?

Por otra parte, es muy discutible la interrupción del uso del preservativo entre parejas “serodiscordantes” para VIH, el principal alegato para tal estrategia es el derivado de estudios en poblaciones aisladas en donde la tasa de infección sexual ha sido estimada como muy baja (una infección por cada 2000 coitos); estos estudios han sido netamente epidemiológicos (3). Recordando hallazgos científicos del pasado, estudios de este tipo, fueron refutados por estudios genéticos que demostraron la presencia de mutaciones que conferían resistencia (el caso de la mutación delta 32 del coreceptor CCR5 para el VIH)(5). Esto significa que tal resistencia, o en otras palabras, que la baja infectividad sexual observada en aquellos estudios fue debida a factores genéticos de las personas y no a una característica intrínseca del virus. Entonces, son éticos y responsables los anuncios mediáticos que plantean la baja infectividad del VIH por vía sexual promoviendo el sexo sin protección?

Se ha argumentado también que cuando hay una carga viral indetectable en sangre las probabilidades de infección pudieran ser ínfimas (6). No obstante, otros estudios recientes han demostrado, que aun con cargas virales indetectables en sangre, las cargas virales en líquido seminal y en fluido vaginal son elevadas, incluso superiores a las 500 mil copias por mL (7). Entonces, serían las cargas virales indetectables en sangre un salvoconducto para el sexo sin protección?

Independientemente de las respuestas a estas interrogantes de carácter científico, el daño real y de impacto en la salud pública, es la justificación al rechazo del condón, única alternativa de efectividad profiláctica irrefutablemente establecida ante la infección por el VIH.

El problema no es el resultado de la investigación científica, sino la interpretación que hace la población, conducida por periodistas sensacionalistas o por grupos disidentes de las teorías científicamente establecidas y que se aprovechan de estas “verdades transitorias peligrosas” para generar corrientes de pensamiento distorsionadas, que en definitiva se suman al ostracismo eclesiástico y al desgano colectivo como una nueva barrera para la promoción del uso responsable del preservativo.

✉ Autor de correspondencia: Guillermo Teran-Angel. Sociedad Wills Wilde AC, Centro Comercial Alto Chama, Nivel Mezanina, Oficina 226. Telefax: 02742710220, gata@ula.ve, Mérida 5101, Venezuela.

Referencias

1. UNAIDS. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2010. Geneva: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS; 2010.
2. Abdool Karim Q, Abdool Karim SS, Frohlich JA, Grobler AC, Baxter C, Mansoor LE, Kharsany AB, Sibeko S, Mlisana KP, Omar Z, Gengiah TN, Maarschalk S, Arulappan N, Mlotshwa M, Morris L, Taylor D; CAPRISA 004 Trial Group. Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women. *Science* 2010; 329:1168-74. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
3. Wawer MJ, Gray RH, Sewankambo NK, Serwadda D, Li X, Laeyendecker O, Kiwanuka N, Kigozi G, Kiddugavu M, Lutalo T, Nalugoda F, Wabwire-Mangen F, Meehan MP, Quinn TC. Rates of HIV-1 transmission per coital act, by stage of HIV-1 infection, in Rakai, Uganda. *J Infect Dis* 2005;191:1403-9. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
4. Vernazza P, Hirscher B, Bernasconi E, Flepp M. Les personnes séropositives ne souffrant d'aucune autre MST et suivant un traitement antirétroviral efficace ne transmettent pas le VIH par voie sexuelle. *Bull Méd Suisse* 2008; 89: 165-169. [\[Google Scholar\]](#)
5. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to
6. Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, Serwadda D, Li C, Wabwire-Mangen F, Meehan MO, Lutalo T, Gray RH. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med* 2000; 342:921-9. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
7. Cu-Uvin S, DeLong AK, Venkatesh KK, Hogan JW, Ingersoll J, Kurpewski J, De Pasquale MP, D'Aquila R, Caliendo AM. Genital tract HIV-1 RNA shedding among women with below detectable plasma viral load. *AIDS*. 2010; 24: 2489-97. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

Purificación de fibroblastos gingivales a partir de tejido de la mucosa bucal (Gingival fibroblast purification from oral mucose tissue)

Karla Padrón¹, Siham Salmen², Lisbeth Berrueta², Erika González, Lorena Dávila³, Joselyn Rojas², Lisbeth Sosa³, Daniela Olávez¹, Eduvigis Solórzano¹✉

¹ Grupo de Investigaciones Biopatológicas, Laboratorio Integrado de Biología Molecular y Celular, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Venezuela. ² Instituto de Inmunología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Venezuela. ³ Cátedra de Periodoncia, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Venezuela.

[ARTICULO ORIGINAL]

Recibido: 03 de Marzo de 2011. Aceptado: 26 de Mayo de 2011.

Resumen

Los fibroblastos son ampliamente utilizados en la medicina regenerativa como elementos clave en la restauración del tejido gingival y tratamientos faciales. El objetivo de este estudio fue estandarizar un método para obtener fibroblastos gingivales, con alta pureza, procedentes de la mucosa bucal, para ello se cultivaron células procedentes del tejido gingival mecánicamente disgregado y sometido a separación mediante gradientes de densidad en ficoll hypaque. Después de varios pasajes se obtuvo un cultivo enriquecido de células adherentes. El 51% de estas fueron positivas para el marcador específico de fibroblastos humanos ER-TR7. Nuestros resultados indican que el método utilizado permite la obtención de los fibroblastos del tejido gingival, células con gran relevancia en el campo de la medicina regenerativa y que representa en nuestra comunidad, el paso inicial para la implementación de estrategias terapéuticas hacia la restitución de tejidos perdidos, particularmente a nivel de la mucosa bucal.

Palabras clave

Mucosa gingival, fibroblastos gingivales, ER-TR7, citometría de flujo, inmunofluorescencia.

Abstract

Fibroblasts are widely used in regenerative medicine, as key elements in the restoration of the gingival tissue and facial treatments. The aim of this study was to standardize in our laboratory a method to obtain highly pure fibroblasts from gingival tissue. In order to do that, cells were mechanically disaggregated from gingival tissue and separated by ficoll hypaque density gradients. This procedure was performed several times yielding an enriched culture of adherent cells, where 51% resulted positive for the fibroblast marker ER-TR7. Our results indicate that the method used, allow to obtain fibroblasts from gingival tissue; cells with great potential in the field of regenerative medicine and it represents, in our community, the first step to implement therapeutic strategies that will allow the restoration of damaged tissues, particularly in the oral mucosa.

Keywords

Gingival mucose, gingival fibroblast, ER-TR7, flow cytometry, immunofluorescence.

Introducción

Los fibroblastos son subpoblaciones celulares en forma de huso y distribuidas ampliamente a nivel de los tejidos del cuerpo. Su origen es mesenquimático y se consideran el componente principal del tejido conectivo (1). De los subtipos existentes, los

fibroblastos dermales (FD) y gingivales (FG), contienen características morfológicas y funcionales similares; sin embargo, se ha establecido que los FG median la reparación de los tejidos de manera más rápida y con bajo nivel de cicatrización (2). Esta característica particular de los FG, está asociada a su alta capacidad de replicación (3) y actividad de la telomerasa, enzima encargada de mantener la longitud de los telómeros y

✉ Autor de correspondencia: Eduvigis Solórzano Navarro, Cátedra de histología, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela, e-mail: eduvigis@ula.ve

que está asociada con la longevidad celular (3, 4). Es por ello que ha despertado el interés de muchos grupos de investigadores, por su gran potencialidad en la regeneración tisular (5).

Los fibroblastos son fuente principal de colágeno tipos I y III (6), fibronectina, glicosaminoglicanos, proelastina, factores de crecimiento y de la matriz extracelular, elementos que juegan un papel importante en la regulación de los procesos homeostáticos y en la interacción célula-célula (1). Estas células además, responden a citocinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento, y de esta manera controlan el balance entre la producción de matriz extracelular y la degradación tisular (7).

Adicionalmente, los FG están en estrecho contacto con las células epiteliales, de esta manera controlan la morfogénesis, homeostasis y reparación de los tejidos (8), mediante la modulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis de las células del tejido epitelial, (9) especialmente de los queratinocitos (10). Este efecto está asociado con la liberación del factor de crecimiento de los queratinocitos, que juega un papel importante tanto en la proliferación como en la diferenciación de esta subpoblación celular (9).

Los fibroblastos aislados y cultivados *in vitro* o sobre sustancias bioactivas, han sido utilizados para la reposición de los tejidos periodontales alterados y en casos de retracción postquirúrgica de la encía, con resultados prometedores en la regeneración de heridas, asociado con la producción de EGF β que estimula la angiogénesis y la aparición de pericitos (células mesenquimales) y de células pluripotentes, con capacidad de diferenciarse hacia fibroblastos y osteoblastos (1, 11).

Las observaciones clínicas y estudios experimentales en animales indican consistentemente que el proceso de cicatrización en la mucosa bucal tiene mejores resultados que en la piel (7, 12-14). Por lo que se ha postulado que las células de la mucosa bucal poseen características distintivas de la promoción de cierre acelerado de heridas (12, 15). Los FG pueden ser purificados de tejidos de diferentes regiones de la cavidad bucal, como el paladar, rebordes edéntulos (16) y en casos de erupción pasiva de terceros molares, a partir del cual pueden ser cultivados *in vitro*, donde se expanden y proliferan sin necesidad de condiciones especiales (17).

En base a estos hallazgos, en este trabajo se estandarizó el procedimiento para el cultivo y caracterización de los FG, como primer paso para el desarrollo y aplicación de procedimientos que

restauren, mantengan o mejoren la función de los tejidos de soporte en la cavidad bucal.

Metodología

Muestra de tejido gingival: posterior a la obtención de consentimiento escrito por los voluntarios reclutados en el estudio y cumpliendo con las normas bioéticas de la Universidad de Los Andes (ULA), se procedió a la obtención de la muestra de tejido gingival. Los individuos seleccionados acudieron a la clínica de Periodoncia, Facultad de Odontología, ULA con alteraciones en la erupción pasiva; en ausencia de patologías periodontales inflamatorias o asociadas a medicamentos. El tejido se obtuvo mediante la realización de una cuña distal en la mucosa de los terceros molares inferiores, efectuada con fines terapéuticos; para lo cual, previo al acto quirúrgico, se indicó al paciente realizar enjuagues con Gluconato de clorhexidina 0,12%, por 1 minuto. Bajo anestesia infiltrativa, se realizó la cuña distal; obteniéndose así un fragmento de tejido de aproximadamente 3 mm², el cual fue lavado con solución fisiológica estéril para eliminar restos de sangre y sobre una loseta estéril se procedió a retirar mecánicamente el epitelio.

Cultivo *in vitro* del tejido gingival: el tejido fue disgregado sobre una capsula de petri y con la ayuda del bisturí se cortó en porciones de aproximadamente 2 mm x 2 mm. Posteriormente fue homogeneizado con el émbolo de una jeringa estéril, a fin de obtener fragmentos de tejido más pequeños. La muestra fue resuspendida en medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) completo (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2,5 mg/mL de anfotericina B y suplementado con 10% de suero bovino fetal. La suspensión celular fue sometida a separación por gradiente de densidad utilizando Ficoll-Hypaque, densidad 1077, a fin de eliminar las células mononucleares presentes en el tejido. Posterior a la centrifugación a 400 g durante 30 min, el botón celular ubicado en el fondo del tubo fue recuperado, lavado tres veces y sembrado en placas de 6 pozos estériles en medio D-MEM completo. El medio de cultivo fue reemplazado cada 7 días. Después de tres semanas, las células en suspensión fueron separadas de las adherentes, estas últimas fueron tratadas con Tripsina (0,25%)/EDTA a fin de realizar los repiques y lavados correspondientes. La viabilidad celular se determinó mediante la técnica de coloración supravital con Azul Trypan al 0,4%.

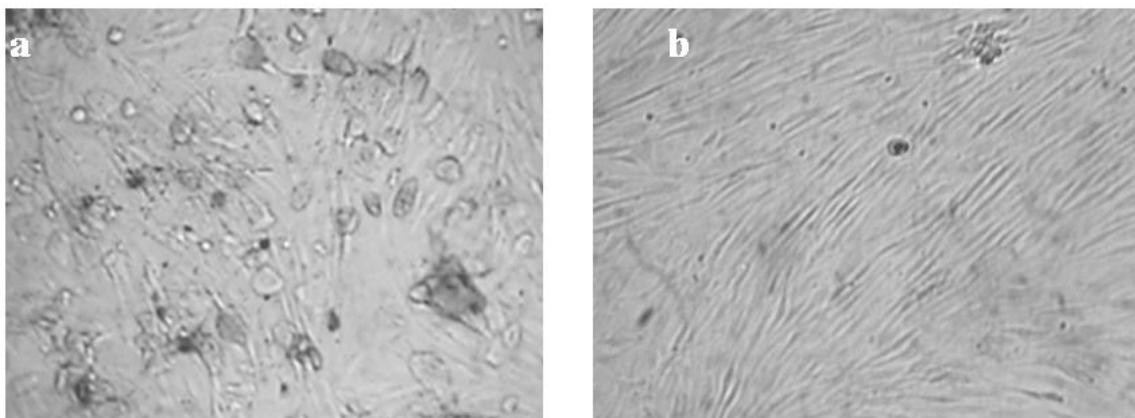


Figura 1. En la figura 1a, se muestra la presencia de células adherentes y no adherentes después de dos semanas de cultivo. La figura 1b, muestra la predominancia de células adherentes las cuales se observan confluente después de 4 semanas de cultivo.

Determinación del fenotipo de las células en cultivo mediante citometría de flujo: las células adherentes y no adherentes fueron fijadas con paraformaldehido (PAF) al 3% durante 10 minutos a temperatura ambiente, luego de tres lavados, estas fueron permeabilizadas con PBS, 0,5% de BSA y saponina 0,1%, durante 20 minutos a temperatura ambiente, luego centrifugadas y teñidas con 10 µL (1 µg/mL) del anticuerpo marcador específico de fibroblastos humanos: ER-TR7-PE (Santa Cruz Biotechnology, CA), durante 30 minutos a 4 °C, luego de tres lavados con PBS, las células fueron adquiridas y analizadas en un citómetro de flujo FACsort mediante el programa Cell Quest (Becton Dickinson).

Fueron capturados 10,000 eventos y mediante un gráfico tipo "dot-plot", se estableció la región donde se ubican las células en un gráfico de FSC (Forward scatter) (ajustado a E-1, debido al tamaño celular) y SSC (Side scatter).

De esta región se identificaron aquellas células con marcaje positivo para ER-TR7.

Inmunofluorescencia directa: Una porción (2×10^5 células/mL) de células adherentes se sembraron en laminillas estériles y se cultivaron durante 2 semanas hasta obtener una confluencia del 80%.

Las células fueron fijadas con metanol por 10 minutos a -20 °C, se lavaron tres veces con PBS-Gelatina, fueron incubadas con ER-TR7-PE (1:50) y luego de tres lavados las células se visualizaron con un objetivo de 100X en un microscopio de epifluorescencia LEICA DMR (Leica Microsystems Wetzlar GmbH), las imágenes fueron registradas empleando el sistema de captura CoolSNAP acoplado al software ImagePro (MediaCybernetics).

Resultados y Discusión

En este estudio se implementó un método para la purificación de FG a partir de la mucosa bucal para establecer cultivos *in vitro*, que pueden utilizarse en procedimientos de regeneración de tejido conectivo con aplicación en diferentes áreas biomédicas. Las células fueron extraídas del tejido y sometidas a ficoll hypaque a fin de eliminar las células mononucleares, fue posible diferenciar células adherentes de las no adherentes a partir de los primeros 14 días de cultivo (ver figura 1a) logrando establecerse una monocapa de células confluente en cuatro semanas (ver figura 1b). Para evaluar el porcentaje de fibroblastos presentes en ambas subpopulaciones (adherentes y no adherentes), se utilizó un marcador específico de fibroblastos humanos (ER-TR7) (18).

Tal y como se muestra en la figura 2, el enriquecimiento de fibroblastos fue mayor en la población de células en monocapa (51%) (Figura 2b) en comparación con aquellas que se mantuvieron en suspensión (17%) (Figura 2a).

Los resultados de la inmunofluorescencia (Figura 3) permitieron evaluar la morfología de estas células así como la presencia y patrón de localización del antígeno ER-TR7 en la población en las células adheridas a las laminillas, corroborando así el enriquecimiento predominante de fibroblastos en las preparaciones estudiadas. Existen reportes previos de la presencia de células progenitoras gingivales multipotenciales a nivel de la mucosa gingival con morfología similar a los fibroblastos, con capacidad de diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos (19), por lo que es importante establecer estudios

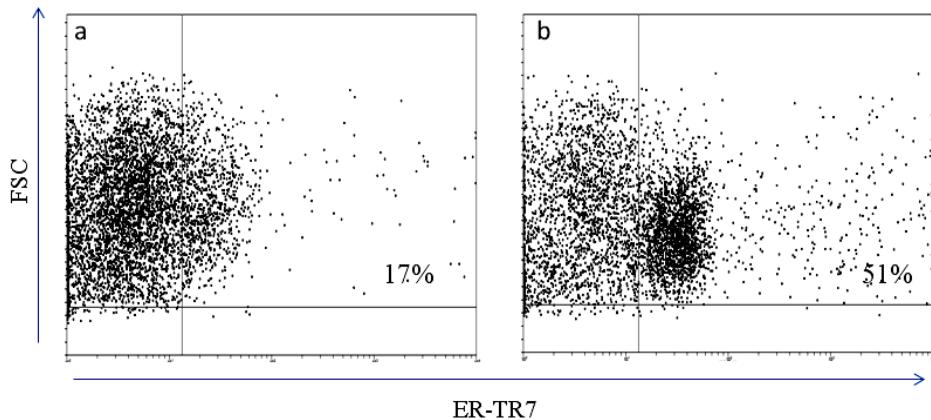


Figura 2. La figura 2a, evidencia el porcentaje de fibroblastos presentes en las células no adherentes, mientras que la figura 2b, evidencia el enriquecimiento de fibroblastos en las células adherentes.

adicionales para caracterizar a las poblaciones adherentes aisladas con morfología de fibroblastos, pero negativas al marcador ER-TR7.

Desde hace varios años diferentes grupos de investigación han trabajado en la regeneración de tejidos mediante el uso de matrices no-celulares inertes con o sin la presencia de FG autólogos (1, 20); sin embargo los resultados hasta ahora obtenidos indican que en estos injertos, la repoblación es más lenta y depende exclusivamente de la infiltración celular y de vasos sanguíneos del periostio, debido a ausencia de células mesenquimáticas, importantes en la reconstitución del tejido (20-22). Tomando en consideración estas observaciones la tendencia actual es enriquecer estas matrices acelulares con

fibroblastos, previo a su colocación en el tejido blanco para acelerar la recuperación y regeneración del tejido (23), por cuanto representan una fuente importante de matriz extracelular (1, 7, 24), de reclutamiento de células que contribuyen en la regeneración tisular (1, 23), además de favorecer las morfogénesis epitelial, diferenciación e integridad del epitelio de la mucosa gingival (25).

Las FG no son sólo de gran interés para el campo de la odontología y la estética médica, sino también para la generación de células progenitoras pluripotenciales inducidas (iPS), procedimiento que inicialmente fue explorado en fibroblastos de piel y tejidos viscerales, pero que por su facilidad de obtención de muestras, purificación y cultivo, además de su alta tasa de replicación y actividad de telomerasa, son consideradas como el modelo ideal para generar iPS (3, 26).

La ingeniería de tejidos se ha convertido en una nueva frontera en la odontología para la regeneración de tejidos bucales (3), por lo que la purificación de FG en nuestro laboratorio representa un paso inicial para la implementación de nuevas estrategias terapéuticas en nuestra región, a fin de ofrecerle a los pacientes una alternativa en la restitución de tejido perdido o dañado especialmente en la mucosa bucal.

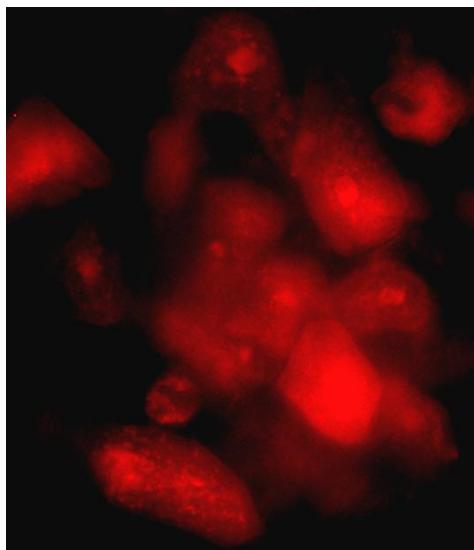


Figura 3. Muestra la morfología y patrón de tinción intracelular de ER-TR7 en los fibroblastos cultivados en monocapa.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al CDCHT de la Universidad de los Andes subvención O-255-10-07-C.

Referencias

1. Stepanova II, The use of fibroblasts in periodontology and implantology. *Bull Exp Biol Med* 2007; 144: 147-50. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
2. Eslami A, Gallant-Behm CL, Hart DA, Wiebe C, Honardoust D, Gardner H, Häkkinen L, Larjava HS, Expression of integrin alphavbeta6 and TGF-beta in scarless vs scar-forming wound healing. *J Histochem Cytochem* 2009; 57: 543-57. [\[PubMed\]](#)
3. Egusa H, Okita K, Kayashima H, Yu G, Fukuyasu S, Saeki M, Matsumoto T, Yamanaka S, Yatani H, Gingival fibroblasts as a promising source of induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 2010; 5: e12743. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
4. Martín-Rivera L, Herrera E, Albar JP, Blasco MA, Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 95: 10471-6. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
5. Ebisawa K, Kato R, Okada M, Sugimura T, Latif MA, Hori Y, Narita Y, Ueda M, Honda H, Kagami H, Gingival and dermal fibroblasts: their similarities and differences revealed from gene expression. *J Biosci Bioeng* 2011; 111: 255-8. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
6. Ren L, Fu Y, Deng Y, Qi L, Jin L, Advanced glycation end products inhibit the expression of collagens type I and III by human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2009; 80: 1166-73. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
7. Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y, Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology. *J Periodontol* 2003; 74: 103-10. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
8. Werner S, Smola H, Paracrine regulation of keratinocyte proliferation and differentiation. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 143-6. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
9. Costea DE, Loro LL, Dimba EA, Vintermyr OK, Johannessen A, Crucial effects of fibroblasts and keratinocyte growth factor on morphogenesis of reconstituted human oral epithelium. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 1479-86. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
10. El Ghalbzouri A, Lamme E, Ponec M, Crucial role of fibroblasts in regulating epidermal morphogenesis. *Cell Tissue Res* 2002; 310: 189-99. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
11. Saito A, Saito E, Kawanami M, Shimada A, Healing in transplanted teeth with periodontal ligament cultured in vitro. *Cell Transplant* 2003; 12: 519-25. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
12. Sukotjo C, Lin A, Song K, Ogawa T, Wu B, Nishimura I, Oral fibroblast expression of wound-inducible transcript 3.0 (wit3.0) accelerates the collagen gel contraction in vitro. *J Biol Chem* 2003; 278: 51527-34. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
13. Scuibba JJ, Waterhouse JP, Meyer J, A fine structural comparison of the healing of incisional wounds of mucosa and skin. *J Oral Pathol* 1978; 7: 214-27. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
14. Walsh LJ, L'Estrange PR, Seymour GJ, High magnification in situ viewing of wound healing in oral mucosa. *Aust Dent J* 1996; 41: 75-9. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
15. Lin A, Hokugo A, Choi J, Nishimura I, Small cytoskeleton-associated molecule, fibroblast growth factor receptor 1 oncogene partner 2/wound inducible transcript-3.0 (FGFR1OP2/wit3.0), facilitates fibroblast-driven wound closure. *Am J Pathol* 2010; 176: 108-21. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
16. Borghetti A, Louise F, Controlled clinical evaluation of the subpedicle connective tissue graft for the coverage of gingival recession. *J Periodontol* 1994; 65: 1107-12. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
17. Giannopoulou C, Cimasoni G, Functional characteristics of gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Dent Res* 1996; 75: 895-902. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
18. Van Vliet E, Melis M, Foidart JM, Van Ewijk W, Reticular fibroblasts in peripheral lymphoid organs identified by a monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem* 1986; 34: 883-90. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
19. Fournier BP, Ferre FC, Couty L, Lataillade JJ, Gourven M, Naveau A, Coulomb B, Lafont A, Gogly B, Multipotent progenitor cells in gingival connective tissue. *Tissue Eng Part A* 2010; 16: 2891-9. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
20. Hou LT, Tsai AY, Liu CM, Feng F, Autologous transplantation of gingival fibroblast-like cells and a hydroxylapatite complex graft in the treatment of periodontal osseous defects: cell cultivation and long-term report of cases. *Cell Transplant* 2003; 12: 787-97. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
21. Batista ELJ, Batista FC, Novaes ABJ, Management of soft tissue ridge deformities with acellular dermal matrix. Clinical approach and outcome after 6 months of treatment. *J Periodontol* 2001; 72: 265-73. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
22. Wei PC, Laurell L, Gevelis M, Lingem MW, Maddalozzo D, Acellular dermal matrix allografts to achieve increased attached gingiva. Part 1. A clinical study. *J Periodontol* 2000; 71: 1297-305. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
23. Novaes ABJ, Marchesan JT, Macedo GO, Palhoto DB, Effect of in vitro gingival fibroblast seeding on the in vivo incorporation of acellular dermal matrix allografts in dogs. *J Periodontol* 2007; 78: 296-303. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
24. Hillmann G, Steinkamp-Zucht A, Geurtsen W, Gross G, Hoffmann A, Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes. *Biomaterials* 2002; 23: 1461-9. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
25. Müssig E, Tomakidi P, Steinberg T, Gingival fibroblasts established on microstructured model surfaces: their influence on epithelial morphogenesis and other tissue-specific cell functions in a co-cultured epithelium: an in-vitro model. *J Orofac Orthop* 2009; 70: 351-62. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
26. Wada N, Wang B, Lin NH, Laslett AL, Gronthos S, Bartold PM, Induced pluripotent stem cell lines derived from human gingival fibroblasts and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res* 2011; Mar 29. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

Muerte celular inducida por condiciones ambientales adversas en *Calibrachoa parviflora* (Petunia)

(Cell death induced by adverse environmental conditions in *Calibrachoa parviflora* (petunia))

Daniela Montes-Berrueta ^{1,2}, Sofía Dugarte-Da Silva ¹, Nathaly Rojas-Duque ¹, Siham Salmen ², Lisbeth Berrueta ² 

¹ Unidad Educativa Madre Teresa Titos, Mérida, Venezuela. ² Instituto de Inmunología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

[ARTICULO ORIGINAL]

Recibido: 27 de Noviembre de 2011. Aceptado: 13 de Diciembre de 2011.

Resumen

Se ha descrito que condiciones ambientales extremas tales como altas temperaturas, luz ultravioleta y el efecto invernadero, alteran la tasa de crecimiento de las plantas. En este trabajo se investigó el efecto agudo de dos condiciones ambientales extremas tales como la limitación de nutrientes y la acidificación del suelo con ácido sulfúrico, un compuesto comúnmente depositado en los suelos como consecuencia de la llamada lluvia ácida, sobre la tasa de muerte y proliferación celular en petunias (*Calibrachoa parviflora*). Para tales efectos, grupos de petunias fueron sometidas a tres condiciones diferentes: grupo A o control, mantenida en condiciones óptimas y de suministro de nutrientes, grupo B en ausencia de nutrientes y de luz natural, y grupo C expuestas a agua acidificada con ácido sulfúrico. En un seguimiento hasta 72 horas, se analizaron muestras de pétalos, hojas y tallos de cada una de las plantas y, posterior a la extracción de los núcleos, estos fueron teñidos con ioduro de propidio, un agente intercalante del ADN, y analizados mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Los resultados muestran que ambas condiciones extremas generan un desbalance en el proceso de muerte/sobrevida de las petunias, pero a diferencia de las plantas del grupo B, las plantas del grupo C no incrementaron la tasa de proliferación celular. Estos resultados sugieren que las plantas que crecen en suelos ácidos pierden la capacidad compensatoria ante la señal de estrés que se genera a consecuencia de la exposición aguda a concentraciones tóxicas de ácido sulfúrico.

Palabras clave

Muerte Celular, degradación de cromatina, lluvia ácida, plantas, efecto invernadero.

Abstract

It has been previously reported that extreme environmental conditions such as high temperatures, ultraviolet light and the greenhouse effect, alter the rate of growth in plants. In this study we investigated the acute effect of two extreme environmental conditions: nutrient deprivation and soil acidification with sulfuric acid, a compound commonly deposited in the soil, as a result of acid rain, on the rate of death and cell proliferation in petunias (*Calibrachoa parviflora*). For this purpose, a group of petunias was subjected to three different conditions: group A or control, kept in optimum conditions and nutrient supply, group B in the absence of nutrients and natural light and group C, exposed to water acidified with sulfuric acid. In continuous observations for up to 72 hours, samples from petals, leaves and stems of each plant were analyzed and after nuclei extraction; these were treated with propidium iodide, a DNA intercalator compound, and analyzed by flow cytometry and fluorescence microscopy. The results show that both extreme conditions generate an imbalance in the process of death/survival of petunias, but unlike plants from group B, plants in group C, did not increase their rate of cell proliferation. These results suggest that plants growing in acid soils lose their ability to compensate the stress signal generated as a result of acute exposure to toxic concentrations of sulfuric acid.

Keywords

Cell death, chromatin degradation, acid rain, plants, greenhouse effect.

Introducción

Al igual que todo organismo, las plantas están formadas por células, las cuales representan la unidad más pequeña, estructural y funcional de todos los seres vivos. Las plantas cumplen con procesos muy importantes tanto para su existencia como para el resto de los seres vivos; el más claro ejemplo de esto es la fotosíntesis (1). Al igual que en otros seres vivos, los fenómenos de crecimiento, desarrollo y diferenciación están controlados por un equilibrio entre la sobrevida y la muerte celular programada; esta última consiste en una cascada de eventos cuya función es mantener la integridad del organismo al eliminar células defectuosas o envejecidas (2), pero que puede resultar en un blanco de agentes externos que afectan la fisiología del organismo (3). La muerte celular juega un papel importante en procesos como resistencia a condiciones ambientales desfavorables como carencia de nutrientes, temperaturas exageradas, estrés oxidativo entre otros (4).

En el ecosistema donde los organismos vegetales se encuentran y se adaptan para desarrollarse, inciden factores ambientales que pueden alterar consecuentemente su ciclo de vida (5, 6). Entre los factores más notables tenemos el calentamiento global y la lluvia ácida, cuyas características logran afectar enormemente al reino vegetal, bien sea por efecto de la pérdida de nutrientes, como por la acidificación o alteración de los suelos, entre otros (7, 8). Además de los factores ambientales, también se encuentra el efecto causado por la intervención del hombre como factor importante que genera condiciones de peligro para el planeta ya que éste contribuye en gran medida con la contaminación del ambiente y a la alteración del equilibrio climático (9). La muerte celular programada (MCP) es esencial para mantener la homeostasis tisular en muchas formas de vida (7). En las plantas, de igual forma que en los animales, la MCP es el mecanismo por el cual se regulan una serie de procesos fisiológicos; en plantas, estos incluyen la germinación, diferenciación, crecimiento, reproducción y desarrollo de semillas. La MCP también juega un papel importante en otros procesos como la resistencia a condiciones ambientales desfavorables tales como falta de nutrientes, temperaturas extremas, hipoxia, ataque por patógenos y agentes tóxicos (10, 11).

La adaptación de las plantas a las condiciones ambientales adversas permite la manifestación de otros modelos tradicionales de MCP. Por ejemplo,

cuando las raíces carecen de O₂, como sucede cuando el suelo se inunda, las plantas sobreviven al fomentar la formación del parénquima, un tejido poroso cuya función es facilitar el transporte del O₂ del vástago a las células de la raíz. La formación del parénquima implica la muerte orquestada de células normales, dando lugar a la formación de cavidades que facilitan el intercambio gaseoso mientras se reduce el número de células que requieren O₂. La hipoxia aumenta la producción del etileno, que induce la formación del parénquima; a nivel celular, este tipo de muerte programada se acompaña de una importante vacuolización (12).

Un efecto ambiental que resulta como consecuencia de la contaminación inducida por la mano del hombre es la llamada lluvia ácida, la cual se forma cuando el agua en el aire (la humedad) se combina con los óxidos de nitrógeno y el dióxido de azufre emitidos por fábricas, centrales eléctricas y vehículos que queman carbón o productos derivados del petróleo. En interacción con el vapor de agua, estos gases forman ácido sulfúrico y ácido nítrico. Finalmente, estas sustancias químicas caen a la tierra acompañando a las precipitaciones, constituyendo así la llamada lluvia ácida (13). Los contaminantes atmosféricos primarios que dan origen a la lluvia ácida pueden recorrer grandes distancias, y ser trasladados por los vientos cientos o miles de kilómetros antes de precipitar en forma de rocío, lluvia, llovizna, granizo, nieve, niebla o neblina. Cuando se produce la precipitación, ésta puede provocar deterioros importantes en el ambiente (14).

Estudios previos han demostrado que en plantas sometidas a condiciones extremas tales como altas temperaturas, luz UV y exceso de agua, se altera la tasa de crecimiento la cual se ve asociada a un incremento en la emisión foliar de metano (CH₄), componente que se correlaciona con el incremento del efecto invernadero (15). Además, el efecto invernadero conduce a la acumulación de diferentes compuestos en la atmósfera que causa secuelas adversas en el ecosistema. La acumulación de CO₂ (otro de los gases acumulados durante el efecto invernadero), en asociación con las altas temperaturas, también tiene un efecto negativo sobre la fotosíntesis -una función vital para las plantas (16).

Las plantas además son capaces de responder frente a estos factores ambientales extremos (altas temperaturas) con un incremento de especies reactivas del oxígeno como el óxido nítrico (NO), sustancia que bajo condiciones fisiológicas ejerce funciones de defensa (plantas-microorganismos) y control del metabolismo celular; sin embargo, su

acumulación y producción de manera exagerada y descontrolada pudiera tener efectos deletéreos sobre estos organismos (17), como por ejemplo hacerlas más susceptibles a sufrir muerte celular.

La muerte celular ha sido estudiada en pétalos de Petunia híbrida utilizando como parámetros la degradación del ADN y cambios en la morfología nuclear. Estos análisis se han llevado a cabo mediante la tinción del ADN con ioduro de propidio y por citometría de flujo (18).

En este trabajo se evaluaron los efectos de condiciones ambientales adversas como la deprivación de nutrientes y el depósito ácido sulfúrico (H_2SO_4) en el suelo, en plantas de petunia (*C. parviflora*) midiendo señales de muerte y sobrevida, utilizando técnicas como la citometría de flujo y la tinción del ADN nuclear con ioduro de propidio.

Metodología

Condiciones de cultivo de las plantas: Se emplearon 3 plantas de petunia (*C. parviflora*) por cada subgrupo, cada uno de los cuales posteriormente fue sometido a tres condiciones diferentes: un primer grupo (grupo A) se mantuvo bajo condiciones control con suplemento de nutrientes y exposición a la luz del día, el segundo grupo (grupo B) se mantuvo en la oscuridad y sin nutrientes, y un tercer grupo (grupo C) se mantuvo en un ambiente rico en ácido sulfúrico (2 mM, pH=2,5), el cual fue agregado al agua corriente y aplicado diariamente a las plantas. Las plantas fueron crecidas en condiciones de laboratorio, empleando tierra abonada orgánicamente como sustrato y mantenidas en un rango de temperatura entre 22 y 24 °C durante el día y entre 18 y 20 °C durante la noche; se utilizó iluminación natural con alternancia de ciclos de luz y oscuridad (excepto para el grupo B). Las plantas fueron evaluadas diariamente durante 72 horas (3 días), haciendo observaciones tanto macroscópicas como microscópicas, las cuales fueron anotadas cada 24 horas. Se tomaron muestras de diferentes partes de las plantas (flores, hojas y tallos) a fin de evaluar la muerte celular a través de la degradación del ADN mediante tinción con ioduro de propidio.

Homogeneización del tejido vegetal y purificación de núcleos: Los pétalos, las hojas y los tallos fueron cortados en trozos diminutos para permitir la separación apropiada de los núcleos usando un bisturí en presencia del amortiguador de extracción (45 mM de cloruro de magnesio, 30 mM de citrato de

sodio, 20 mM de MOPS (4-sulfonato de morpholinopropano), 0,1% de Triton X-100, pH 7,0). El extracto obtenido por cada sección de la planta, en el total de las 9 plantas, fue filtrado a través de una malla de nylon para luego ser teñido con ioduro de propidio (10 µg/ml), e incubado durante 30 minutos, protegido de la luz, para luego proceder al análisis mediante citometría de flujo.

Detección de la fragmentación del ADN: Las muestras fueron analizadas a través de un citómetro de flujo FACSCAN, Becton and Dickinson, y se capturaron un total de 10.000 eventos por cada muestra cada 24 horas hasta 72 horas de observación. Para el análisis de los resultados, se establecieron dos ventanas: una correspondiente a los parámetros de tamaño y complejidad de partículas, y el otro para analizar la fluorescencia de las partículas emitida por el ioduro de propidio en el canal FL2, ésta se representó en histogramas y se tomaron como núcleos en degradación (reflejando muerte celular) todas aquellas partículas que se ubicaron detrás del pico G0-G1 en el perfil de ADN en el ciclo celular, y como señal de proliferación el pico ubicado por delante de la fase S, llamado G2/M. Se utilizó el programa CellQuest proporcionado por la casa comercial Becton and Dickinson (San José de California, USA). Adicionalmente, una porción de la muestra se montó en una laminilla portaobjetos, la cual se visualizó y documentó en el microscopio de fluorescencia.

Análisis estadísticos: Los parámetros evaluados se expresaron usando la media ± desviación estándar (DS). Las diferencias entre los promedios de los grupos estudiados se analizaron usando la prueba t-student calculada con el programa Statgraphic Centurion XV.II. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

Resultados

Observaciones macroscópicas: Los tres grupos de plantas fueron evaluadas cada 24 horas durante un periodo de 72 horas, tomándose documentación fotográfica de cada una de estas observaciones. En la figura 1 se puede observar que en el tiempo 0, al inicio de los experimentos, no existen diferencias macroscópicas entre los 3 grupos estudiados. En la figura 2 se evidencia que a las 72 horas de observación, las plantas muestran características distintivas entre los 3 grupos analizados. A saber: el grupo A, o grupo control,

mantuvo las flores, la turgencia en los tejidos, y la coloración característica comparable a la observada al inicio de los experimentos. En el grupo B se observó disminución en el número de flores con discreta opacidad en la coloración de las hojas, sin cambios en la turgencia de las mismas. En contraste, las plantas del grupo C mostraron pérdida de las flores, pérdida de la turgencia y opacidad de hojas y tallos.



Figura 1. Detalles macroscópicos de las plantas de *Calibrachoa parviflora* al inicio del estudio (tiempo 0). Grupo A: Control, Grupo B: Privado de nutrientes y en ausencia de luz natural, y Grupo C: presencia de ácido sulfúrico en el suelo.

Análisis mediante citometría de flujo: Los suspensiones de núcleos obtenidos de cada sección de las plantas: flores, hojas y tallos, por cada grupo analizado (un total de 27 muestras cada 24 horas), fueron analizadas mediante citometría de flujo. En la figura 3a se destaca el proceso de degradación del ADN nuclear en los pétalos de las plantas de los 3 grupos analizados, expresado en cifras porcentuales. Puede observarse que existe una tendencia al incremento en la degradación de los núcleos tanto en las condiciones de carencia de nutrientes (grupo B) como en las sometidas al ácido sulfúrico (grupo C). En la figura 3b se observa la tinción de partículas correspondiente a la fase G2/M del ciclo celular; es decir, a la duplicación del contenido de ADN. Es interesante que puede observarse que en los pétalos

del grupo de plantas sometidas a privación de nutrientes (grupo B) existe un incremento importante en la intensidad de fluorescencia en la fase G2/M, en contraste con lo observado en el grupo C en donde este pico de fluorescencia está ausente y sugiere un impacto importante en la capacidad de crecimiento celular. Estas observaciones se repiten en las hojas (figura 4a, 4b) y en los tallos (figura 5a, 5b). Las figuras 3c, 4c y 5c son imágenes representativas del análisis realizado en las diferentes partes de las plantas entre los 3 grupos analizados. Las mismas se han solapado para efectos de comparación entre grupos y destacadas en colores distintos. En estas figuras se destaca el incremento de la muerte inducida por la exposición al H₂SO₄, (línea naranja) y la duplicación del ADN compensatoria en las plantas sometidas a privación de nutrientes (línea verde).

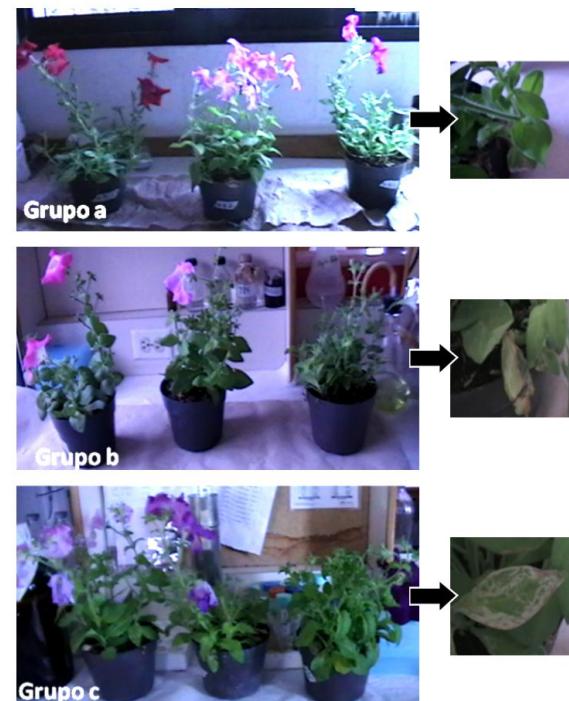


Figura 2. Detalles macroscópicos de las plantas de *Calibrachoa parviflora* después de 72 horas expuestas a las condiciones experimentales. Grupo A: Control, Grupo B: Privado de nutrientes y en ausencia de luz natural, y Grupo C: presencia de ácido sulfúrico en el suelo.

Estos hallazgos fueron además confirmados a través de microscopía de fluorescencia (figura 6), donde se muestra un incremento del brillo de los núcleos teñidos con ioduro de propidio en las plantas del grupo B (figuras 6b, 6e, 6h), en comparación con el grupo A (figuras 6a, 6d, 6g), mientras que en el grupo

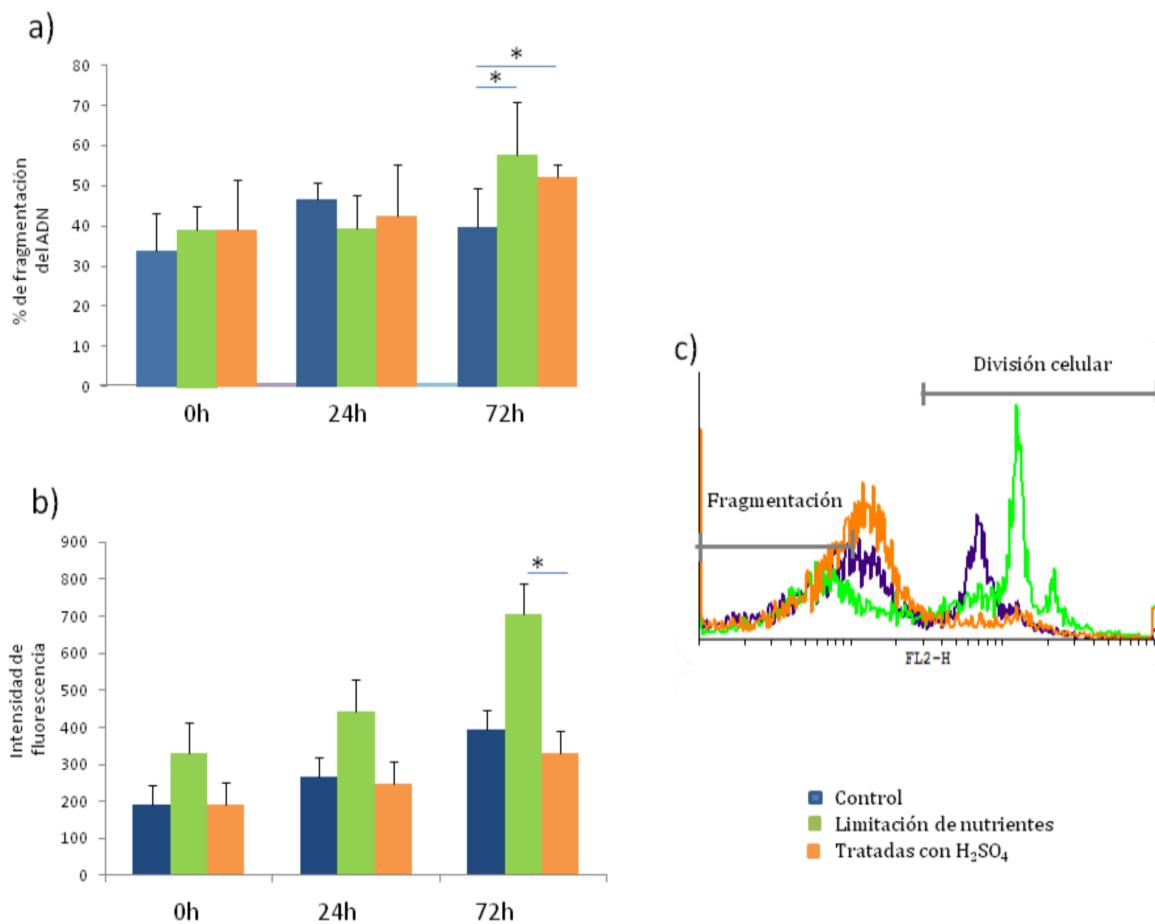


Figura 3. Análisis de la fragmentación del ADN en pétalos de plantas de *Calibrachoa parviflora*. a. Porcentaje de fragmentación del ADN analizado mediante citometría de flujo correspondiente al material genético detrás del pico G1. b. Medición de la duplicación del contenido del ADN a través de la determinación de la intensidad de la fluorescencia en la fase G2/M. c. Solapamiento de histogramas representativos de las tres condiciones, mostrando fragmentación del núcleo celular y división celular en pétalos de plantas de *Calibrachoa parviflora*. * indica diferencias estadísticamente significativas.

C, se evidencia fundamentalmente fragmentación nuclear (figuras 6c, 6f, 6i), característica básica de la muerte celular.

Discusión

Los procesos de muerte y división celular son fundamentales en la fisiología de los seres vivos, y debe existir, tanto en las células animales como en las plantas, un equilibrio entre ambos que permitan el crecimiento, desarrollo y diferenciación de los tejidos (19, 20). En este estudio se han utilizado herramientas como la citometría de flujo y la microscopía de fluorescencia para analizar los efectos que pueden ocasionar condiciones ambientales adversas, tales como la carencia de nutrientes y la acidificación de los suelos, sobre plantas de *C. parviflora*, las cuales han sido previamente estudiadas mediante esta técnica,

para cuantificar el fenómeno de muerte celular programada (21).

Como aspecto más resaltante a destacar es la pérdida del equilibrio entre la muerte y la proliferación celular en aquellas plantas sometidas a condiciones adversas. Así, en el grupo de plantas tratadas con ácido sulfúrico (grupo C) se pudo observar que además de una tendencia a incrementar la degradación de la cromatina en las estructuras analizadas, en particular pétalos y tallos, se observó disminución marcada de la proliferación celular como lo demuestra la reducida duplicación del ADN. Por otro lado, en el grupo B de plantas en oscuridad y sin nutrientes, además de una tendencia a una mayor degradación del ADN en todas las muestras analizadas, se observó de manera muy notoria un incremento en la intensidad de la fluorescencia en el área correspondiente al pico G2/M, lo que se traduce en incremento en la proliferación

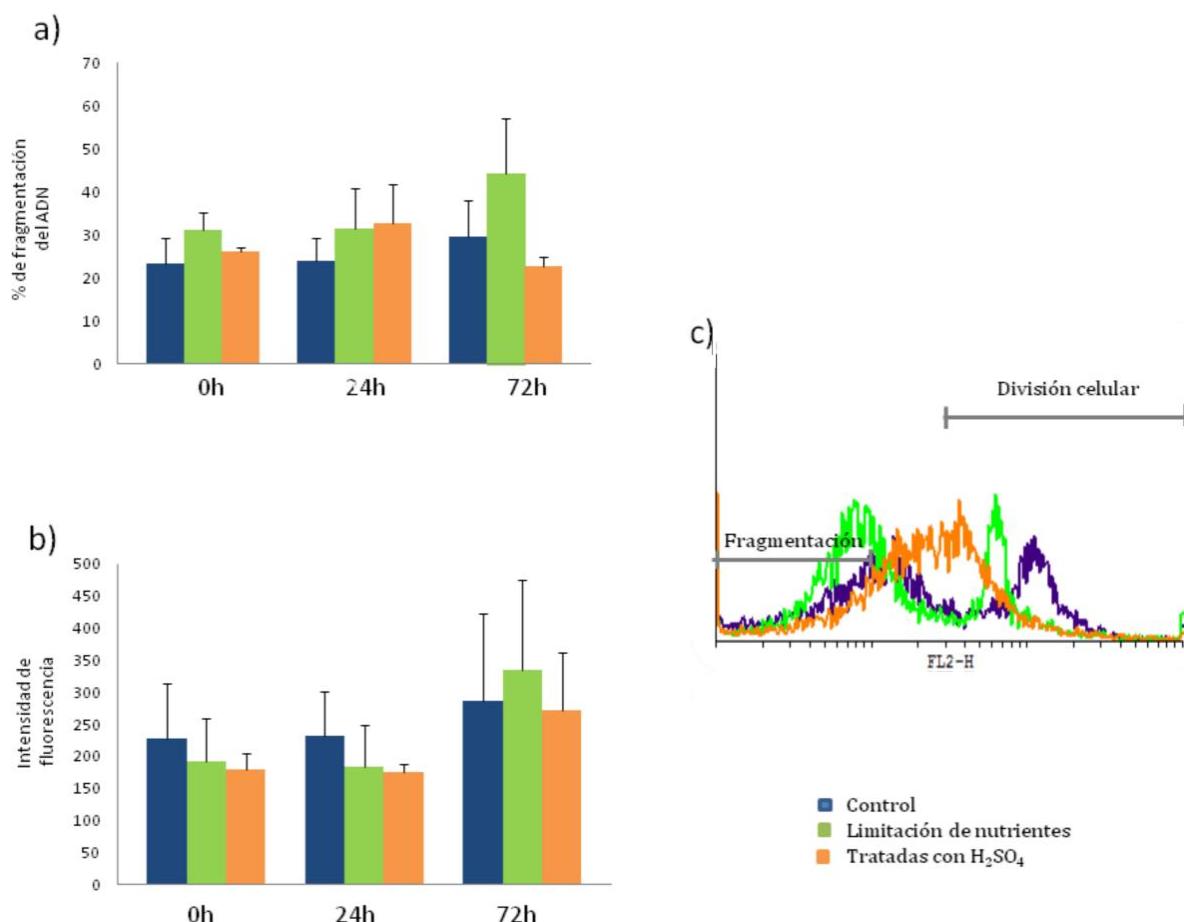


Figura 4. Análisis de la fragmentación del ADN en hojas de plantas de *Calibrachoa parviflora*. a. Porcentaje de fragmentación del ADN analizado mediante citometría de flujo correspondiente al material genético detrás del pico G1. b. Medición de la duplicación del contenido del ADN a través de la determinación de la intensidad de la fluorescencia en la fase G2/M. c. Solapamiento de histogramas representativos de las tres condiciones, mostrando fragmentación del núcleo celular y división celular en hojas de plantas de *Calibrachoa parviflora*. * indica diferencias estadísticamente significativas.

celular. Estos resultados sugieren que mientras que en el grupo B, se pone en marcha un mecanismo compensatorio como lo es la proliferación celular dentro de las 72 horas de observación, en el grupo C con tratamiento ácido del suelo, este mecanismo compensatorio se pierde desde las primeras 24 horas indicando un efecto deletéreo muy prominente y agudo. Estos resultados pudieran extrapolarse a lo que sucede en los suelos y en la vida vegetal expuesta a desechos industriales y productos de combustión, puesto que las concentraciones de ácido sulfúrico utilizadas son las consideradas como tóxicas para vegetales (15, 16, 20).

En este trabajo además se observaron cambios de color y turgencia de los pétalos de las plantas en estudio; cambios que fueron evidenciados fundamentalmente en los pétalos de las plantas sometidas a H_2SO_4 . Estos cambios semejan a la

senescencia floral, acelerada en el grupo C. Se ha descrito que estos cambios macroscópicos se asocian a fenómenos bioquímicos que incluyen un aumento en las enzimas hidrolíticas, la degradación de las macromoléculas, y un aumento en la actividad respiratoria (ROS) - eventos que preceden a la muerte celular programada (28) -, asociado con la ruptura de la membrana y la fragmentación del ADN (29); este último fue evidenciado en los pétalos de las petunias tratadas con H_2SO_4 . Así, la senescencia de los pétalos es considerada como otra forma de muerte celular programada en las plantas (29).

El proceso de muerte en las plantas puede ser activado por diversos eventos (22). Uno de ellos es producto de la acción de agentes patógenos que pueden inducir la muerte celular programada en los sitios de infección a través de un mecanismo conocido como respuesta hipersensible (HR), la cual le permite a

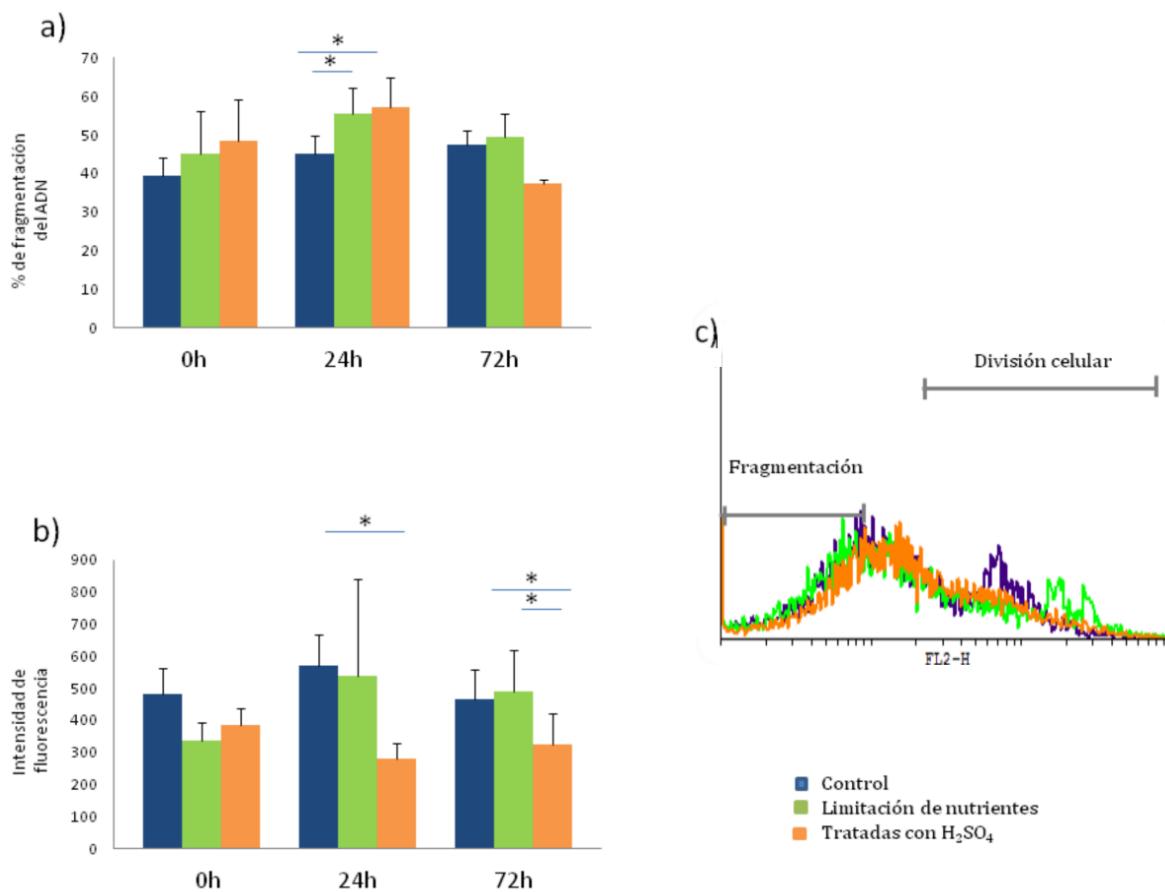


Figura 5. Análisis de la fragmentación del ADN en tallos de plantas de *Calibrachoa parviflora*. a. Porcentaje de fragmentación del ADN analizado mediante citometría de flujo correspondiente al material genético detrás del pico G1. b. Medición de la duplicación del contenido del ADN a través de la determinación de la intensidad de la fluorescencia en la fase G2/M. c. Solapamiento de histogramas representativos de las tres condiciones, mostrando fragmentación del núcleo celular y división celular en tallos de plantas de *Calibrachoa parviflora*. * indica diferencias estadísticamente significativas.

la planta aislar al patógeno, limitando así su dispersión y un daño mayor e incluso la muerte de toda la planta (23). Otra vía de activación de la muerte celular se produce en respuesta a la hipoxia, lo que determina la degradación de ciertas células del parénquima de las raíces (24), o como consecuencia de estrés abiótico (estrés por calor, ozono, etc.) (25, 26). Los contaminantes como el aluminio también han sido implicados en la activación de la muerte celular en las plantas a través de la inducción de la liberación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del daño mitocondrial (27).

Los ROS son producidos en las plantas en respuesta a estímulos de estrés o como resultado de la reducción de O₂ durante procesos metabólicos/fisiológicos. Sin embargo, cuando ocurre un desbalance en su producción, estos son perjudiciales (30) debido a su capacidad para provocar daño oxidativo del ADN, que inevitablemente inducen la muerte celular (4), y en la actualidad son

considerados como mediadores clave de este proceso en plantas.

En base a estos antecedentes, es importante profundizar en los mediadores que se asocian con la muerte celular en los dos modelos utilizados en este estudio: cuando las plantas fueron privadas de nutrientes, a pesar de activarse el proceso de muerte fundamentalmente en los pétalos y tallos, se dispara el proceso de duplicación del ADN a fin de compensar el daño tisular, a diferencia de lo observado en las plantas sometidas al H₂SO₄, donde este evento compensatorio no ocurre.

Finalmente, es importante evaluar el papel de los ROS y de las mitocondrias en los fenómenos acá reportados, además de someter a las plantas a un periodo de observación más extenso a fin de contribuir a comprender con mayor claridad la naturaleza de este fenómeno.

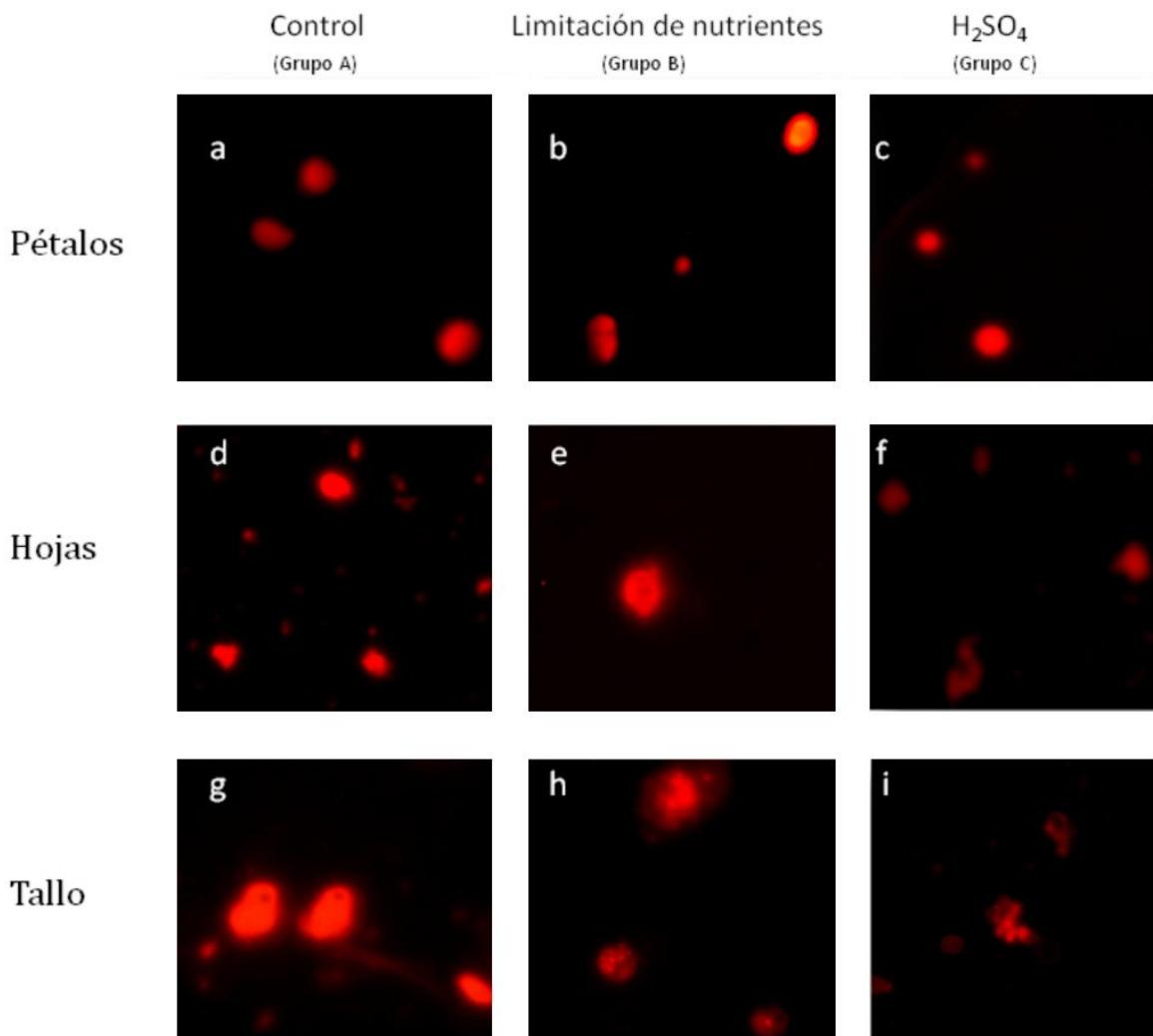


Figura 6. Evaluación por microscopía de fluorescencia de los núcleos purificados de las plantas *Calibrachoa parviflora*. Figuras 6a, 6d y 6g, corresponden a los núcleos teñidos con ioduro de propidio de los pétalos, hojas y tallos del grupo A. Figuras 6b, 6e y 6h, corresponden a los núcleos teñidos con ioduro de propidio de los pétalos, hojas y tallos del grupo B. Figuras 6c, 6f y 6i, corresponden a los núcleos teñidos con ioduro de propidio de los pétalos, hojas y tallos del grupo C.

Referencias

- Eveland AL, Jackson DP, Sugars, signalling, and plant development. J Exp Bot 2011. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- van Doorn WG, Beers EP, Dangl JL, Franklin-Tong VE, Gallois P, Hara-Nishimura I, Jones AM, Kawai-Yamada M, Lam E, Mundy J, Mur LA, Petersen M, Smertenko A, Taliantsky M, Van Breusegem F, Wolpert T, Woltering E, Zhivotovsky B, Bozhkov PV, Morphological classification of plant cell deaths. Cell Death Differ 2011; 18: 1241-6. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Vanyushin BF, Bakeeva LE, Zamyatnina VA, Aleksandrushkina NI, Apoptosis in plants: specific features of plant apoptotic cells and effect of various factors and agents. Int Rev Cytol 2004; 233: 135-79. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- De Pinto MC, Locato V, De Gara L, Redox regulation in plant programmed cell death. Plant Cell Environ 2011; 34: 1111-21. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Baslam M, Pascual I, Sanchez-Diaz M, Erro J, Garcia-Mina JM, Goicoechea N, Improvement of nutritional quality of greenhouse-grown lettuce by arbuscular mycorrhizal fungi is conditioned by the source of phosphorus nutrition. J Agric Food Chem 2011; 59: 11129-40. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Buck-Sorlin G, de Visser PH, Henke M, Sarlikioti V, van der Heijden GW, Marcelis LF, Vos J, Towards a functional-structural plant model of cut-rose: simulation of light environment, light absorption, photosynthesis and

- interference with the plant structure. Ann Bot 2011; 108: 1121-34. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
7. Qu GQ, Liu X, Zhang YL, Yao D, Ma QM, Yang MY, Zhu WH, Yu S, Luo YB, Evidence for programmed cell death and activation of specific caspase-like enzymes in the tomato fruit heat stress response. *Planta* 2009; 229: 1269-79. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 8. Wagstaff C, Bramke I, Breeze E, Thornber S, Harrison E, Thomas B, Buchanan-Wollaston V, Stead T, Rogers H, A specific group of genes respond to cold dehydration stress in cut Alstroemeria flowers whereas ambient dehydration stress accelerates developmental senescence expression patterns. *J Exp Bot* 2010; 61: 2905-21. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 9. Cruz M, Características generales del reino Plantae. Plan de Estudios de Bachillerato Tecnológico en Informática Administrativa, 2008.
 10. Lin KC, Sun PC, Lin PL, Production of reactive oxygen species and induction of signaling pathways for the ACO gene expressions in tomato plants triggered by the volatile organic compound ether. *Plant Cell Rep* 2011; 30: 599-611. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 11. Lord CE, Gunawardena AH, Environmentally induced programmed cell death in leaf protoplasts of *Aponogeton madagascariensis*. *Planta* 2011; 233: 407-21. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 12. Cao M, Li X, Die for living better. Plants modify root system architecture through inducing PCD in root meristem under severe water stress. *Plant Signal Behav* 2010; 5: 1645-6. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 13. Singh A, Agrawal M, Acid rain and its ecological consequences. *J Environ Biol* 2008; 29: 15-24. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 14. Cohen JE, Population and climate change. *Proc Am Philos Soc* 2010; 154: 158-82. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 15. Qaderi MM, Reid DM, Methane emissions from six crop species exposed to three components of global climate change: temperature, ultraviolet-B radiation and water stress. *Physiol Plant* 2009; 137: 139-47. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 16. Wang D, Heckathorn SA, Barua D, Joshi P, Hamilton EW, LaCroix JL, Effects of elevated CO₂ on the tolerance of photosynthesis to acute heat stress in C₃, C₄, and CAM species. *Am J Bot* 2008; 95: 165-76. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 17. Bouchard JN, Yamasaki H, Heat Stress Stimulates Nitric Oxide Production in *Symbiodinium microadriaticum*: A Possible Linkage between Nitric Oxide and the Coral Bleaching Phenomenon. *Plant Cell Physiol* 2008; 49: 641-52. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 18. Loureiro L, Rodriguez E, Dolezel J, Santos C, Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content. *Ann Bot* 2006; 98: 515-27. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 19. Guiboileau A, Sormani R, Meyer C, Masclaux-Daubresse C, Senescence and death of plant organs: nutrient recycling and developmental regulation. *C R Biol* 2010; 333: 382-91. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 20. Reape TJ, McCabe PF, Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants. *Apoptosis* 2010; 15: 249-56. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 21. Yamada T, Ichimura K, van Doorn WG, DNA degradation and nuclear degeneration during programmed cell death in petals of *Antirrhinum*, *Argyranthemum*, and *Petunia*. *J Exp Bot* 2006; 57: 3543-52. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 22. Giuliani C, Consonni G, Gavazzi G, Colombo M, Dolfini S, Programmed cell death during embryogenesis in maize. *Ann Bot* 2002; 90: 287-92. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 23. Greenberg JT, Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 12094-7. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 24. Drew MC, He CJ, Morgan PW, Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends Plant Sci* 2000; 5: 123-7. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 25. Locato V, Gadaleta C, De Gara L, De Pinto MC, Production of reactive species and modulation of antioxidant network in response to heat shock: a critical balance for cell fate. *Plant Cell Environ* 2008; 31: 1606-19. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 26. Pasqualini S, Piccioni C, Reale L, Ederli L, Della Torre G, Ferranti F, Ozone-induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiol* 2003; 133: 1122-34. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 27. Li Z, Xing D, Mitochondrial pathway leading to programmed cell death induced by aluminum phytotoxicity in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav*; 5: 1660-2. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 28. Xu Y, Hanson MR, Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in petunia. *Plant Physiol* 2000; 122: 1323-33. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 29. Wingler A, Brownhill E, Pourtau N, Mechanisms of the light-dependent induction of cell death in tobacco plants with delayed senescence. *J Exp Bot* 2005; 56: 2897-905. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 30. Moller IM, Jensen PE, Hansson A, Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2007; 58: 459-81. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

Inflammasomes – Fighting the enemy from within (Inflamasomas – atacando al enemigo desde adentro)

Joselyn Rojas

Instituto de Inmunología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, Mérida - Venezuela.

[ARTICULO DE REVISION]

Recibido: 1 de Octubre de 2011. Aceptado: 2 de Diciembre de 2011.

Resumen

Los inflamasomas son un grupo de proteínas que participan en el sistema de detección y erradicación intracelular, siendo un aspecto fundamental del sistema inmune innato. Las proteínas involucradas pertenecen a la familia de proteínas CATERPILLER las cuales contienen un dominio de reclutamiento de caspasas, pirina, dominio de unión a nucleótidos y repeticiones de leucina. Actualmente, hay 4 tipos de inflamasomas descritos y se han considerado parte de un abanico de eventos dentro del fenómeno de defensa: a) NLRP1 el cual activa a Caspasa-1 y Caspasa-5; b) NLRC4, acoplado a NAIP5 para la activación de Caspase-1; c) NLRP3, el inflamasoma prototípico, el cual produce Caspase-1; y d) AIM2, funcionando como sensor de ADN. La siguiente revisión discute la información más reciente de los subtipos de inflamasomas, su influencia en la polarización de la respuesta inmune y su participación en la patogenia de enfermedades metabólicas como diabetes y aterosclerosis.

Palabras clave

Inflamasomas, caspasas inflamatorias, defensa ante microorganismos intracelulares, polarización de la respuesta inmune, inmunometabolismo.

Abstract

The inflamasomes are a group of proteins that participate in the intracellular detection and eradication system, being an important piece in the innate immune system. The proteins involved belong to the CATERPILLER family of proteins which contain a caspase recruiting domain, pyrin, a nucleotide binding domain and leucine repeats. Currently, 4 types of inflamasomes are described and are part of an array of events within the defense phenomena: a) the NLRP1 which activates Caspase-1 and Caspase-5; b) NLRC4, that coupled with NAIP5 relates to Caspase-1 activation; c) NLRP3, the prototype inflamasomes, which produces Caspase-1; and d) AIM2 that functions as a DNA sensor. The following review discusses the current information regarding each subtype of inflamasomes, its influence in the immune response and their role in the pathogenesis of metabolic diseases like diabetes and atherosclerosis.

Keywords

Inflamasomes, inflammatory caspases, intracellular microorganism defense, immune response polarization, immunometabolism.

Introducción

Evolution has granted higher vertebrate members with an efficient immune system which relies not only in an innate “seek and destroy” arrangement (dendritic cells, macrophages, neutrophils, eosinophil, and NK), but also in an adaptive mechanism to provide specific targets of destruction and long-lasting memory of such killing specificities (B and T cells). Even though, mainstream

research was focused on the adaptive system for a long period of time, the discovery and characterization of Toll-like receptors in humans and other mammals challenged the coined concept of “non-specific innate system”. The Pattern Recognition Receptors (PRR) provide the cell with an array of complex proteins which are capable of activation of coagulation and complement pathways, inflammation, opsonization and induction of apoptosis, all mediated through the detection of Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) – highly conserved

molecular signatures which work as beacons for microbial pathogens and stress signals from injured cells (1). The acquisition of PRR throughout evolution secured the interaction and recognition of PAMPs allowing the detection of infection, but the downside of the system is that PAMPs are not solely expressed in pathogenic microorganisms, it's actually shared with commensal microflora (2-7). PRR can be classified in three groups (8): those which are assembled in the plasma membrane (like CD14, MARCO, among others), the intracellularly assembled (such as NODs and PKR), and the soluble forms (for example C-reactive protein and mannan-binding lectine). The purpose of this review is to dissect the molecular basis associated with the inflammasomes mediated by intracellular PPRs and their role in modulating normal immune response and metabolic diseases.

The Inflammasomes

Martinon et al. (9) published back in 2002 about a super molecular protein complex which was capable of activating caspase-1 and caspase-5, which were enzymes required for the final processing and cleavage of pro-IL-1 β and pro-IL-18. In this first description, the authors explain that the complex requires caspase-1 and caspase-5 recruitment, the coupling with the proteins ASC and NALP1. Of course, this first characterization has evolved over the past 9 years, thanks to several findings within the NLR family. The capability for activating proinflammatory caspases is not restricted to NLRP1/NALP1, in fact, NLRP3 and NLRC4/IPAF are also considered inflammasomes pathways for IL-1 β , as well as inducers of autophagy and cell death (10-12); see Figure 1. The main role on inflammasomes is to serve as immune guardians of the

cytosol, acting as sentinels by identifying intracellular pathogens through PAMPs and immediately inducing an inflammatory response.

Ting's laboratory (13) began working on the characterization of the genes associated with the peculiar family of proteins CATERPILLER, which stands for CARD, Transcription Enhancer, R(purine)-binding, Pyrin, Lots of Leucine Repeats (LRR) (See Figure 2). The current nomenclature established that the family should be named NLR for Nucleotide-binding domain and Leucine-rich Repeats (15). According to phylogenetic and functional characteristics, 22 human genes have been characterized dividing them in 4 groups (15-16): a) the CIITA subfamily/NLRA, comprising one member containing a CARD domain, the signaling molecule CIITA (class II major histocompatibility complex transactivator) which activated the transcription of the MHC class II genes; b) the NLRB subfamily, with NAIP (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein); c) the CARD containing subfamily/NLRC, encompassing NLRC3 (NOD3), NLRC4 (IPAF), NLRC5 (NOD27), NOD1 and NOD2; and d) the NALP subfamily/NLRP, which has 14 members characterized by the presence of Pyrin, NATCH, NAD and LRR. There is a fifth subfamily, labeled NLRX, which has one member – NLRX1 – with no strong homology to the N-terminal domain, separating it from the other members of the family.

Inflammatory Caspases

The enzymes called caspases (Cysteine-ASPartic ProteASES) can be divided into 2 groups according to the final function of their action: a) proapoptotic caspases, also classified into 2 subsets, the initiator caspases (Casp-2, -8, -9 and -10), and the effector caspases (Casp-3, -6 and -7); and b)

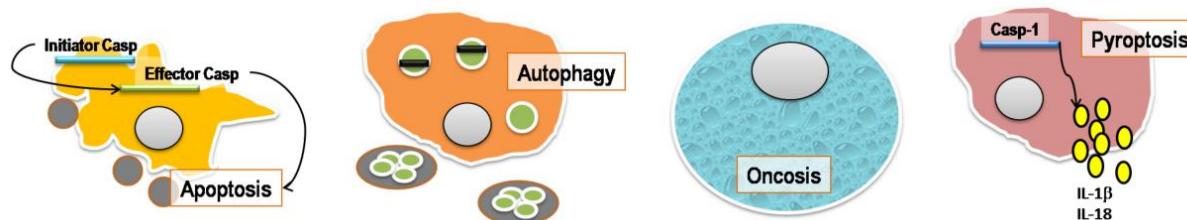


Figure 1. Mechanisms of cell death related to Inflammasomes. Apoptosis is associated with the production of effector caspases which generate vacuolization and apoptotic bodies. Another form of cellular death, autophagy, which is basically the degradation of cellular components in autophagy vesicles. Both mechanisms are considered non-inflammatory. The swelling of the cell, blebbing, and membrane permeability control failure leads to a prelethal state called Oncosis, which precedes death by Necrosis. This process is *per se* not inflammatory, but cellular debris released induces anti-inflammatory response to begin its removal. Finally, Pyroptosis is a form of apoptotic cell death Casp-1 dependent, which can be theoretically induced by any of the inflammasomes, since their main product is the pro-inflammatory cytokine IL-1 β which not only induces cell component lysis, but is also related to degradation of glycolytic enzymes, proving to use several mechanisms to secure cell death. Adapted from Labbé et al. (12).

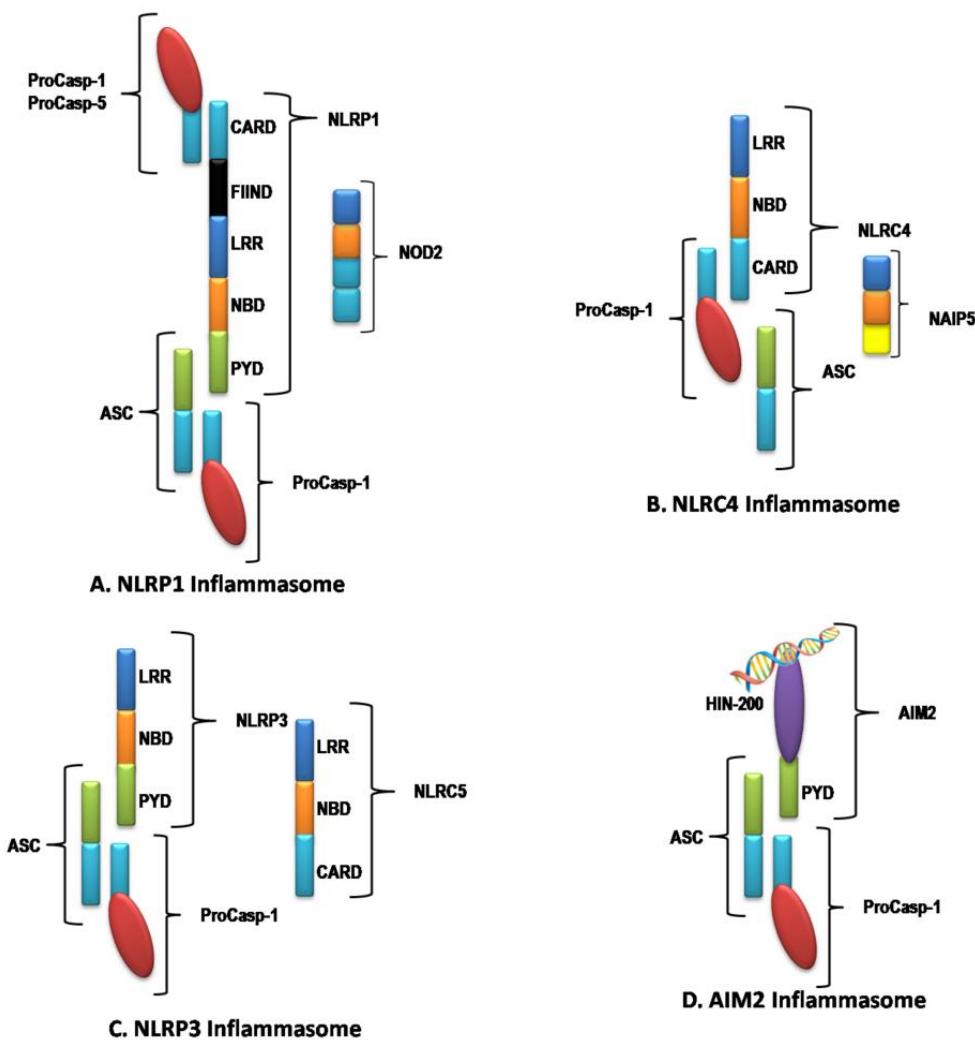


Figure 2. The diagram shows the different domains being assembled for each inflammasome. A – NLRP1 using a CARD domain in both termini of the protein, allowing for Casp-1 and Casp-5 activation. B – NLRC4 which is suspected to couple with NAIP5 (a Birc1e containing protein –yellow box) to modulate Casp-1 activation. C – NLRP3 showing its novel proposed interaction with NLRC5 for full activation of the complex. D – AIM2 and its 2-faced binding domains, PYD to recruit ASC and HIN-200 which allows DNA binding. Adapted from Kersee et al. (14).

inflammatory CARD-containing caspases, with Casp-1, Casp-4, and Casp-5 being related to inflammasomes and IL-1 β and IL-33 formation (17). Caspases 11 and 12 are known modulators of Caspase-1 activity (18), where Casp-11 is required for proper inflammasome activation in the presence of LPS but is dispensable during *L. monocytogenes* infection, while Casp-12 is the natural inhibitor molecule, limiting damage to cells during severe infection and stopping unwarranted activity of the inflammasome to prevent situations like those observed in Familial Cold Urticaria and CINCA (Chronic Infantile Neurological Cutaneous Articular syndrome).

NLRP1 Inflammasome

The NLRP1 protein is expressed in blood immune cells, even overlapping with NLRP3, but the difference of expression lies in their distribution in epithelial cells (19). The first is absent from stomach and intestinal epithelia, while both are expressed in lung and endometrium serving as a danger sensing structure in these tissues. Other sources of NLRP1 are testis, oligodendrocytes and neurons. Even though it belongs to the Casp-1 inflammasomes it differs from the others because it has a FIIND motif and a CARD domain in its C-terminal portion, elements that are absent in the rest of the groups (20). Moreover, this C-

terminal CARD domain can interact and activate Casp-5 (21). In a steady-state, NLRP1 is inhibited by direct interaction with anti-apoptotic molecules Bcl-2 and Bcl-XL, behaving in a dose-dependent manner, reaching inhibition of ATP binding to the NATCH domain of the inflammasome (22). Several activators have been proposed, yet the protein is capable of binding muramyl dipeptide (MDP), using NOD2 along this pathway, activating a structural 3D modification in NLRP1 which allows binding of ATP and oligomerization. One of the most important danger patrolling activities of NLRP1 is the ability to induce pyroptosis in the presence of Anthrax lethal toxin. This secreted factor from *Bacillus anthracis* is known to cleave mitogen activated protein kinase kinase (MAPKK), blunting the MAPK/Erk1/2 pathways which is involved in survival (23). Pyroptosis is a form of cell death in which the effector caspase is in fact Caspase-1 and not Caspase -3, -6 or -7, being an inflammatory kind of death due to the effect of IL-1 β . Newman et al. (24) reported that lethality from anthrax infection in rat depends on the chromosome 10 locus of NLRP1. Furthermore, Moayeri et al. (25) reported that mouse resistance to infection depended on the expression of toxin responsive (Nlrp1bS/S) or non-responsive (Nlrp1bR/R) alleles in neutrophils and macrophages. This toxin responsive phenotype allows for pyroptosis to occur after release of cathepsin B from the lysosomes ("lysosomal membrane permeabilization"), using this form of cell death as the mechanism of destruction of the agent (26).

NLRP3 Inflammasome

Just as NLRP1 expression, NLRP3 is expressed in immune cells, including B and T cells. Nevertheless, it is also observed in non-keratinizing keratinocytes from mouth, esophagus, ectocervix, vagina and urinary tract (19). Also, NLRP3 has been observed in skin keratinocytes, which suggests that this type of inflammasome is related to injury by ultraviolet light and similar agents (19). The ASC protein coincides with the expression pattern of NLRP3, although it is not exclusive since it's also observed in spinal cord, trophoblast, tubule epithelium from kidney, colon, Leydig cells in testis, hair follicle and eccrine sweat glands in the skin (22). Arrays of stimuli are known to induce this superstructure, such as *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium marinum*, *gonococcus*, *E. coli*, *Candida albicans*, LPS, MDP, nigericin, amongst others (21).

Several issues have been raised with this superstructure, modulation of the expression of Nlrp3 and activation mechanisms. It has been suggested that

NLRP3 inflammasome assembly needs priming for proper oligomerization. Bauernfeind et al. (27) reported that NF- κ B signals are a necessary checkpoint for NLRP3 activation, inducing Nlrp3 expression. Moreover they state that macrophages acquire NF- κ B signals from other PRRs, probably Toll-like receptors, sending the signal to the nucleus to start transcription. As for the activation mechanisms, various classical models have been proposed (20): extracellular ATP and K $^{+}$ efflux, pore forming devices, and crystal activators. In an exemplary review, Tschopp and Schroder (28) describe the 3 mechanisms proposed of NPLR3 activation in the light of new information, giving emphasis in the new proposed role for ROS in the activation pathway. Briefly, the (a) channel model refers to an ATP-mediated activation which relies in K $^{+}$ efflux through the opening of the P2X2 ATP-gated ion channel; explaining how pore-forming toxins like the α -toxin of *S. aureus* (29) and nigericin (*Streptomyces hygroscopicus*) (30) induce pyroptosis. In the (b) lysosome rupture model, the release of cathepsin B from the failed phagocytosis triggers inflammasome activation. The last model involves the (c) production of Reactive Oxygen Species (ROS) and modulation of inflammasome activation.

The synthesis of ROS has been observed in virtually all NLRP3 inducers, thus suggesting that they play a part in the activation process. Further evidence comes from the observation that thioredoxin (TRX) interacts with NLRP3 (31). The thioredoxin system (32) has 2 enzymes at play, the TRX and thioredoxin reductase. Both proteins work in a circuit to reduce several potentially damaging substances, including hydrogen peroxide, oxidized glutathione, and other oxidized molecules. They are also known to inhibit apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) playing a role in the survival related to antioxidant substances (33). Zhou et al. (31) proposes that redox imbalance is one of the inducers of IL-1 β production in inflammatory diseases, including type 2 Diabetes (34). The suggested mechanism involves the dissociation of thioredoxin-interacting protein (TXNIP) from its complex with TRX, in a ROS dose-dependent manner, allowing TXNIP to bind NLRP3. Now, in spite of evidence supporting the ROS theory, there are studies that seem to differ. Such is the case of van de Veerdonk et al. (35) who published that patients with mutations in the p47-phox subunit of the NAPH Oxidase complex (chronic granulomatous diseases - CGD) had enhanced IL-1 β production, especially after being challenged with uric acid crystals, suggesting a modulating role (perhaps inhibition) in inflammasome activation. In fact, van Bruggen et al. reported that

NLRP3 activation is independent of NOX1-4 (36). In this same line of investigation, Meissner et al. (37) demonstrated that Casp-1 activity and IL-1 β production was elevated in patients with asymptomatic CGD, concluding that ROS production is more likely to dampen or blunt NLRP3 inflammasome.

NLRC4/IPAF Inflammasome

Once thought to be the only one of its family to form an inflammasome, this protein has a CARD domain, which enables it to recruit Casp-1, but it requires ASC for full activation (19). This type of inflammasome is known for its activation in the presence of flagellin and type-III and type-IV secretion system from several bacteria including: *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *S. flexneri*, *L. monocytogenes* (38) and most importantly *L. pneumophila* (39) due to the activation of Casp-7 and the restriction of lung infection (40). It has been recently shown that NLRC4 and NLRP3 induce the Casp-1-dependent cleavage and activation of the DNA damage sensor poly(ADP-ribose) polymerase 1, which is considered the hallmark for apoptosis, shedding more light into the mechanisms of pyroptosis (41).

AIM DNA sensing Inflammasome

Absent In Melanoma 2 (AIM2) is a pyrin-containing protein which is part of the interferon-inducible HIN-200 family, capable of recognizing double-stranded DNA (18). Bürckstümmer et al. (42) identified AIM2 as a cytoplasmatic DNA sensor, able to recruit ASC and its "speckles" (agglomerates), and to induce IL-1 β production in monocytes, creating an inflammasome which is ASC dependent but NLRP3 independent. This finding was further supported by the work of Fernandes-Alnemri et al. (43), proposing that when viral DNA is located in unstable phagosomes NLRP3 is activated, but when DNA escapes the phagosome it is sensed directly through AIM2, inducing the activating cleavage of Casp-1 (44). This form of foreign DNA sensing is essential to the defense of intracellular bacteria and DNA viruses as has been observed in knock-out animal models (45) which show susceptibility to *L. monocytogenes* (46) and *F. tularensis* (47).

NLRC5 Inflammasome

Current findings indicate that this novel inflammasome is capable of interfering with antiviral responses. Benko et al. (48) reported that NLRC5 is mainly expressed in myeloid and lymphoid lineages, being involved in the blunting of type-I interferons and NF- κ B pathways, while inducing IL-10 when LPS was

applied to the model. In fact, it inhibits the phosphorylation of IKK and RIG-I/MDA5, limiting type-I responses while enabling NF- κ B and early response elements like TNF- α and IL-6 (49). Moreover, it has been shown that viral infection NLRC5 is induced, being associated with JAK/Stat and INF- γ pathways, offering a beneficial effect during viral infection (50). Kumer et al. (51) reported that NLRC5 controls the synthesis of IL-1 β , which was later associated to 3D interaction with NLRP3 through the NATCH domain, concluding that NLRC5 cooperates with the assembly of NLRP3 (52).

Polarization of the Immune Response

It has been suggested that IL-1 β is crucial for the proper immune response against several microorganisms, including *Mycobacterium tuberculosis* with the activation of NLRP3 (53), *Francisella tularensis* (54) and *Listeria monocytogenes* (55) with the induction of AIM2 inflammasome. Recent findings also provide evidence of the modulatory aspects of inflammasome regarding polarization of the immune response, whether it is T_H1, T_H2 or even T_H17 (Figure 3).

Immune responses

IL-18 is a known T_H1 response modulator, which is able to induce TNF- α , IL-1 β , INF- γ , Fas Ligand and several chemokines in T and NK cells (56), and in fact, IL-12 acts in conjunction with IL-18 and IL-1 β to induce INF- γ in T effector cells, assuring the promotion of a T_H1 response and its proinflammatory phenomena (57). Nevertheless, if IL-18 is secreted without the influence of an IL-12 driven response, it can stimulate a Th2 response with allergenic inflammation, putting it central stage in the decision-making aspect of the response (58). In the animal model for experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), NLRP3 inflammasome is an important modulator of INF- γ and IL-17 production, controlling Th1 and Th17 cell production (59). The EAE is an experimental model for multiple sclerosis, determined by the presence of autoreactive T cells which can be differentiated towards Th1 cells if influenced by IL-1 β , IL-12, IL-18 and INF- γ , while the Th17 cells are induced by IL-1 β , IL-6 and TGF- β . Meng et al. (60) published an animal model which had a gain-of-function mutation in NLRP3 similar to the one found in the Meckell-Wells Syndrome, reporting that the mice had increased skin neutrophil infiltration and an enhanced Th17 response and autoinflammation. Moreover, knock-out models

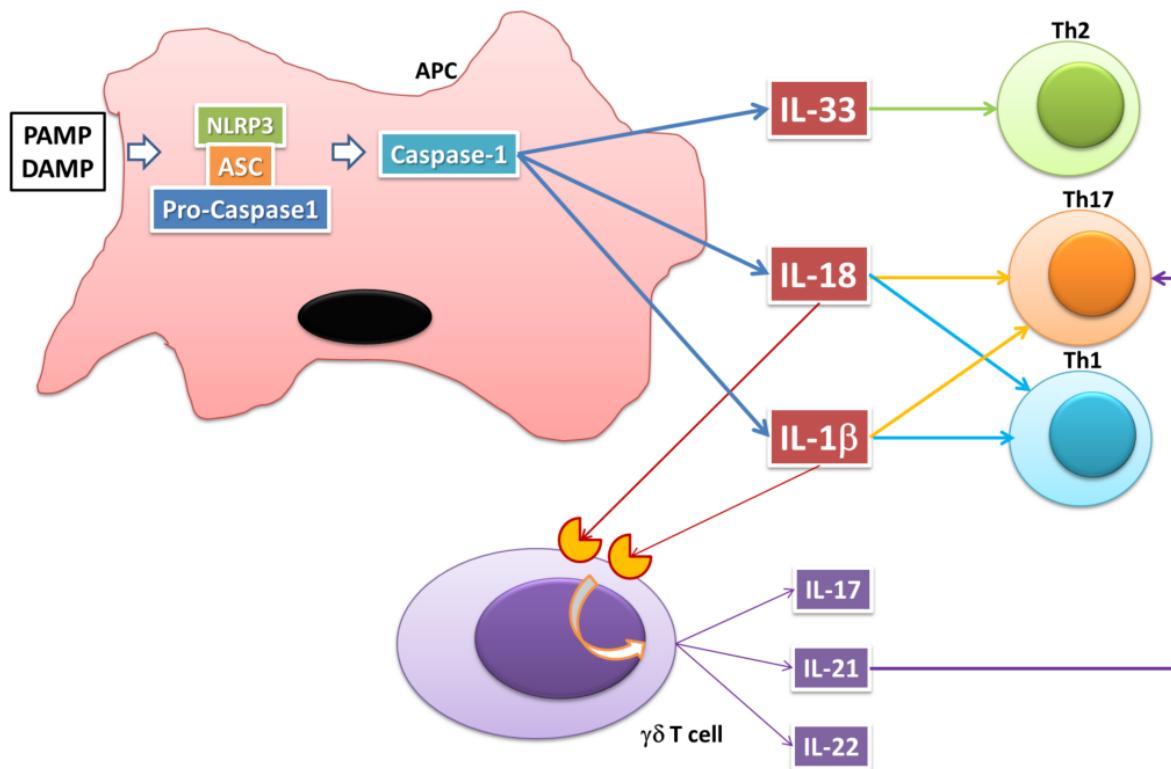


Figure 3. Polarization of the immune response by Inflammasome (NLRP3). The diagram shows the influence of the inflammatory caspases on the differentiation of T cell subsets. It also requires participation of $\gamma\delta$ T cells which aid in the differentiation of $T_{H}17$ by the production of IL-21. Adapted from Dungan et al. (62).

for $Nlrp3^{-/-}$, $IL-1\beta^{-/-}$, $IL-18^{-/-}$ and $Casp1^{-/-}$ revealed that all of these elements are key factors in demyelination, which prove them to be important in neuroinflammation (61). The $T_{H}17$ response involves the participation of $\gamma\delta$ T cells and iNKT, which under the influence of $IL-1\beta$ and $IL-18$ synthesize $IL-17$, $IL-21$ and $IL-23$, and in turn, these cytokines drive the $T_{H}17$ differentiation (62). Finally, $\gamma\delta$ T cells also secrete $IL-17$ when $IL-23$ and $IL-1\beta$ or $IL-18$ are acting upon them. The microenvironment of this reaction is then commanded by $IL-17$, inducing neutrophil recruitment, secretion of lipocalins and calgranulins, secretion of metalloproteinases, being regarded as a proinflammatory milieu (62-63). Given the importance of $IL-1\beta$ and $IL-18$ in the $T_{H}1/T_{H}17$ response, it's no wonder that mutations or hyperactivation stimuli are central in the development of autoimmunity, such as observed in models of EAE which demonstrate potential pharmaceutical target (64), type 1 Diabetes Mellitus (65), Cryopyrin-associated periodic syndromes (66), nephritic lupus (67), and even asthma (68). As for the $T_{H}2$ response, it has been shown that NLRP3

inflammasome is activated in dendritic cells and modulates the induction of $Th2$ lymphocytes in the lung, having a role in the control of the expression of $Th2$ cytokines, like $IL-5$, $IL-13$, $IL-33$ and thymic stromal lymphopoeitin, and even in the eosinophilic recruitment, events mediated by the $IL-1\beta$ axis (69). In fact, the adjuvant property of aluminum-based vaccines relies on inflammasome recognition and activation, which induces $IL-1\beta$, $IL-18$ and $IL-33$ in macrophages (70), concluding that inflammasomes are essential for humoral adaptive immune response (71).

Intestinal tolerogenic environment

The influence of gut microbiota in the maintenance of a tolerogenic microenvironment and physical integrity of the intestinal epithelial barrier has been subject of intense analysis, due to the ample implications of the concept, from proper absorption of food to the local symbiosis with the commensal bacteria. Even though, proinflammatory caspases have been associated with defense, they are also involved in tissue repair processes. In their experimental model,

Duapul-Chicoine et al. (72) used dextran sodium sulfate (DSS) to damage the colonic epithelium and evaluate the local response in knock-out mice for Casp1^{-/-} and Nlrp3^{-/-}. The deficient mice showed intestinal bleeding, shortening and fibrotic changes in the colon, weight loss and increased mortality compared to the wild type mice. They propose that the Caspase-1 axis is essential to control inflammation, intestinal injury and local microbiota. These results correlate with those reported by Zaki et al. (73) who applied a similar methodology, and observed that after treatment with DSS commensal bacteria dispersed systemically with concomitant massive colonic leukocyte infiltration. Among the NLPRs associated with colonic ecology, are the NLRP6 and NLRP12 inflammasomes, assembled by the recruitment of ASC and processing of pro-IL-1 β and pro-IL-18; these superstructures are relatively new in their description (74). Elinav et al. (75) described the role of NLRP6 inflammasome in the integrity of the epithelial barrier and its role in the maintenance of microbiota, finally modulating aspects of the tolerogenic microenvironment. In this publication, the authors proposed that the assembly of such inflammasome is driven by the detection of danger signals which alert of the loss of integrity of the colonic epithelial with the subsequent production of IL-18. In fact, Normand et al. (76) reported that NLRP6-coupled inflammasome is involved in the self-renewal of the intestinal epithelium, acting as a negative regulator in colonic myofibroblast. Models deficient of Nlrp6^{-/-} showed altered expression of Wnt/ β -catenin proteins, probably related to dysregulation of Casein kinase ϵ which stabilizes β -catenin, and upregulation of the SMARCC1 transcription factor (SWI/SNF family of proteins). Since the expression of NLRP6 gene is controlled by PPAR- γ , the use of agonists to target this transcription factor in inflammatory bowel diseases or even in colorectal cancer is a potential pharmacological therapy (77).

Metabolic sensing

As a final consideration within the immune response polarization and modulation, there is growing evidence that suggests that type 2 diabetes, gout and even atherosclerosis can be considered as part of the autoinflammatory spectrum of diseases, due to the recruitment and assembly of NLRP3 inflammasome in these clinical syndromes (79). Insulin resistance and adipose derived inflammation have been recently linked to activation of inflammasome via ceramide sensing in macrophages and adipocytes, inducing the production of IL-1 β and IL-18, with the

subsequent elevation of IFN- γ , a local T_H1 driven response with enrichment of CD44+CD62L- T cells, and M1 macrophage activation that results in enhanced lipolysis, insulin resistance and glucose intolerance (78). Moreover, Stienstra et al. (80) evaluated the effect the Nlrp3^{-/-}, ASC^{-/-} and Casp1^{-/-} knock-out models and overfeeding, reporting that this deficiency protects against obesity induced by high-fat diet, confirming its role in the pathogenesis of obesity. Other metabolic traits were reported, such as lower levels of monocyte chemoattractant protein and resisting accompanied with higher levels of leptin, conferring a gene expression controlling property to this superstructure. Macrophage has been the main signaled culprit in the common metabolic diseases (81), and the understanding of NLRP3 inflammasome has shed some light in the matter, especially after the fact that glyburide – an anti-hyperglycemic drug – is known to inhibit cryopyrin assemble via microbial, DAMP or crystal pathways, blunting IL-1 β secretion (82). On a final note concerning the adipocyte, the B cell has also taken part in the chronic inflammation milieu with the production of IgG2c pathogenic antibodies, derived from antigenic presentation within the adipose tissue necrotic sites (82), and it has supported the finding that in insulin resistant subjects several autoantibodies can be detected. This result conveys that in chronic overnutrition, there is an adaptive humoral response within the adipose tissue and it modulates the worsening of the insulin signaling (83).

In type 2 diabetes and β cell dysfunction, there is compelling data that suggests that NLRP3 inflammasome is fundamental in the deleterious effect observed in chronic hyperglycemia and oxidative stress. Hyperglycemia triggers an accelerated metabolism within the β cell mitochondria, which enhances the production of reactive oxygen species (ROS), which dissociate the heterodimer TXNIP from thioredoxin, allowing the former to induce the assembly of NLRP3 inflammasome and production of IL-1 β (34) (see Figure 4). This creates a proinflammatory T_H1 driven microenvironment that enhances β cell dysfunction and cell death via NF- κ B/MAPK induced CHOP pathway (84), but it is blunted in knock-out models for Nlrp3^{-/-} and ASC^{-/-} (85), Txnip^{-/-} and Nlrp3^{-/-} (86) or in experiments using IL-1 β receptor antagonist (87); in the 3 scenarios previously mentioned, insulin sensitivity was enhanced alongside β cell increased survival and maintenance of glucose tolerance even in presence of a high-fat feeding state.

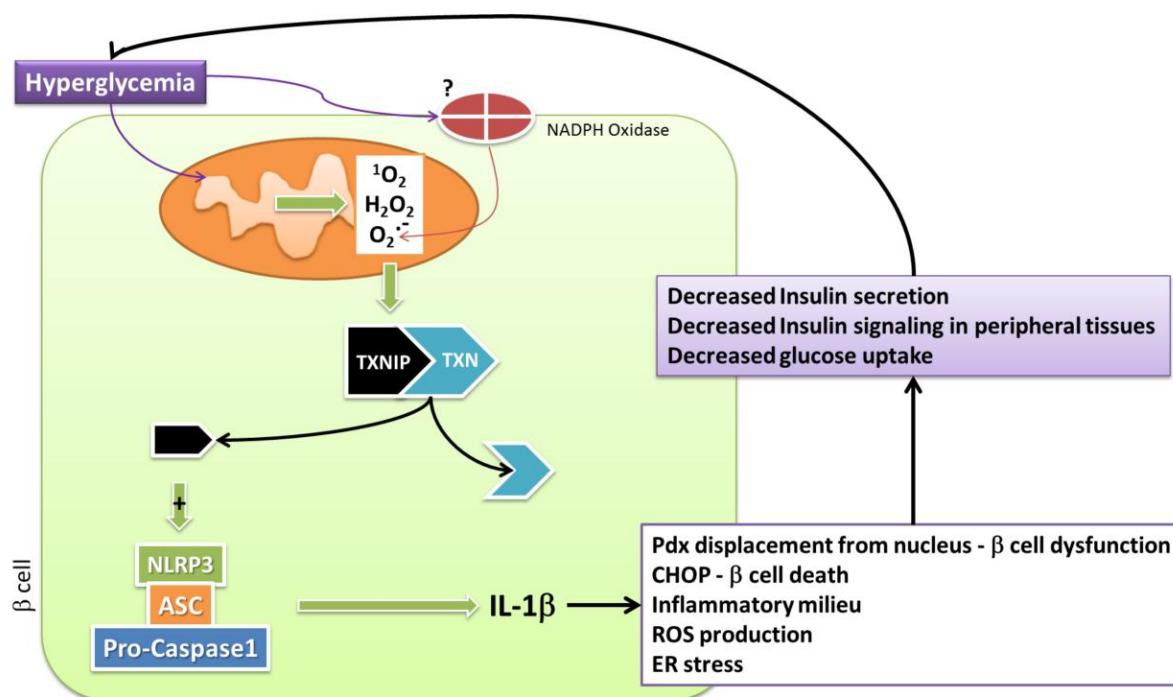


Figure 4. Role of Inflammasome activation during hyperglycemia and type 2 diabetes. The increase of ROS induces the separation of TXNIP from TXN, allowing the first to induce the NLRP3 inflammasome and increase the production of IL-1 β . This inflammatory caspase is related to β cell death, diminished insulin secretion and ultimately, the enhancement and perpetuation of hyperglycemia. Adapted from Schroder et al. (34).

It has been known for quite a long time that atherosclerosis is an inflammatory disease, and various reviews have dwelled on this subject (88-90). In several models, the role of cholesterol has been essential for the development of the atherosclerotic plaque and the surrounding inflammatory milieu which renders it susceptible to rupture. Duewell et al. (91) reported in 2010 that cholesterol crystals were able to activate the NLRP3 inflammasome in phagocytes, inducing an acute inflammation site within the vessel; and these results were able to be reproduced even in animal models low-density lipoprotein receptor (LDLR) deficient, suggesting that the formation of foam cells is not the only way that cholesterol contributes to atherosclerosis. In fact, Rajamäki et al. (92) reported that human macrophages were able to engulf cholesterol crystals, inducing a dose-dependent IL-1 β secretion. The crystals were able to activate the assembly of the NLRP3 machine via destabilization of the lysosome membrane and cathepsin B leakage to the cytoplasma. Moreover, cholesterol crystals are known to induce the oxidative stress-responsive transcription factor NF-E2-related 2 (Nrf2), and together prompt the synthesis of IL-1 β , proposing a common pathway for oxidative stress and metabolic

stress signals in the maintenance of vascular inflammation (93).

As for the case of the inflammatory disease gout, the monosodium urate crystals (MSU) are the main culprit concerning joint inflammation, pain and deformation. The macrophages phagocytize MSU and in exchange induce ROS production, ATP secretion and activation of the P2X7R, activating the NLRP3 inflammasome (94-95). Moreover, MSU can activate TLR2 and TLR4 and also inducing IL-1 β (96). Even though MSU are the main pathogenic signal, not all patients with hyperuricemia develop gout, and the pain crisis are often associated with heavy meals or alcohol consumption. In this regard, Joosten et al. (97) reported that there is a synergistic effect between stearic acid and MSU, partially explaining the relationship between metabolic events triggering a gout attack. Finally, MSU are not exclusive for gout, since they are also associated with the activation of fibroblastic-like synoviocytes in rheumatoid arthritis, inducing the secretion of IL-6, CXCL8, and MMP-1 (98), and this effect is subject to modulation of polymorphisms associated with cryopyrin and CARD8 (99).

As a final note, I have to highlight the fact that several other molecules can trigger inflammasome assembly and are known as inflammasome activation disorders and they include: pseudogout, silicosis, asbestos and Alzheimer's disease (100). This doesn't downplay the genetically defined inflammasome dysregulation disorders, which comprise the Familial Mediterranean fever, Cryopyrin-associated periodic syndromes, and Pyogenic arthritis, pyoderma gangrenosum and acne syndrome (100). The analysis of these syndromes has shed light on the mechanistics involved in the activation disorders, providing groundwork to develop new pharmaceutical targets to control such diseases.

Concluding remarks

The abrupt abundance of data concerning this branch of the innate immune system, the inflammasomes, has offered answers to long-ago asked questions while creating new ones. Needless to say, this modifies the common concept that the innate system lacked specificity and memory and challenges the complexity of it. It requires a very specialized

system that can survey, detect and initiate a destruction signal in the gut while canvassing over 10^{11} bacteria per gram of colonic content (101). This is no small task, and evolution has granted the permanence of several surveillance systems, and this includes the inflammasomes. These superstructures not only participate in the defense system against bacteria, fungi and viruses, but have also been involved in oncogenic control. Diane Mathis and Steven Schoelson recently published (102) that a merge in two classical fields have occurred while the vast knowledge concerning inflammasomes was being gathered, and that field is Immunometabolism. Diseases like type 2 diabetes, atherosclerosis and gout have been subject of extensive and multidisciplinary research, and this included immunology when the diagnostic criteria included low grade inflammation (103). From that moment on, the complex relationship between immune cells and endocrine systems has received growing attention, not only because it offers a more complete and integrated view of the pathogenesis of the diseases, but also because it offers another group of potential pharmacological targets.

References

- Janeway CA Jr, Medzhitov R, Innate Immune Recognition. Annu Rev Immunol 2002; 20:197-216. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Medzhitov R, Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol 2001; 1:135-45. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Macpherson AJ, Uhr T, Compartmentalization of the mucosal immune responses to commensal intestinal bacteria. Ann N Y Acad Sci 2004; 1029:36-43. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Hershberg RM, Polarized compartmentalization of antigen processing and Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2002; 283:G833-39. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Büschenfelde KH, Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). Clin Exp Immunol 1995; 102:448-55. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- McCarthy J, O'Mahony L, O'Callaghan L, Sheil B, Vaughan EE, Fitzsimons N, Fitzgibbon J, O'Sullivan GC, Kiely B, Collins JK, Shanahan F, Double blind placebo controlled trial of two probiotic
- strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. Gut 2003; 52: 975-80. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Di Giacinto C, Marinaro M, Sanchez M, Strober W, Biravant M, Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-β-bearing regulatory cells. J Immunol 2005; 174: 3237-46. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O, Pathogen recognition and innate immunity. Cell 2006; 124:783-801. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Martinon F, Burns K, Tschopp J, The Inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. Mol Cell 2002; 10:417-26. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Chen G, Pedra JHF, The inflammasomes in host defense. Sensors 2010;10: 97-111. [\[Google Scholar\]](#)
- Philpott DJ, Girardin SE, Nod-like receptors: sentinels at host membranes. Curr Opin Immunol 2010; 22:428-34. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Labbé K, Saleh M, Cell death in the host response to infection. Cell Death Differ 2008; 15:1339-49. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Ting JP-Y, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis B, Flavell RA, Girardin SE, Godzik A, Harton JA, Hoffman HM, Hugot JP, Inohara N, MacKenzie A, Maltais LJ, Nunez G, Ogura Y, Otten L, Reed JC, Reith W, Schreiber S, Steinle V, Ward PA, The NLR gene family: an official nomenclature. Immunity 2008; 28: 285-287. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Kersse K, Berghe V, Lamkanfi M, Vandenebeeck P, A Phylogenetic and functional overview of inflammatory caspases and caspase-1-related CARD-only proteins. Biochem Soc Trans 2007; 35: 1508-11. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Harton JA, Linhoff MW, Zhang J, Ying JP-Y, CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, Pyrin, Nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. J Immunol 2002; 169: 4088-93. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Tschopp J, Martinon F, Burns K, NALPS: a novel protein family involved in inflammation. Nat Rev Mol Cell Biol 2003; 4: 95-104. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Martinon F, Tschoop J, Inflammatory caspases and inflammasomes: master

- switches of inflammation. *Cell Death Differ* 2007; 14: 10-22. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
18. Scott AM, Saleh M, The inflammatory caspases: guardians against infections and sepsis. *Cell Death Differ* 2007; 14: 23-31. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 19. Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, Agostini L, Kuijk L, Martinon F, van Bruggen R, Tschopp J, Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *J Histochem Cytochem* 2007; 55: 443-52. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 20. Stutz A, Golenbock DT, Latz E, Inflammasomes: too big to miss. *J Clin Invest* 2009; 119: 3502-11. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 21. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschoop J, NALP3 forms an IL-1-beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 2004; 20: 319-25. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 22. Faustini B, Chen Y, Zhai D, Le Negrate G, Lartigue L, Satterthwait A, Reed JC, Mechanism of Bcl-2 and Bcl-X(L) inhibition of NLRP1 inflammasome: loop domain-dependent suppression of ATP binding and oligomerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 2835-40. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 23. Agrawal A, Pulendran B, Anthrax lethal toxin: a weapon of multisystem destruction. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2859-65. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 24. Newman ZL, Printz MP, Liu S, Crown D, Creen L, Miller-Randolph S, Flodman P, Leppla SH, Moayeri M, Susceptibility to anthrax lethal toxin-induced rat death is controlled by a single chromosome 10 locus that includes rNlrp1. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000906. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 25. Moayeri M, Crown D, Newman ZL, Okugawa S, Eckhaus M, Cataisson C, Liu S, Sastalla I, Leppla SH, Inflammasome sensor Nlrp1b-dependent resistance to Anthrax is mediated by caspase-1, IL-1 signaling and neutrophil recruitment. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1001222. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 26. Averette KM, Pratt MR, Yang Y, Bassilian S, Whitelegge JP, Loo JA, Muir TW, Bradley KA, Anthrax lethal toxin induced lysosomal membrane permeabilization and cytosolic cathepsin release is Nlrp1b/Nalp1b-dependent. *PLoS ONE* 2009; 4: e7913. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 27. Bauernfeind F, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Monks BG, Fitzgerald KA, Hornung V, Latz E, NF- κ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 2009; 183: 787-91. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 28. Tschoop J, Schroder K, NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signaling pathways on ROS production?. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 210-5. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 29. Craven RR, Gao X, Allen IC, Gris D, Bubeck Wardenburg J, McElvania-Tekippe E, Ting JP, Duncan JA, Staphylococcus aureus α -hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse monocytic cells. *PLoS ONE* 2009; 4: e7446. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 30. Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschoop J, Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1583-9. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 31. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschoop J, Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 2010; 11: 136-41. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 32. Nordberg J, Arnér ES, Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1287-312. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 33. Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H, Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* 1998; 17: 2596-606. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 34. Schroder K, Zhou R, Tschoop J, The NLRP3 inflammasomes: a sensor for metabolic danger?. *Science* 2010; 327: 296-300. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 35. van de Veerdonk FL, Smeekens SP, Joosten LA, Kullberg BJ, Dinarello CA, van der Meer JW, Netea MG, Reactive oxygen species-independent activation of the IL-1b inflammasome in cells from patients with chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 3030-3. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 36. van Bruggen R, Köker MY, Jansen M, van Houdt M, Roos D, Kuijpers TW, van den Berg TK, Human NLRP3 inflammasome activation is Nox1-4 independent. *Blood* 2010; 115: 5398-400. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 37. Meissner F, Seger RA, Moshous D, Fischer A, Reichenbach J, Zychlinsky A, Inflammasome activation in NADPH oxidase defective mononuclear phagocytes from patients with chronic granulomatous disease. *Blood* 2010; 116: 1570-3. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 38. Yu HB, Finlay BB, The caspase-1 inflammasome: a pilot of innate immune responses. *Cell Host Microbe* 2008; 4: 198-208. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 39. Pereira MSF, Marques GG, DelLama JE, Zamboni DS, The Nlrp4 inflammasome contributes to restriction of pulmonary infection by flagellated Legionella spp. that trigger pyroptosis. *Frontiers Microbiol* 2011; doi: 10.3389/fmicb.2011.00033. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 40. Akhter A, Gavrilin MA, Frantz L, Washington S, Ditty C, Limoli D, Day C, Sarkar A, Newland C, Butchar J, Marsh CB, Wewers MD, Tridandapani S, Kanneganti TD, Amer AO, Caspase-7 activation by the Nlrp4/Ipfaf inflammasome restricts Legionella pneumophila infection. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000361. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 41. Malireddi RK, Ippagunta S, Lamkanfi M, Kanneganti TD, Cutting edge: Proteolytic inactivation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 by the Nlrp3 and Nlrp4 inflammasome. *J Immunol* 2010; 185: 3127-30. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 42. Bürcstümmer T, Baumann C, Blüml S, Dixit E, Dürnberger G, Jahn H, Planyavsky M, Bilban M, Colinge J, Bennett KL, Superti-Furga G, An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmatic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol* 2009; 10: 266-72. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 43. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES, AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmatic DNA. *Nature* 2009; 458: 509-13. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 44. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, Latz E, Fitzgerald KA, AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms caspase-1 activating inflammasome with ASC. *Nature* 2009; 458: 514-8. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
 45. Rathinam VA, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, Vanaja SK, Monks BG, Ganesan S, Latz E, Hornung V, Vogel SN, Szomolányi-Tsuda E, Fitzgerald KA, The AIM2 inflammasome is essential for host-defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol* 2010; 11: 395-402. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

46. Kim S, Bauernfeind F, Ablasser A, Hartmann G, Fitzgerald KA, Latz E, Hornung V, Listeria monocytogenes is sensed by the NLRP3 and AIM2 inflammasome. *Eur J Immunol* 2010; 40: 1545-51. [PubMed] [Google Scholar]
47. Gavrilin M, Wewers MD, Francisella recognition by inflammasomes: differences between mice and men. *Front Microbiol* 2011; doi:10.3389/fmcb.2011.00011 [PubMed] [Google Scholar]
48. Benko S, Magalhaest JG, Philpott DJ, Girardin SE, NLRP5 limits the activation of inflammatory pathways. *J Immunol* 2010; 185: 1681-91. [PubMed] [Google Scholar]
49. Cui J, Zhu L, Xia X, Wang HY, Legras X, Hong J, Ji J, Shen P, Zheng S, Chen ZJ, Wang RF, NLRP5 negatively regulates the NF- κ B and type I interferon signaling pathways. *Cell* 2010; 141: 483-96. [PubMed] [Google Scholar]
50. Kuznetsov S, Till A, Winkler M, Hässler R, Lipinski S, Jung S, Grötsinger J, Fickenscher H, Schreiber S, Rosenthal P, The nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor NLRP5 is involved in IFN-dependent antiviral immune responses. *J Immunol* 2010; 184: 1990-2000. [PubMed] [Google Scholar]
51. Kumar H, Pandey S, Zou J, Kumagai Y, Takahashi K, Akira S, Kawai T, NLRP5 deficiency does not influence cytokine induction by virus and bacteria infections. *J Immunol* 2011; 186: 994-1000. [PubMed] [Google Scholar]
52. Davis BK, Roberts RA, Huang MT, Willingham SB, Conti BJ, Brickey WJ, Barker BR, Kwan M, Taxman DJ, Accavitti-Loper MA, Duncan JA, Ting JPY, Cutting edge: NLRP5-dependent activation of the inflammasome. *J Immunol* 2011; 186: 1333-7. [PubMed] [Google Scholar]
53. Mishra BB, Moura-Alves P, Sonawane A, Hacohen N, Griffiths G, Moita LF, Anes E, Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. *Cell Microbiol* 2010; 12: 1046-63. [PubMed] [Google Scholar]
54. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Juliana C, Solorzano L, Kang S, Wu J, Datta P, McCormick M, Huang L, McDermott E, Eisenlohr L, Landel CP, Alnemri ES, The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity against *Francisella tularensis*. *Nat Immunol* 2010; 11: 385-93. [PubMed] [Google Scholar]
55. Kim S, Bauernfeind F, Ablasser A, Hartmann G, Fitzgerald KA, Latz E, Hornung V, Listeria monocytogenes is sensed by the NLRP3 and AIM2 inflammasome. *Eur J Immunol* 2010; 40: 1545-51. [PubMed] [Google Scholar]
56. Dinarello CA, IL-18: a TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 11-24. [PubMed] [Google Scholar]
57. Tominaga K, Yoshimoto T, Torigoe K, Kurimoto M, Matsui K, Hada T, Okamura H, Nakanishi K, IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells. *Int Immunopharmacol* 2000; 12: 151-60. [PubMed] [Google Scholar]
58. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H, Interleukin-18 regulated both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 423-74. [Google Scholar]
59. Gris D, Ye Z, Iocca HA, Wen H, Craven RR, Gris P, Huang M, Schneider M, Miller SD, Ting JPY, NLRP3 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses. *J Immunol* 2010; 185: 974-81. [PubMed] [Google Scholar]
60. Meng G, Zhang F, Fuss I, Kitani A, Strober W, A mutation in the Nlrp3 gene causing inflammasome hyperactivation potentiates Th17 cell-dominant immune responses. *Immunity* 2009; 30: 860-74. [PubMed] [Google Scholar]
61. Jha S, Srivastava SY, Brickey WJ, Iocca H, Toews A, Morrison JP, Chen VS, Gris D, Matsushima GK, Ting JP, The inflammasome sensor, NLRP3, regulates CNS inflammation and demyelination via caspase-1 and interleukin-18. *J Neurosci* 2010; 30: 15811-20. [PubMed] [Google Scholar]
62. Dungan LS, Mills KH, Caspase-1 processed IL-1 family cytokines play a vital role in driving innate IL-17. *Cytokine* 2011; 56: 126-32. [PubMed] [Google Scholar]
63. Kolls JK, Khader SA, The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21: 443-8. [PubMed] [Google Scholar]
64. Lalor SJ, Dungan LS, Sutton CE, Basdeo SA, Fletcher JM, Mills KH, Caspase-1-processed cytokines IL-1beta and IL-18 promote IL-17 production by gamma delta and CD4 T cells that mediate autoimmunity. *J Immunol* 2011; 186: 5738-48. [PubMed] [Google Scholar]
65. Pontillo A, Brando L, Guimaraes R, Segat L, Araujo J, Crovella S, Two SNPs in NLRP3 gene are involved in the predisposition to type-1 diabetes and celiac disease in a pediatric population from Northeast Brazil. *Autoimmunity* 2010; 43: 583-9. [PubMed] [Google Scholar]
66. Lasiglé D, Traggiai E, Federici S, Alessio M, Buocompagni A, Accogli A, Chiesa S, Penco F, Martini A, Gattorno M, Role of IL-1 beta in the development of human T(H)17 cells: lesson from NLRP3 mutated patients. *PLoS ONE* 2011; 6: e20014. [PubMed] [Google Scholar]
67. Tsai PY, Ka SM, Chang JM, Chen HC, Shui HA, Li CY, Hua KF, Chang WL, Huang JJ, Yang SS, Chen A, Epigallocatechin-3-gallate prevents lupus nephritis development in mice via enhancing the Nrf2 antioxidant pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Free Radic Biol Med* 2011; 51: 744-54. [PubMed] [Google Scholar]
68. Ather JL, Ckless K, Martin R, Foley KL, Suratt BT, Boyson JE, Fitzgerald KA, Flavell RA, Eisenbarth SC, Poynter ME, Serum amyloid A activates the NLRP3 inflammasome and promotes Th17 allergic asthma in mice. *J Immunol* 2011; 187: 64-73. [PubMed] [Google Scholar]
69. Besnard AG, Guillou N, Tschopp J, Erard F, Couillin I, Iwakura Y, Quesniaux V, Ryffel B, Togbe D, NLRP3 inflammasome is required in murine asthma in the absence of aluminum adjuvant. *Allergy* 2011; 66: 1047-57. [PubMed] [Google Scholar]
70. Li H, Willingham SB, Ting JP, Re F, Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol* 2008; 181: 17-21. [PubMed] [Google Scholar]
71. Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA, Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminum adjuvants. *Nature* 2008; 453: 1122-6. [PubMed] [Google Scholar]
72. Dupaul-Chicoine J, Yeretssian G, Doiron K, Bergstrom KS, McIntire CR, LeBlanc PM, Meunier C, Turbide C, Gros P, Beauchemin N, Vallance BA, Saleh M, Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases. *Immunity* 2010; 32: 367-78. [PubMed] [Google Scholar]
73. Zaki H, Boyd KL, Kastan MB, Lamkanfi M, Kanneganti TD, The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity* 2010; 32: 379-91. [PubMed] [Google Scholar]
74. Grenier JM, Wang L, Manji GA, Huang WJ, Al-Garawi A, Kelly R, Carlson A, Merriam S, Lora JM, Briskin M, DiStefano PS, Bertin J, Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAFs as a novel regulator of NF- κ B and caspase-1. *FEBS Lett* 2002; 530: 73-8. [PubMed] [Google Scholar]

75. Elinav E, Strowig T, Kau AL, Henao-Mejia J, Thaiss CA, Booth CJ, Peaper DR, Bertin J, Eisenbarth SC, Gordon JI, Flavell RA, NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* 2011; 145: 745-57. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
76. Normand S, Delanoye-Crespin A, Bressenot A, Huot L, Grandjean T, Peyrin-Biroulet L, Lemoine Y, Hot D, Chamaillard M, Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 9601-6. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
77. Kempster SL, Belteki G, Forhead AJ, Fowden AL, Catalano RD, Lam BY, McFarlane I, Charnock-Jones DS, Smith GCS, Developmental control of the Nlrp6 inflammasome and a substrate, IL-18, in mammalian intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 300: G253-63. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
78. Masters SL, Simon A, Askentijevich I, Kastner DL, Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 621-68. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
79. Vandamagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, MYnatt RL, Ravussin E, Stephens JM, Dixit VD, The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nature Medicine* 2011; 17: 179-88. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
80. Stienstra R, van Diepen JA, van de Veerdonk FL, Perera D, Neale GA, Hooiveld GJ, Hijmans A, Vroegeijk I, van den Berg S, Romijn J, Rensen PC, Joosten LA, Netea MG, Kanneganti TD. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 15324-9. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
81. Chawla A, Nguyen KD, Goh YP, Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 738-49. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
82. Lamkanfi M, Mueller JL, Vitari AC, Misaghi S, Fedorova A, Deshayes K, Lee WP, Hoffman HM, Dixit VM, Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J Cell Biol* 2009; 187: 61-70. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
83. Winer DA, Winer S, Shen L, Wadia PP, Yantha J, B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nature Medicine* 2011; 17: 610-7. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
84. Shao C, Lawrence MC, Cobb MH, Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) expression by interleukin-1 beta in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 2010; 285: 19710-9. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
85. Youm YH, Adijiang A, Vandamagsar B, Burk D, Ravussin A, Dixit VD, Elimination of the NLRP3-ASC inflammasome protects against chronic obesity-induced pancreatic damage. *Endocrinology* 2011; 152: 4039-45. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
86. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschoopp J, Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 2010; 11: 136-40. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
87. Ardestani A, Sauter NS, Paroni F, Dharmashikari G, Cho JH, Lupi R, Marchetti P, Oberholzer J, Conte JK, Maedler K, Neutralizing interleukin-1beta (IL-1beta) induces beta-cell survival by maintaining PDX1 protein nuclear localization. *J Biol Chem* 2011; 286: 17144-55. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
88. Libby P, Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868-74. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
89. Packard RRS, Libby P, Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 2008; 54: 24-38. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
90. Bays HE, "Sick fat", metabolic disease, and atherosclerosis. *Am J Med* 2009; 122: S26-37. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
91. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladiner G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nuñez G, Schnurr M, Espievik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E, NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals that form early in disease. *Nature* 2010; 464: 1357-61. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
92. Rajamäki K, Lappalainen J, Öörni K, Välimäki E, Matikainen S, Kovanen PT, Eklund KK, Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS ONE* 2010; 5: e11765. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
93. Freigang S, Ampenberger F, Spohn G, Heer S, Shamshiev AT, Kisielow J, Herberger M, Yamamoto M, Bachmann MK, Kopf M, Nrf2 is essential for cholesterol crystal-induced inflammasome activation and exacerbation of atherosclerosis. *Eur J Immunol* 2011; 41: 2040-51. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
94. Busso N, So A, Mechanisms of inflammation in gout. *Arthritis Res Ther* 2010; 12: 206-13. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
95. Kingsbury SR, Conaghan PG, McDermott MF, The role of the NLRP3 inflammasome in gout. *J Inflamm Res* 2011; 4: 39-49. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
96. Liu-Bryan R, Scott P, Sydlaske A, Rose DM, Terkeltaub R, Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2936-46. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
97. Joosten LAB, Netea MG, Mylona E, Koenders MI, Subbarao Malireddi RK, Oosting M, Stienstra R, van de Veerdonk FL, Stalenhowf AF, Giamarellos-Bourboulis EJ, Kanneganti TD, van de Meer JWM, Fatty acids engagement with TLR3 drive IL-1 β production via ASC/caspase-1 pathway by urate crystals in gouty arthritis. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 3237-48. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
98. Chen DP, Wong CK, Tam LS, Li EK, Lam CW, Activation of human fibroblast-like synoviocytes by uric acid crystals in rheumatoid arthritis. *Cell Mol Immunol* 2011; 8: 469-78. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
99. Kastbom A, Verma D, Eriksson P, Skoglund T, Wingren G, Söderkvist P, Genetic variation in proteins of the cryopyrin inflammasome influences susceptibility and severity of rheumatoid arthritis (The Swedish TIRA project). *Rheumatol* 2008; 47: 415-7. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
100. Mitroulis I, Skendros P, Ritis K, Targeting IL-1b in disease: the expanding role of NLRP3 inflammasome. *Eur J Internal Med* 2010; 21: 157-63. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
101. O'Hara AM, Shanahan F, The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 2006; 7: 688-93. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
102. Mathis D, Shoelson SE, Immunometabolism: an emerging frontier. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 81-3. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
103. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB, Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* 1999; 282: 2131-5. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

Anisakidosis, inflamación e hipersensibilidad (*Anisakidosis, inflammation and hypersensitivity*)

Guillermo Terán-Angel¹✉, Joselyn Rojas¹

¹ Instituto de Inmunología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, Mérida - Venezuela.

[ARTICULO DE REVISION]

Recibido: 31 de Octubre de 2011. Aceptado: 16 de Enero de 2012.

Resumen

La Anisakidosis es una enfermedad producida por parásitos de la familia Anisakidae. La infección parasitaria se adquiere por la ingesta de pescado crudo o insuficientemente cocinado. Se asocia principalmente al consumo de sushi, sashimi y cebiche; y dada la popularidad a nivel mundial de estas preparaciones, la Anisakidosis representa un importante problema de salud pública. El objetivo de esta revisión es definir algunos aspectos parasitológicos, inmunológicos y clínicos relacionados con la infección por parásitos de los géneros *Anisakis simplex* y *Pseudoterranova decipiens* agentes causales de la Anisakidosis. A manera de sinopsis puede resaltarse que los síntomas producto de la infección son el resultado de una reacción inflamatoria generada luego de que el parásito se adhiere o penetra en la mucosa del tubo digestivo. El ser humano puede estar expuesto a los antígenos a través de varias fuentes: como productos de excreción/secreción de las larvas vivas o como antígenos somáticos y de la cutícula de los nematodos muertos o desintegrados presentes en los alimentos. La Anisakidosis puede manifestarse con dos cuadros clínicos característicos: digestivos o alérgicos. La penetración en la mucosa produce una marcada respuesta inflamatoria eosinofílica. Las características clínicas suelen ser similares a las de la apendicitis aguda, úlcera gástrica, obstrucción intestinal, e incluso la enfermedad de Crohn. Por otra parte, los antígenos pueden desencadenar respuestas inflamatorias inmediatas. La reacción alérgica es acompañada por un incremento en suero de la IgE total y específica, además de una respuesta predominantemente T_H2..

Palabras clave

Anisakidosis, Anisakis simplex, Pseudoterranova decipiens, hipersensibilidad, alergia, gastrointestinal.

Abstract

Anisakidosis is a disease produced by Anisakidae parasite family. The parasitical infection is acquired by the ingestion of raw or deficiently cooked fish. It's primarily associated with the consumption of sushi, sashimi and cebiche; and given the rising popularity of these dishes worldwide, Anisakidosis represents a growing public health problem. In this review we discuss some parasitological, immunological and clinical aspects related to infection by parasites of the genus *Anisakis simplex* y *Pseudoterranova decipiens*, causative agents of Anisakidosis. Synoptically may be highlighted that, symptoms associated with the infection are the result of the local inflammatory reaction when the parasite attaches itself to the intestinal wall. Humans can be exposed to the antigens through several sources: as products of excretion / secretion of live larvae or somatic and cuticle antigens from the dead nematodes or disintegrated in food. Anisakidosis can be presented in two characteristic clinical syndromes: intestinal and allergic. Mucosal penetration induces an eosinophilic inflammation. These clinical manifestations can be mistaken with acute appendicitis, peptic ulcer, intestinal obstruction, and even Crohn's disease. On the other hand, the antigens can induce an immediate inflammatory reaction, which is associated with specific and total IgE elevation, and a dominant T_H2 response.

Keywords

Anisakiosis, Anisakis simplex, Pseudoterranova decipiens, hypersensitivity, allergy, gastrointestinal.

Introducción

La Anisakidosis es una enfermedad caracterizada por la infección por nemátodos marinos de la familia de los anisákitos (Phylum: Nematoda, Clase: Chromadorea, Orden: Ascaridida, Familia: Anisakidae), la cual tiene la peculiaridad de ser considerada como una enfermedad accidental, ya que el hombre se infecta con una forma larvaria del nematodo la cual no llega a madurez sexual. Si bien el principal nematódo infectante es el *Anisakis simplex*, la *Pseudoterranova decipiens* también se ha vuelto un problema de salud pública, sobre todo en países como Chile, donde el consumo de cebiche es elevado (1); ver figura 1. Existen otras parasitosis provenientes de pescados, sin embargo, a diferencia de la distribución cosmopolita de *A. simplex* y *P. decipiens*, éstas son más características de ciertas regiones del planeta, como por ejemplo, *Opistorchis viverrini* (Indonesia), *Paragonimus sp* (Asia del Este), *Fasciolopsis buski* (China, Indochina e India), entre otros (2). A nivel mundial, se han reportado cerca de 20.000 casos de infecciones por *A. simplex* y *P. decipiens*, casi en su totalidad han ocurrido en las costas de Japón (3). Los países costeros de Europa también han reportado casos de anisakidosis, aunque es bien sabido que existe una gran tasa de subdiagnóstico y subregistro

debido a falta de sospecha clínica y deficiencias a la hora del diagnóstico parasitológico.

En Venezuela, Bandes y col. (4) realizaron un estudio de campo evaluando las especies infectantes de anisákitos en los pescados de mayor consumo en las costas del país, reportando una incidencia de *Pseudoterranova sp* de 56% y *Anisakis sp* de 16% en 33 muestras de lisa (*Mujil curema* o *Mujil incilis*), y de *Pseudoterranova sp* de 46% y de *Anisakis sp* de 16% en 33 muestras de lebranche (*Mujil liza*). En el año 2008, Puccio y col. (5) evaluaron la presencia de anisákitos en una muestra de 6 lisas provenientes del Estado Nueva Esparta. El 52% de los parásitos pertenecían al género *Anisakis sp*, el 32% a *Pseudoterranova sp* y el 16% a *Contracaecum sp*. Por otra parte, Maniscalchi y col. condujeron un ensayo en el oriente del país, analizando muestras de pescado provenientes de 3 estados costeros, reportando *Contracaecum sp* (83,60%), *Pseudoterranova sp* (9,84%), y *Anisakis sp* (6,56%) en lebranche, mientras que encontraron *Anisakis sp* (47,78%), *Pseudoterranova sp* (40,00%), y *Contracaecum sp* (12,22%) en lisa (6).

En vista de la alta prevalencia de éstos nemátodos en pescados comunes de las costas de Venezuela, y la creciente incursión de la gastronomía venezolana hacia la comida a base de pescados crudos como sushi, sashimi y cebiche, es fundamental

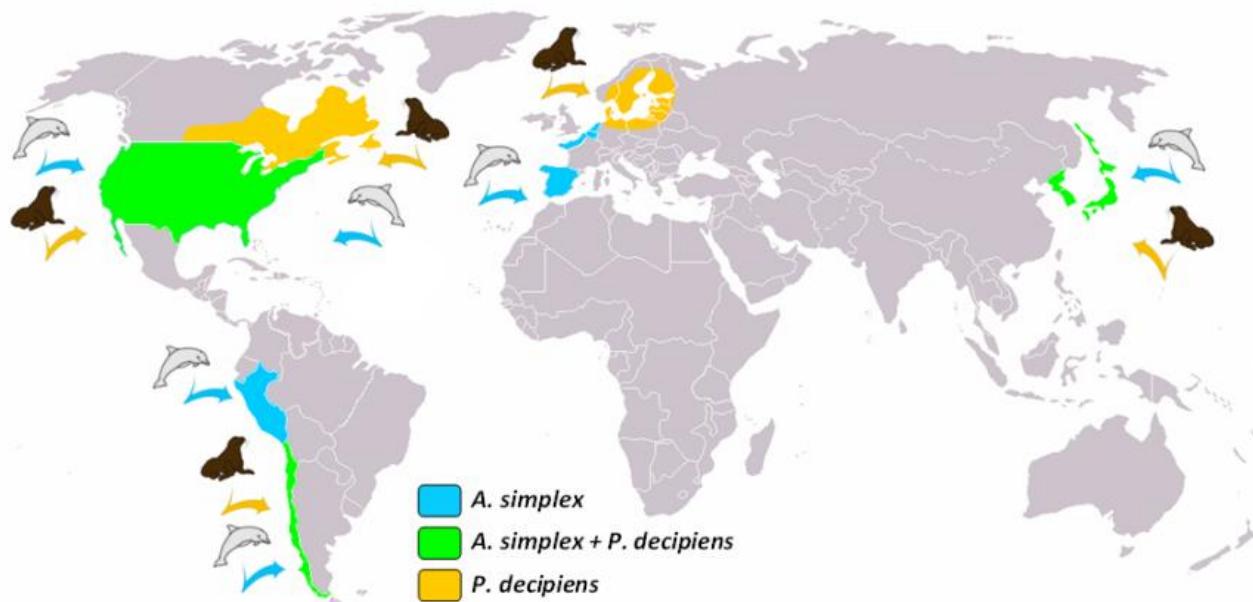


Figura 1. Distribución de *Anisakis simplex* y *Pseudoterranova decipiens* a nivel mundial. Las regiones coloreadas en el mapa representan los lugares con mayor incidencia de casos de Anisakidosis reportados, con alta prevalencia de nemátodos en pescados de consumo masivo, y que presentan problemas de salud pública por esta infección. No obstante se han reportado la presencia de estos parásitos en prácticamente todas las regiones costeras del mundo. Se muestran también los principales reservorios u hospederos definitivos de cada uno de estos nemátodos.

ahondar en el conocimiento parasitológico de dichos vermes, y establecer un marco de sospecha diagnóstica (7), ya que como se describirá en esta revisión, el cuadro clínico asociado a los mismos es amplio, abarcando desde lesiones sanguíneas de sistema gastrointestinal hasta cuadros de anafilaxia.

Anisakis simplex

A. simplex es un parásito helminto perteneciente a la familia Anisakidae, causante de la Anisakiasis. El ciclo biológico de dicho parásito incluye una forma adulta y cuatro estadios larvarios. El primer estadio (L1) consiste en larvas contenidas en huevos procedentes de las heces de los hospederos definitivos (mamíferos marinos y grandes peces) en los cuales, el parásito se desarrolla hasta la forma adulta. Dentro de los huevos las larvas se desarrollan progresivamente hasta el tercer estadio larvario (L3). Seguidamente, los huevos libres en el mar, eclosionan liberando las larvas L3 que son ingeridas por pequeños crustáceos del plancton (primer hospedador intermediario). Estos crustáceos parasitados son engullidos por peces pequeños ocefalópodos (segundo hospedador intermediario), los cuales a su vez son depredados por mamíferos marinos y peces de gran tamaño (hospedadores definitivos). En estos hospederos finales, las larvas completan su ciclo, transformándose al cuarto estadio (L4) y posteriormente al estadio adulto, pudiendo reproducirse y liberar huevos contentivos de larvas L1, completándose así el ciclo (8, 9). El hombre es un hospedero accidental al ingerir peces crudos que contienen la larva en estadio 3, pero que no alcanza la madurez sexual. Generalmente, es una larva única, que una vez ingerida ingresa al organismo y puede localizarse en el esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleo o colon (10).

Pseudoterranova decipiens

Las especies pertenecientes a este grupo, agentes etiológicos de la Pseudoterranovosis poseen un ciclo vital semejante al de *Anisakis* sp, salvo que las larvas en sus diferentes estadios son incapaces de nadar, por lo que deben estar dentro del hospedero para su transmisión efectiva (11, 12). Las formas adultas se alojan en la pared anterior del estómago de cetáceos (focas como *Otaria byronia*, *Phoca vitulina*, y *Arctocephalus philippi*, y delfines como *Cephalorhynchus eutropis*), reproduciéndose y liberando los huevos que pasan a las heces, las cuales son ingeridas por los hospedadores intermedios. Al

igual que para *Anisakis* sp, el humano puede infectarse accidentalmente al ingerir pescado infectado con la larva L3. Sin embargo, hay casos reportados de infección en estadio larvario 4 en el sur de Chile (13).

Un aspecto importante en la supervivencia de los huevos de *Pseudoterranova* es la profundidad y la temperatura del agua. A mayor distancia (mar adentro), las heces de las focas se fragmentan rápidamente antes de llegar al fondo, lo que permite la liberación de los huevos que descienden muy lentamente (tardan 28 horas para hundirse 10 metros)(14); esto le permite a las corrientes marinas desplazarlos desde su origen, pudiendo alejarlos de la costa y minimizando su eficiencia eclosiva al exponerlo a muy bajas temperaturas (cercanas a 0 °C). Ahora bien, cuando las focas están cerca de la costa y de los hospederos secundarios, las heces contaminadas de huevos llegan más rápido y sin fragmentarse al lecho marino, por lo que la oportunidad de inóculo para la infección de peces y crustáceos es mayor y más eficiente (15).

Comunidad antigénica

De forma clásica se ha descrito que las formas larvarias de los anisákitos no llegan ni al estadio L4 ni a la adultez dentro del humano, y mueren en el transcurso de las 3 semanas post-infección (16); no obstante, como se discutirá posteriormente, estadios larvarios L4 se han reportado parasitando al humano. Si la infección mantiene la historia natural de la enfermedad clásica, el hospedero se enfrentaría a dos clases de estímulos antigenicos/alérgicos: los antígenos excretados/secretados (ES) que se producen mientras la larva está viva, y los antígenos de la cutícula liberados cuando el verme muere (17).

Los antígenos de *A. simplex* (18) se describen en la tabla 1; hasta la fecha, no se han descrito antígenos específicos de *Pseudoterranova* sp. Dentro de los antígenos de *A. simplex*, Ani s7 se ha caracterizado como uno de los antígenos ES más importantes debido a la presencia de un dominio alergénico [CX₁₇₋₂₅CX₉₋₂₂CX₈CX₆]; Ani s7 se considera como un marcador confiable de la infección por éste verme en estado viable (17). Otro antígeno importante es Ani s1, el cual presenta dos sitios de unión a IgE, indispensables para las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas necesarias para el establecimiento de una reacción antígeno-anticuerpo efectiva (19).

Un aspecto interesante en cuanto a la variabilidad antigenica de *A. simplex*, es la presencia de antígenos que presentan regiones de homología

Tabla 1. Antígenos descritos de *Anisakis simplex*.

Antígeno	Nombre	Peso molecular (kDa)	Observaciones
Ani s 1	-	24	Localizado en glándula excretoria. Positividad en Anisakiasis intestinal de 86% (20).
Ani s 2	Paramiosina	97	
Ani s 3	Tropomiosina	41	
Ani s 4	Inhibidor de cisteínpoteasas	9	Localizado en la cutícula y glándula excretoria (21).
Ani s 5	Proteína SXP/RAL-2	15	-
Ani s 6	Inhibidor de serínpoteasas	-	-
Ani s 7	-	139	-
Ani s 8	Proteína SXP/RAL-2	15	-
Ani s 9	Proteína SXP/RAL-2	14	Positivo en 13,8% de los pacientes alérgicos a <i>A. simplex</i> (22).
Ani s 10	-	21	Positivo en 39% de los pacientes alérgicos a <i>A. simplex</i> (23).
Ani s 11	-	27	-
Ani s 12	-	31	-

compartidas con alergenos provenientes de otros parásitos, esto es de crucial importancia durante el proceso diagnóstico debido a la posibilidad de obtener reacciones cruzadas en las pruebas de inmunoensayo. Se ha descrito que los antígenos de *A. simplex* pueden tener reacciones cruzadas, en pruebas de IgE específica, con antígenos de ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus* y *D. farinae*), *Toxocara canis* y *Ascaris lumbricoides* (5). Estudios recientes sugieren el uso de antígenos recombinantes que incluyan a los alergenos Ani s1 y Ani s7 en las pruebas diagnósticas para la Anisakiasis; de hecho, el marcador Ani s1 IgE específico está asociado principalmente con síntomas gastrointestinales, no obstante, no es un buen marcador en las manifestaciones alérgicas como la urticaria, en las cuales Ani s7 es el más indicado (24).

Manifestaciones clínicas

De forma clásica se han descrito 4 síndromes clínicos asociados a las Anisakidosis: gástrico, intestinal, ectópico (extra-gastrointestinal) y alérgico.

Síndromes Gastro-Intestinales

Como toda infección parasitaria, los síntomas van a localizarse a lo largo del tracto y van a depender del inóculo y de las condiciones de base del paciente (gastritis erosivas, ulceras gástricas, uso de antiinflamatorios no esteroideos, entre otras). Los

síntomas producto de la infección por *A. simplex* son el resultado de una reacción inflamatoria generada luego de que la larva se adhiere o penetra en la mucosa del tubo digestivo. Las manifestaciones clínicas dependen de la zona del tubo digestivo donde se localice la larva y del tipo de reacción a la que de lugar. La localización más frecuente es el estómago o el intestino. La anisakiasis gástrica se caracteriza por dolor abdominal localizado en epigastrio, de tipo cólico, que puede acompañarse de náuseas, vómitos o incluso alteraciones del ritmo intestinal si afecta al intestino delgado (25), y en ocasiones sangrado intestinal (26). La penetración de *A. simplex* en la pared del estómago y el intestino produce una marcada respuesta inflamatoria eosinofílica. Las características clínicas suelen ser similares a las de apendicitis aguda, úlcera gástrica, obstrucción intestinal, enfermedad de Crohn (27), e incluso como un tumor submucoso (28); por esta razón, *A. simplex* rara vez es considerado como una causa del trastorno digestivo. La confirmación endoscópica y la identificación del gusano son necesarias para el diagnóstico definitivo (7, 29). La tomografía axial computarizada de abdomen también ha demostrado ser efectiva en el diagnóstico, especialmente al evaluarse el engrosamiento de los pliegues gástricos, especialmente de mucosa y submucosa, en pacientes con sospecha de anisakiasis (30). Cuando el proceso presenta un curso crónico, la formación de abscesos o granulomas pueden simular cuadros de pseudo-obstrucción intestinal, apendicitis

aguda o episodios de enfermedad inflamatoria intestinal. Las lesiones granulomatosas observadas para las formas crónicas gastrointestinales de anisakisisis son típicas reacciones de hipersensibilidad de tipo IV, mediada por células (31). En ellas, el infiltrado inflamatorio esta compuesto de eosinófilos y linfocitos, con niveles importantes (mRNA) de IL-4, IL-5 y eotaxina, también de mediadores eosinofílicos como la proteína básica mayor, la proteína X y la proteína catiónica, además de iNOS (32).

Por su parte, la clínica de la Pseudoterranovosis es respiratoria (tos principalmente) y gástrica (abdomen agudo). Mercado y col. (33) describen 7 casos de infección por *P. decipiens*, reportando que el síntoma principal fue el de tos, dolor faríngeo, prurito anal y nasal, y expectoración, inclusive llegando a la expulsión de vermes (migración errática del nematodo). Lo más peculiar de éste reporte fue que las larvas al ser evaluadas parasitológicamente fueron clasificadas en estadio L4, lo cual concuerda con formas adultas. Si bien, se considera que las formas infectantes son las L3, éste y otros reportes (34, 35) confirman la presencia de la forma larvaria L4, lo cual representa un reto epidemiológico: ¿son las formas L4 infectantes? o ¿las formas L3 son capaces de madurar dentro del hospedero accidental, en este caso el hombre? Para responder a éstas preguntas se requiere una evaluación más exhaustiva del ciclo vital de éstos anisákitos. Los síntomas gástricos de la infección aparecen en un período de 12 a 72 horas posterior a la ingesta de pescado crudo, cuya presencia debe ser confirmada endoscópicamente (32-34).

Síndromes Extra-Gastrointestinales

A. simplex es capaz de penetrar la pared intestinal y entrar a cavidad abdominal por lo se aloja en cualquiera de los órganos que la ocupan, como hígado, páncreas, ovario, e inclusive cavidad pleural (2, 36). Así como en intestino, la infección crónica puede complicarse con granulomas los cuales algunas veces se confunden con neoplasias.

Para *P. decipiens* el panorama se torna controversial, ya que los casos reportados sugieren que los estadios formadores de granulomas son los L3, mientras que las manifestaciones que cursan con expulsión del verme se asocian a estadio L4. En el 2001, se reportó un caso en California donde una larva L3 de *P. decipiens* penetró la pared transesofágica para salir por el cuello del paciente a través de una lesión ulcerosa (37). Además, se ha observado que L4 tiende a alojarse en mucosa oral, laringea o incluso esofágica,

y a partir de estas localizaciones anatómicas puede ser expulsado mediante mecanismo tusígeno (1, 38).

Alergias

La alergia frente a anisákitos se ha convertido en un problema de salud pública en muchos países asiáticos y europeos. Por este motivo en algunos países europeos, las pruebas alérgicas para el diagnóstico de la reactividad frente a *A. simplex*, se usan de manera rutinaria en las consultas especializadas y existen una serie de medidas preventivas y regulaciones para minimizar o evitar la contaminación de los pescados de consumo humano (5, 36). Los antígenos de *A. simplex* pueden producir reacciones alérgicas de tipo inmediato, dando lugar a manifestaciones sistémicas que van desde la urticaria o angioedema hasta el shock anafiláctico (8). En la figura 2 se esquematiza la inmunopatogénesis en el tracto digestivo producto de la infección por *Anisakis simplex*. El ser humano está expuesto a los antígenos de *A. simplex* a través de varias fuentes: como productos de excreción/secreción de las larvas vivas o como antígenos somáticos y de la cutícula de los nematodos muertos o desintegrados presentes en los alimentos (31). Las células epiteliales secretan moléculas citotóxicas como el óxido nítrico (NO) (8), quimioquinas y citoquinas (10) que atraen a los leucocitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos tisulares (MΦ), células dendríticas naïve, basófilos (Bas), y eosinófilos (Eos) (2); la respuesta innata también puede implicar a los receptores tipo Toll TLR (39) de las células epiteliales y de las células dendríticas activadas (ADC). En la respuesta adaptativa, la presentación de antígenos por células dendríticas maduras (MDC) estimula una respuesta doble, tanto T_H1 (5) como T_H2 (36), además de reclutamiento de células reguladoras tipo Treg y T_H3. Las citoquinas T_H1 (IFN-γ, TNF, IL-2 e IL-3) inducen la producción de inmunoglobulinas del tipo IgG2a (opsonizantes y fijadoras de complemento), activación de los macrófagos, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, y reacciones de hipersensibilidad retardada. Las citoquinas T_H2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 y IL-13) promueven la producción de IgG1 e IgA, IgE polyclonal y antígeno específica; e inducen el reclutamiento de mastocitos y eosinófilos quienes finalmente contribuyen a la eliminación del nemátodo (4, 31). Por otra parte, los antígenos de *A. simplex* en algunas ocasiones desencadenan respuestas inflamatorias inmediatas, es decir reacciones de hipersensibilidad de tipo I. La reacción alérgica al *A. simplex* es acompañada por un incremento en suero de la IgE total y específica, además de una respuesta

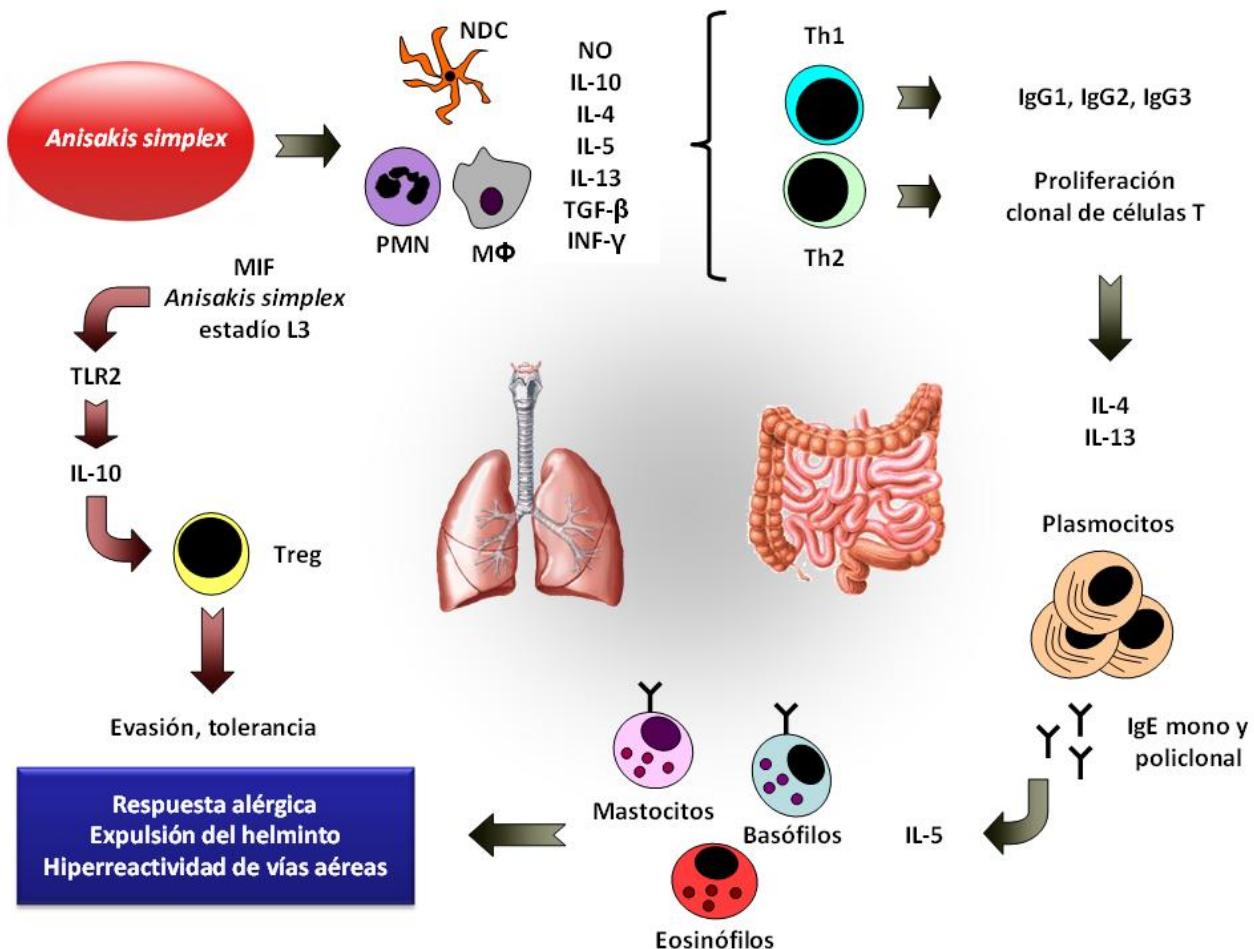


Figura 2. Representación esquemática de la inmunopatogenicidad de *Anisakis simplex* en el tracto digestivo humano (Descripción en el texto).

predominantemente $T_{H}2$, con elevada producción de IL-4 e IL-5 (40). Se ha reportado también que *A. simplex* puede inducir un ambiente tolerogénico por la producción de una proteína semejante al factor inhibitorio macrofágico (generada por las larvas en el estadio L3), la cual disminuye los síntomas intestinales y bronquiales en modelos experimentales, favoreciendo la persistencia del parásito en el organismo. El factor inhibitorio macrofágico (MIF) favorece el reclutamiento de poblaciones CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) inducidas por la sobreproducción de IL-10 y TGF-β, a través de un mecanismo dependiente de TLR2 (41, 42).

Anisakis simplex es un factor etiológico de anafilaxia en adultos que supone una prevalencia similar o incluso mayor que otros alimentos considerados tradicionalmente alergénicos como frutas/frutos secos, mariscos y pescados; además, los pacientes alérgicos a *A. simplex* muestran

características inesperadas para las alergias alimentarias convencionales, como la falta de antecedentes de atopía en su historial y su media de edad elevada (entre 40-60 años) (43). En un estudio en donde se analizaron 67 casos de alergias atribuibles a *A. simplex* se observó un espectro de manifestaciones clínicas: síntomas gastrointestinales o anisakiasis gastroalérgica (40%), shock anafiláctico (12%), urticaria y angioedema (100%) (44). Otras investigaciones han tratado de vincular estas manifestaciones clínicas variables con la frecuencia de ingesta de pescado crudo, lo que plantea diferentes patrones de sensibilización a los principales alérgenos de *A. simplex* (45). Si bien, la patología desencadenada por la infección con *A. simplex* puede considerarse clásica según el tipo de reacción de hipersensibilidad que se genere, existen aún controversias sobre la necesidad o no de parasitación previa para desencadenar los cuadros alérgicos. Se ha planteado que la parasitación

repetida, asintomática, sensibiliza frente al antígeno proteico, modulando una respuesta mediada por IgE y, con ello, el cuadro cutáneo o anafiláctico (46). Se ha propuesto además, que la sensibilización previa por *A. simplex* es capaz de exacerbar por vía directa o por reacción cruzada, la respuesta frente a otros alérgenos alimentarios o respiratorios (5), por lo que las medidas de control para evitar el consumo de pescados crudos o en su defecto para una adecuada manipulación (congelación o cocción) deben ser siempre consideradas.

Sinopsis

La Anisakidosis producida por la ingesta de nematodos de la familia Anisakidae, principalmente *Anisakis simplex* y *Pseudoterranova decipiens*, constituye hoy en día un problema de salud pública que ha disparado las alertas sanitarias ante el auge de la afición al consumo de pescado crudo, el cual representa la principal fuente de infección con estos parásitos. La Anisakidosis cursa con un espectro clínico que incluye patologías gastrointestinales, extra gastrointestinales y cuadros alérgicos, que en muchas ocasiones son clasificados o diagnosticados incorrectamente debido a las semejanzas en las manifestaciones clínicas de otras patologías como, apendicitis aguda, úlceras gástricas, obstrucción intestinal, enfermedad de Crohn, otras parasitosis intestinales, alergias alimentarias y pseudoalergias, principalmente. Estas manifestaciones clínicas aunadas a la presencia de reacciones cruzadas en las pruebas

diagnósticas específicas frente a otros parásitos o alergenos causantes de cuadros alérgicos y gastrointestinales similares, tales como ácaros y vermes de la familia Ascarididae, respectivamente, ponen de manifiesto la necesidad de un acucioso diagnóstico clínico, epidemiológico y serológico, con un proceso de anamnesis profundo y detallado en donde se sospeche la infección por anisákidos y con la indicación de pruebas serológicas de última línea, con la inclusión de antígenos de probada validez diagnóstica, tales como los antígenos recombinantes Ani s1 y Ani s7.

Otro aspecto fundamental en la contención de esta parasitosis es el cuidado profiláctico durante la elaboración de comidas a base de pescado. Se debe tener cuidado con la ingesta de pescados crudos, ahumados al frío, salados, en vinagre, marinados o insuficientemente cocidos, a la plancha o cocinados con hornos de microondas. Afortunadamente (para los aficionados al pescado crudo), no solo la cocción inactiva a estos parásitos, la larva puede inactivarse también con congelación a -20 °C, durante 48 a 72 horas, o por congelación rápida a -35 °C por 15 horas (38), aspectos que deben ser considerados en la culinaria cotidiana.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. Luisa Barboza Carrillo por su valiosa colaboración en la lectura crítica y constructiva del manuscrito.

Referencias

1. Torres P, Jercic MI, Weitz JC, Dobrew EK, Mercado RA, Human pseudoterranovosis, an emerging infection in Chile. J Parasitol 2007; 93: 440-3. [PubMed] [Google Scholar]
2. Nawa Y, Hatz C, Blum J, Sushi delights and parasites: the risk of fishborne and foodborne parasitic zoonoses in Asia. Clin Infect Dis 2005; 41: 1297-303. [PubMed] [Google Scholar]
3. Chai JY, Darwin-Murrell K, Lymbery AJ, Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues. Int J Parasitol 2005; 35: 1233-54. [PubMed] [Google Scholar]
4. Bandes A, Selgrad S, Ríos M, Salas H, Nemátodos de la familia Anisakidae en el pescado fresco que se expende para el consumo humano en Caracas. Rev Inst Nac Hig 2005; 36: 21-9. [Google Scholar]
5. Puccio F, Cifarelli D, Blanco F, López E, Sarmiento L, Ordaz R, Figueroa I, Capriles A, Hagel I, Prisco MC, Roque ME, Machado L, Ghezzi ME, Reactividad alérgica a *Anisakis simplex* y su asociación con asma bronquial en niños escolares del estado Nueva Esparta, Venezuela. Bol Mal Salud Amb 2008; 48: 145-52. [Google Scholar]
6. Maniscalchi MT, Lemus-Espinoza D, Marcano Y, Nounou E, Zácaras M, Nematodos Anisakidae presentes en pescados frescos de consumo humano en la región costera nororiental e insular de Venezuela. Biomédica 2011; 31: 338. [Google Scholar]
7. Zullo A, Hassan C, Scaccianoce G, Lorenzetti R, Campo SM, Morini S, Gastric anisakiasis: do not forget the clinical history! J Gastrointest Liver Dis 2010; 19: 359. [PubMed] [Google Scholar]
8. Gómez B, Lasa E, Arroabarren E, Garrido S, Anda M, Tabar AI, Alergia a *Anisakis simplex*. Análisis sanitario Navar 2003; 26: 25-30. [Google Scholar]
9. Martínez E, Loaiza L, Bastidas G, Anisakiosis. Comunidad y Salud 2009; 7: 18-22. [Google Scholar]
10. Jofré L, Neira P, Noemí I, Cerva JL, Pseudoterranovosis y sushi. Rev Chil Infectol 2008; 25: 200-5. [Google Scholar]
11. McClelland G, The trouble with sealworms (*Pseudoterranova decipiens* species complex, Nematoda): a review. Parasitology 2002; 124: S183-203. [PubMed] [Google Scholar]
12. Palm HW, Ecology of *Pseudoterranova decipiens* (Krabbe, 1878) (Nematoda : Anisakidae) from Antarctic waters. Parasitol Res 1999; 85: 638-46. [PubMed] [Google Scholar]

13. Mercado R, Torres P, Maira J, Human case of gastric infection by a fourth larval stage of *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakidae). Rev Saude Publica 1997; 31: 178-81. [PubMed] [Google Scholar]
14. McConnell CJ, Marcogliese DJ, Stacey MW, Settling rate and dispersal of sealworm eggs (Nematoda) determined using a revised protocol for myxozoan spores. J Parasitol 1997; 83: 203-6. [PubMed]
15. Hauksson E, The Prevalence, Abundance, and Density of *Pseudoterranova* sp. (p) Larvae in the Flesh of Cod (*Gadus morhua*) Relative to Proximity of Grey Seal (*Halichoerus grypus*) Colonies on the Coast off Drangar, Northwest Iceland. J Marine Biol 2011; Article ID 235832. [Google Scholar]
16. Jones RE, Deardorff TL, Kayes SG, Anisakis simplex: histopathological changes in experimentally infected CBA/J mice. Exp Parasitol 1990; 70: 305-13. [PubMed] [Google Scholar]
17. Anadón AM, Romarís F, Escalante M, Rodríguez E, Gárate T, Cuéllar C, Ubeira FM, The Anisakis simplex Ani s 7 major allergen as an indicator of true Anisakis infections. Clin Exp Immunol 2009; 156: 471-8. [PubMed] [Google Scholar]
18. WHO, IUIS. Allergen Nomenclature: Anisakis simplex. [cited Accessed 2011 Oct; Available from: www.allergen.org
19. Kobayashi Y, Ikeda K, Shiomi K, Elucidation of IgE-binding epitopes of Ani s 1: the major Anisakis simplex allergen. Mol Biochem Parasitol 2010; 174: 128-31. [PubMed] [Google Scholar]
20. Caballero ML, Moneo I, Specific IgE determination to Ani s 1, a major allergen from Anisakis simplex, is a useful tool for diagnosis. Ann Allergy Asthma Immunol 2002; 89: 74-7. [PubMed] [Google Scholar]
21. Rodriguez-Mahillo AI, Gonzalez-Muñoz M, Gomez-Aguado F, Rodriguez-Perez R, Corcuera MT, Caballero ML, Moneo I, Cloning and characterisation of the Anisakis simplex allergen Ani s 4 as a cysteine-protease inhibitor. Int J Parasitol 2007; 37: 907-17. [PubMed] [Google Scholar]
22. Rodriguez-Perez R, Moneo I, Rodriguez-Mahillo A, et al. Cloning and expression of Ani s 9, a new Anisakis simplex allergen. Mol Biochem Parasitol 2008; 159: 92-7. [PubMed] [Google Scholar]
23. Caballero ML, Umpierrez A, Moneo I, Rodriguez-Perez R. Ani s 10, a new Anisakis simplex allergen: cloning and heterologous expression. Parasitol Int 2011;60(2):209-12. [PubMed] [Google Scholar]
24. Cuéllar C, Daschner A, Valls A, De Frutos C, Fernández-Figares V, Anadón AM, et al. Ani s 1 and Ani s 7 recombinant allergens are able to differentiate distinct Anisakis simplex-associated allergic clinical disorders. Arch Dermatol Res 2012 Jan 15;DOI 10.1007/s00403-012-1206-8. [PubMed]
25. Valls A, Pascual CY, Martín Esteban M, Anisakis and anisakiosis. Allergol Immunopathol (Madr) 2003; 31: 348-55. [PubMed] [Google Scholar]
26. Filauro M, Rollandi GA, Cassola G, Quilici P, Angelini G, Belli F, Boccardo C, Gastrointestinal bleeding due to suspected anisakiasis: challenging differential diagnosis for a rare disease. Updates Surg 2011; 63: 213-7. [PubMed] [Google Scholar]
27. Montalvo M, Miele L, Marcheggiano A, Santoro L, Curigliano V, Vastola M, Gasbarrini G, Anisakis infestation: a case of acute abdomen mimicking Crohn's disease and eosinophilic gastroenteritis. Dig Liver Dis 2005; 37: 62-4. [PubMed] [Google Scholar]
28. Sashiyama H, Fu Kl, Hoshino T, Tsujinaka Y, Education and imaging: Gastrointestinal: gastric anisakiasis presenting as a submucosal tumour diagnosed by endoscopic submucosal dissection. J Gastroenterol Hepatol 2010; 25: 1806. [PubMed]
29. del Pozo V, Arrieta I, Tuñon T, Cortegano I, Gomez B, Cárdoba B, Gallardo S, Rojo M, Renedo G, Palomino P, Tabar Al, Lahoz C, Immunopathogenesis of human gastrointestinal infection by Anisakis simplex. J Allergy Clin Immunol 1999; 104(3 Pt 1): 637-43. [PubMed] [Google Scholar]
30. Nakajo M, Setoguchi Y, Onohara S, Nakajo M, Computed tomographic features of two cases of acute gastric anisakiasis. Abdom Imaging 2011; 36: 509-13. [PubMed] [Google Scholar]
31. Audicana MT, Kennedy MW, Anisakis simplex: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. Clin Microbiol Rev 2008; 21: 360-79. [PubMed] [Google Scholar]
32. Ventura MT, Tummolo RA, Di Leo E, D'Erasmo M, Arsieni A, Immediate and cell-mediated reactions in parasitic infections by Anisakis simplex. J Investig Allergol Clin Immunol 2008; 18: 253-9. [PubMed] [Google Scholar]
33. Mercado R, Torres P, Muñoz V, Apt W, Human infection by *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakidae) in Chile: report of seven cases. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96: 653-5. [PubMed] [Google Scholar]
34. Ishii Y, Fujino T, Weerasooriya MV, Morphology of anisakine larvae. In: Ishikura H, Namiki M, editors. Gastric Anisakiasis in Japan. New York: Springer-Verlag; 1989. p. 19-29.
35. Kliks MM, Anisakiasis in the Western United States: four new case reports from California. Am J Trop Med Hyg 1983; 32: 526-32. [PubMed]
36. Hochberg NS, Hamer DH, Anisakidosis: Perils of the deep. Clin Infect Dis 2010; 51: 806-12. [PubMed] [Google Scholar]
37. Amin OM, Eidelman WS, Domke W, Bailey J, Pfeifer G, An unusual case of anisakiasis in California, USA. Comp Parasitol 2000; 67: 71-5. [Google Scholar]
38. Ishikura H, Kikuchi K, Nagasawa K, Ooiwa T, Takamiya H, Sato N, et al. Anisakidae and anisakidosis. In: Sun T, editor. Progress in Clinical Parasitology. New York: Springer-Verlag; 1993. p. 43-102.
39. García F, Blanco JG, Garcés M, Juste S, Fuentes M, Herrero D, Freezing protects against allergy to Anisakis simplex. J Investig Allergol Clin Immunol 2001; 11: 49-52. [PubMed]
40. Gonzalez-Muñoz M, Rodriguez-Mahillo AI, Moneo I, Different Th1/Th2 responses to Anisakis simplex are related to distinct clinical manifestations in sensitized patients. Parasite Immunol 2010; 32: 67-73. [PubMed] [Google Scholar]
41. Park SK, Cho MK, Park HK, Lee KH, Lee SJ, Choi SH, et al. Macrophage migration inhibitory factor homologs of anisakis simplex suppress Th2 response in allergic airway inflammation model via CD4+CD25+Foxp3+ T cell recruitment. J Immunol. 2009 Jun 1;182(11):6907-14. [PubMed]
42. Cho MK, Lee CH, Yu HS. Amelioration of intestinal colitis by macrophage migration inhibitory factor isolated from intestinal parasites through toll-like receptor 2. Parasite Immunol. 2011 May;33(5):265-75. [PubMed]
43. Audicana MT, Anisakis: su papel en la anafilaxia. Alergol Inmunol Clin 2000; 15: 65-6. [Google Scholar]
44. Audicana M, García M, del Pozo MD, Diez J, Munoz D, Fernández E, Echenagusia M, Fernández de Corres L, Ansotegui J, Moneo I, Clinical manifestations of allergy to Anisakis simplex. Allergy 2000; 55: 28-33. [Google Scholar]
45. Daschner A, De Frutos C, Valls A, Vega de la Osada F, Different clinical presentation of Anisakis simplex associated urticaria is dependent on the frequency of raw fish intake. Allergol Immunopathol (Madr) 2010; 38: 166-7. [PubMed] [Google Scholar]
46. Polimeno L, Loiacono M, Pesetti B, Mallamaci R, Mastrodonato M, Azzarone A, Annoscia E, Gatti F, Amoruso A, Ventura MT, Anisakiasis, an underestimated infection: effect on intestinal permeability of anisakis simplex-sensitized patients. Foodborne Pathog Dis 2010; 7: 809-14. [PubMed]

Apósitos de quitosano para el tratamiento de pie diabético (Chitosan films for the diabetic foot treatment)

Gladys Velazco ¹✉, Anajulia Gonzalez ¹, Reynaldo Ortiz ²

¹ Laboratorio Integrado de Biología Molecular y Celular (LIBCEM), Universidad de Los Andes. Ambulatorio Venezuela, Unidad de Larga Estancia, Mérida, Venezuela. ² Laboratorio de Electroquímica Fundamental y Aplicada, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

[CASO CLINICO]

Recibido: Marzo de 2011. Aceptado: Octubre de 2011.

Resumen

Se demuestra la efectividad de los apósitos de quitosano para el tratamiento de pie diabético. Para ello se seleccionó un paciente de 48 años de edad, diabético tipo II, con una lesión en la zona dorsal del pie derecho. El tratamiento consistió en la aplicación de apósitos a base de sales de acetato de quitosano. El procedimiento se desarrolló en tres fases con una duración total de cuarenta y cinco días. Los resultados demuestran la efectividad de las sales de quitosano para este tratamiento, manifestando evidente reepitelización y cicatrización completa del tejido en el lapso de tiempo planteado.

Palabras clave

Regeneracion, quitosano, reepitelizacion, andamios.

Abstract

In this clinical case, the effectivity of chitosan films for the treatment of diabetic foot ulcers is evaluated. For this purpose, a 48 year old patient was selected, type 2 diabetic, with a lesion in the dorsal area of his right foot. Treatment was based on the application of the chitosan films. The whole procedure took 45 days, which were divided in 3 phases. The results demonstrated the effectivity of the chitosan salts for the treatment of this complication, which seems to aid in the re-epithelialization and complete healing during the elapsed time.

Keywords

Regeneration, chitosan, re-epithelization, scaffold.

Introducción

La aparición de los biomateriales usados como andamios para crecimiento de tejidos ha constituido una nueva esperanza en el ámbito médico especialmente en el tratamiento de las enfermedades vasculares periféricas. El pie diabético, afección que causa el 60% de las amputaciones en la población con esta afección, se ha visto beneficiada de este aporte científico en la ingeniería de tejidos (1). La extensa pérdida de tejido blando en lesiones ulcerativas dificultan el abordaje terapéutico dejando pocas opciones de cirugía reconstructiva, no obstante, los biomateriales utilizados como apósitos que consecutivamente se comportan como andamios para

crecimiento tisular se han convertido en una opción terapéutica para estos pacientes (2,3).

La ingeniería tisular es una ciencia que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida para desarrollar sustitutos biológicos que reparen o mejoren la función biológica de un tejido u órgano, basándose en el uso de tres elementos: biomateriales, células y andamios (2). A pesar de los muchos avances alcanzados, los investigadores de este campo aun se enfrentan a importantes retos en la reparación o la sustitución de los tejidos, en este sentido, los biomateriales utilizados en la construcción de andamios juegan un papel muy importante debiendo cumplir una serie de requisitos tales como: permitir una estructura de poros con el fin de favorecer la integración y vascularización del tejido, ser

✉ Autor de correspondencia: Gladys Velazco, Universidad de Los Andes, Facultad de Odontología, Laboratorio Integrado de Biología Molecular y Celular, Telefax: 02742402438, e-mail: gvelazco@ula.ve, Mérida 5101, Venezuela.

biocompatibles, biodegradables, teniendo adecuadas propiedades mecánicas y una superficie química apropiada que favorezca la adhesión, diferenciación y proliferación celular (3). En este contexto, el quitosano es un candidato con un gran potencial ya que posee propiedades biológicas únicas, entre las que se incluyen su biocompatibilidad, biodegradabilidad, además de su marcada actividad antibacterial y de favorecimiento de la quimotaxis, destacando su miscibilidad al unirse a otros compuestos, favoreciendo la elaboración de películas con aplicaciones en la regeneración de tejidos (4).

El quitosano despierta gran interés debido a la posibilidad de modular y controlar sus propiedades químicas, físicas y biológicas bajo suaves condiciones de reacción. La protonación obtenida por el procesamiento del material le provee de características antisépticas importantes, evitando el crecimiento bacteriano no deseado en estas ulceraciones (5). La clave para la cicatrización por segunda intención es básicamente lograr la migración de fibroblastos capaces de estimular y liberar factores de crecimiento que favorezcan el proceso cicatrizal; esta característica de estimulación fibroblástica es lograda por apósisos a base de quitosano (6).

El desarrollo de materiales basados en quitosano para la ingeniería tisular, es un reto para los investigadores en el área. El objetivo de este trabajo fue demostrar la efectividad de películas de quitosano para el tratamiento de un paciente con pie diabético.

Caso clínico

Paciente: Este estudio fue aprobado por del Comité de Bioética del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes IAHULA. Se evaluó un paciente de género masculino con 48 años de edad, diabético tipo II controlado, que acude a consulta por presentar en la zona dorsal del pie derecho sobre el cuerpo del quinto metatarsiano hacia la expansión digital dorsal una ulcera con exposición del tendón, edema generalizado extendido hacia los dedos del pie, con una duración de cinco meses. El paciente reporta la realización de protocolo de curación con lavado, limpieza y colocación de apósiso de fabricación comercial a base de alginato cada cuarenta y ocho horas sin evolución clínica significativa. Se decide comenzar las sesiones de curas con apósisos a base de quitosano cada ocho días.

Tratamiento con apósisos de acetato de quitosano: El protocolo establecido en este caso consistió en una primera fase de limpieza con lavados repetidos durante cuarenta minutos cada vez que se abriera la cura, usando jabón antiséptico, solución salina y ácido acético. En la fase dos, se diseñó el andamio a utilizar; se procedió a realizar una sal de acetato de quitosano en forma de lámina. Para la preparación de las mezclas de quitosano se utilizó el producto comercial caracterizado siguiendo las normas ASTM F2103 (*Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Product Applications*) (7). Para este ensayo se usa quitosano caracterizado de la empresa Microsomias y Biopolímeros SL y Guinama SLU, cuyas características organolépticas permitieron observar a través del apósiso el estado de la lesión, además de, permitir hermetismo evitando el paso de bacterias del exterior al interior de la lesión (figura 1). En la fase tres del protocolo se colocaron láminas de quitosano sobre la lesión, vendando con gasa estéril.

Resultados y Discusión

En la primera evaluación a los ocho días de la colocación del apósiso, se observa comienzo de la granulación y evidente cubrimiento del tendón previamente expuesto, además de desaparición de la inflamación. Se repitió la fase 1 establecida inicialmente seguida nuevamente de la colocación de apósiso sobre la lesión.



Figura 1. Apósisos de sales de acetato de quitosano.



Figura 2. Evolución cronológica de la lesión: A) Aspecto inicial de la lesión, colocación del apósito, y apariencia de la lesión a través de él. B) Chequeo de la lesión a los ocho días del comienzo del tratamiento C) Evaluación a los quince días D) Evaluación a los veintidós días E) Aspecto de la lesión a los treinta días F) Aspecto de la lesión a los cuarenta y cinco días.

De nuevo se hace revisión de la lesión a los quince días de la colocación, se observa una integración más evidente del apósito lo que indica que el hermetismo aumenta, disminuyendo el paso de bacterias y mejorando el medio para la proliferación celular. A los veintidós días de la evaluación es clara la disminución del diámetro de la lesión y a través del apósito ya no se observa el tejido tendinoso, siguiendo la integración del material al tejido.

La siguiente evaluación fue a los treinta días, la reepitelización es evidente observándose características de una epidermis diferenciada, a los cuarenta y cinco días el cierre de la herida en su totalidad y una completa cicatrización por segunda intención. En la figura 2 se observa cronológicamente la evolución de la lesión.

Las heridas que alteran el epitelio de pacientes diabéticos representan una amenaza para su integridad física (1). Los polímeros naturales han sido utilizados con mucha frecuencia para tratamientos cutáneos debido a la similitud al ambiente celular nativo (8). Se han reportado estudios que han demostrado que el quitosano estimula la migración de polimorfonucleares al área de la herida, donde se activan y secretan mediadores inflamatorios como TNF- α , IL-1, IL-8 e IL-12 (3).

Este estudio coincide con otros estudios donde se propone la elaboración de andamios que funcionen como apóritos de regeneración de tejidos ayudando al proceso de curación y reparación de

heridas crónicas utilizando el quitosano como promotor de la migración de fibroblastos y angiogenesis necesaria en la regeneración de tejidos dañados (5,6). Planimétricamente se observa el cierre de la herida y la aceleración de la epitelización completa coincidiendo con otros reportes con los mismos resultados en individuos sanos (9). La eficacia en la cicatrización de heridas de larga data con variedades de apóritos de quitosano solo o combinado con plata o alginato ha dado resultados similares al presentado en este ensayo, evidenciándose la cicatrización en períodos cortos de tiempo (10,11). La biodegradabilidad del material fue directamente proporcional al cierre de la herida, lo que demuestra la versatilidad del compuesto cuando se pretende usar en curas oclusivas, mostrando una promesa para la regeneración no solo de piel si no de otros tejidos dañados.

Los apóritos a base de quitosano representan una opción de tratamiento efectiva, económica, accesible, y fácil de preparar. Lograr instaurar los métodos a base de películas regenerativas podría representar nuevas terapéuticas en la regeneración directa de tejidos afectados.

Referencias

1. Sage RA, Pinzur M, Rodney S, Coleen N, Amputation and Rehabilitation of Diabetic Foot. The Diabetic Foot. 2nd Ed. New York: Humana Press; 2006.
2. Ficke JR, Pollak AN, Extremity War Injuries: Development of Clinical Treatment Principles. *J Am Acad Orthop Surg* 2007; 15: 590-5. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
3. Yang J, Woo SL, Yang G, Wang J, Cui L, Liu W, Cao Y, Construction and clinical application of a human tissue-engineered epidermal membrane. *Plast Reconstr Surg* 2010; 125:901-9. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
4. Inphonlek S, Pimpha N, Sunintaboon P, Synthesis of poly(methyl methacrylate) core/chitosan-mixed-polyethyleneimine shell nanoparticles and their antibacterial property. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010; 77:219-26. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
5. Kordestani S, Shahrezaee M, Tahmasebi MN, Hajimahmodi H, Haji Ghasemali D, Abyaneh MS, A randomised controlled trial on the effectiveness of an advanced wound dressing used in Iran. *J Wound Care* 2008; 17: 323-7. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
6. Deshpande MS, Kuchroo PV, A novel dermal tissue construct: development and in vitro characterization. *Biotechnol Prog* 2010; 26:1424-30. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
7. Medical Device Standards and Implant Standards, Biomaterials and Biomolecules for TEMPS Copyright © 1996-2010 ASTM. All Rights Reserved. ASTM International, 100 Barr Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA, 19428-2959 USA, ISO Documents ISO13408-1:1998: Aseptic Processing of Health Care Products--Part 1: General Requirements Ph.Eur. Monograph Chitosan Chloride, Nov. 2000.
8. Weinstein-Oppenheimer CR, Aceituno AR, Brown DL, Acevedo C, Ceriani R, Fuentes MA, Albornoz F, Henríquez-Roldán CF, Morales P, Maclean C, Tapia SM, Young ME, The effect of an autologous cellular gel-matrix integrated implant system on woundhealing . *J Transl Med* 2010; 8: 59-68. [\[PubMed\]](#)
9. Altman AM, Yan Y, Matthias N, Bai X, Rios C, Mathur AB, Song YH, Alt EU, IFATS collection: Human adipose-derived stem cells seeded on a silk fibroin-chitosan scaffold enhance wound repair in a murine soft tissue injury model. *Stem Cells* 2009; 27: 250-8. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
10. Li D, Diao J, Zhang J, Liu J. Fabrication of new chitosan-based composite sponge containing silver nanoparticles and its antibacterial properties for wound dressing. *J Nanosci Nanotechnol* 2011; 11: 4733-8. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
11. Dantas MD, Cavalcante DR, Araújo FE, Barreto SR, Aciole GT, Pinheiro AL, Ribeiro MA, Lima-Verde IB, Melo CM, Cardoso JC, Albuquerque Júnior RL, Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy. *J Photochem Photobiol B* 2011; 105:51-9. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

Fascitis necrotizante de punto de partida abdominal: a propósito de un caso

(Necrotizing fasciitis from abdominal starting point: purpose of case)

Dayyorsem Canelón ¹✉, Andrea Fargier ¹, Gustavo León ², María A. Silva ³, Estrella Uzcátegui ⁴

¹ Estudiante 6^{to} año Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela. ² Médico Especialista en Cirugía General, IAHULA, Mérida-Venezuela. ³ Médico Residente Postgrado Ginecología y Obstetricia, IAHULA, Mérida-Venezuela.

⁴ Médico Especialista en Cirugía General, Adjunto del Servicio de Cirugía General, IAHULA. Mérida-Venezuela.

[CASO CLINICO]

Recibido: Septiembre de 2011. Aceptado: Noviembre de 2011.

Resumen

La fascitis necrotizante es una infección de etiología típicamente polibacteriana, cuyas toxinas afectan los tejidos blandos (fascias, subcutáneo, vasos y nervios). Caso Clínico: masculino de 47 años de edad, hipertenso crónico no controlado, quien ingresa en shock hipovolémico secundario a abdomen agudo quirúrgico traumático por herida de arma de fuego en región lumbar sin orificio de salida. Se aplica ABC para paciente politraumatizado incluyendo profilaxis antimicrobiana a base de Ampicilina-Sulbactam-Metronidazol. Es llevado a quirófano teniendo como hallazgos operatorios: 1400 cc de hemoperitoneo y contenido intestinal (materia fecal) libre en cavidad, desvascularización de mesocolon ascendente, lesión de arteria ileocólica y colon, por lo que se procede a realizar hemicolecotomía derecha ampliada. En el postoperatorio inmediato y de evolución rápida presenta lesiones cutáneas dadas por eritema, edema, vesículas, flictendas en flanco derecho, a las 36 hrs cursa con necrosis que se extiende hasta tercio medio y lateral de muslo, se toma cultivo que reporta *Streptococcus sp.* β hemolíticos, *Escherichia coli*, *Citrobacter perfringens*. Decidiéndose realizar fasciotomía, ampliar la antibioticoterapia de amplio espectro con (Tigeciclina) y dar soporte ventilatorio mecánico teniendo a pesar de ello, una evolución tórpida que conduce a falla multiorgánica y deceso. Consideramos que si bien es una patología poco frecuente debe tenerse presente para garantizar el tratamiento precoz y de esta manera disminuir su alta mortalidad.

Palabras clave

Fascitis Necrotizante, herida por arma de fuego, fasciotomía.

Abstract

The necrotizing fasciitis is an infection of typically polybacterial etiology, whose toxins affects the soft tissues (fascias, subcutaneous, blood vessels and nerves). Clinical case: 47 years old male, with uncontrolled chronic hypertension, admitted for hypovolemic shock secondary to acute surgical traumatic abdomen by gunshot wound in the lumbar region without exit hole. ABC approach for polytraumatized patient was applied including Ampicillin-Sulbactam-Metronidazole antimicrobial prophylaxis. He was taken to operating room obtaining these findings: 1400 cc of hemoperitoneum and intestinal contents (stool) free inside abdominal cavity, mesocolon devascularization, ileocolic artery and colon injuries, so we proceed to perform an extended right hemicolecotomy. In the immediate postoperative period rapidly developed skin lesions given by erythema, edema, vesicles, phlyctenas on right flank. After 36 hrs, presented necrosis which spread to middle and lateral third of thigh. Culture reports *Streptococcus sp.* β hemolytic, *Escherichia coli*, *Citrobacter perfringens*. Agreeing to perform fasciotomy, expand the antibiotic therapy wide spectrum with (Tigecycline) and give mechanical ventilatory support, getting, despite that, a bad clinical progress leading to organ failure and death. We believe while it is an uncommon pathology must be borne in mind to ensure early treatment and reduce its high mortality.

Keywords

Necrotizing fasciitis, polybacterial, fasciotomy.

Introducción

La "fascitis necrotizante" (FN) es el término que se utiliza ampliamente para designar las infecciones gangrenosas, de etiología típicamente polibacteriana, que se caracterizan por ser poco común causadas por bacterias virulentas que producen toxinas y que no sólo afectan a la piel sino que abarcan fascia superficial y profunda, tejido, grasa subcutánea, nervios, arterias, venas y además, está acompañada de síntomas sistémicos severos.

En un inicio se pensaba que el único responsable era el *Streptococcus sp* β hemolíticos del grupo A, sin embargo, en la últimas dos décadas los científicos han demostrado que la patogénesis es usualmente polimicrobiana, tal cual se evidencia en la Tabla 1 (1).

Tabla 1. Bacterias responsables de la fascitis necrotizante.

Bacteria	Frecuencia *
	(Porcentaje, %)
Gram-Positivo	
<i>Staphylococcus aureus</i>	22,0
Grupo A <i>Streptococcus</i>	13,6
Grupo B <i>Streptococcus</i>	3,4
Grupo F <i>Streptococcus</i>	1,7
<i>Viridans streptococci</i>	1,7
Gram-Negativo	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	22,0
<i>Echerichia coli</i>	3,4
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,7
<i>Citrobacter</i>	1,7
<i>Proteus spp.</i>	3,4
<i>Aeromonas</i>	11,9
<i>Vibrio vulnificus</i>	5,1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,1
Infección mixta	28,8

* Estudio realizado en 59 pacientes (1).

En cuanto a su evolución se conocen tres etapas: en el estadio temprano, encontramos una enfermedad clínicamente indistinguible entre una infección severa de tejidos blandos y una celulitis o erisipela, ya que sólo se manifiesta dolor, tumefacción y calor local. En el estadio intermedio es característico además encontrar flictenas con márgenes de tejido afectado mal definidos y el inicio de cambios en la

coloración de la piel, sugestivos de isquemia. Finalmente, en el estadio tardío, se hacen evidentes las vesículas llenas de sangre, hay anestesia del área afectada y una franca gangrena tisular. Dentro de las manifestaciones sistémicas que acompañan dicha infección se destacan fiebre alta, hipotensión, postración y falla multiorgánica.

En cuanto al diagnóstico lo primordial es la clínica, donde la evidencia de necrosis tisular permite inferir nos encontramos ante un caso de FN. Sin embargo, estudios de imagenología (Tomografía computarizada [TC], resonancia magnética [RM] y ultrasonido) ayudan a confirmar el diagnóstico. Por ejemplo, los signos indicativos en una TC e incluso en el ultrasonido incluyen compromiso de la fascia profunda, con presencia de gas, líquido, distorsión y edema alrededor (2). En infecciones complicadas, se combina el uso de RM (técnica preferida para detectar infección de partes blandas) y punción- aspiración guiada por ultrasonido, con posterior realización de cultivo y tinción Gram para aislar el agente causal. Pruebas como el "finger-test" y la biopsia por congelación también son usadas para estudiar esta infección. El éxito del tratamiento requiere un rápido reconocimiento, adecuado desbridamiento quirúrgico y antibioticoterapia agresiva. El uso de terapia de oxígeno hiperbárico sigue siendo controversial (3).

Caso clínico

Paciente: Se trata de paciente masculino de 47 años de edad, quien sufre herida por arma de fuego a nivel de la región lumbar derecha sin orificio de salida. Seguidamente presenta palidez cutánea intensa e inestabilidad hemodinámica, razón por la cual es trasladado a nuestro centro asistencial. **Antecedentes Personales:** apendicectomía hace 12 años, hipertensión arterial no controlada. **Examen Físico:**

Presión Aterial (PA) 90/55 mmHg, Frecuencia Cardíaca (Fc) 133 pulsaciones por minuto (ppm), Frecuencia respiratoria (Fr) 32 respiraciones por minuto (rpm), (ameritó posterior al interrogatorio intubación endotraqueal por cursar con saturación de O₂ de 78%). Paciente en malas condiciones generales con marcada palidez cutáneo mucosa, con alteración en el sensorio, taquipneico, diaforético, sangrado a nivel del orificio de entrada en región lumbar. Auscultatoriamente en tórax no se encuentran alteraciones a nivel abdominal Ruidos hidroaéreos abolidos, intenso dolor abdominal con signo francos de irritación peritoneal se evidencia orificio de entrada en región lumbar derecha sin orificio de salida ni

abotonamiento del proyectil, extremidades sin anomalías. **Manejo Inicial:** se basó en el Air-Breath-Circulation (ABC) de todo paciente traumatizado, con establecimiento de la vía aérea adecuada mediante intubación endotraqueal, cateterización de vena subclavia derecha reportando Presión Venosa Central (PVC) en 3 cm de H₂O, administración de toxoide tetánico, antibioticoterapia con ampicilina sulbactam 1,5 g, metronidazol 500 mg, colocación de sonda nasogástrica, sondaje vesical y posteriormente llevado a mesa operatoria. **Hallazgos Operatorios:** incisión supra e infraumbilical. Hemoperitoneo de 1400 cc y contenido intestinal (materia fecal) libre en cavidad abdominal, desvascularización de mesocolon transverso, lesión de arteria ileocólica, 2 lesiones grado IV de colon transverso, 4 lesiones III grado en ciego y colon ascendente con compromiso de válvula ileocecal y lesión vesical transfixiante. Por lo que se procede a realizar hemicolecctomía derecha ampliada e ileotransverso anastomosis además de lavado exhaustivo de la cavidad abdominal. **Evolución:** durante el post operatorio el paciente presentó eritema, y lesiones vesiculares satélites (Fig. 1) que en horas fueron evolucionando rápidamente hasta formarse un área de necrosis que en 36 horas



Figura 1. Flictens y necrosis en dedos.

involucró todo el flanco derecho, a las 72 horas incluía hasta el 1/3 medio y cara lateral del muslo derecho (Fig. 2). Se tomó muestra para cultivo y antibiograma que reporta crecimiento de Estreptococos β hemolítico, *E. coli* y *Clostridium perfringens* sensibles a la Tígeciclina por antibiograma realizado, en vista de la evolución tórpida se practica fasciotomía, sin lograr resultados satisfactorios a pesar de la utilización de antimicrobianos de amplio espectro como la Tígeciclina indicada en infecciones severas o complicadas de partes blanda e intraabdominales, con

dosis inicial de 100 mg IV en infusión, seguida de una dosis de 50 mg IV cada 12 horas, que se aplicó desde el momento del reporte del antibiograma y hasta el deceso del paciente.

La publicación de este caso clínico fue avalada por el Comité de Bioética del Instituto Autónomo



Figura 1. Fascitis Necrotizante en flanco y muslo.

Hospital Universitario de Los Andes IAHULA.

Discusión

Las infecciones necrotizantes de los tejidos blandos varían en su presentación clínica, pero en general son de curso grave, que si bien son poco frecuentes, tienen una elevada mortalidad si no son diagnosticadas y tratadas oportunamente, considerándose como "una enfermedad que una vez que se ve nunca se olvida" (4). Aunque es frecuente que exista un antecedente traumático o quirúrgico, en algunos casos se encuentra alguna enfermedad subyacente, lo cual no impide pueda desarrollarse en pacientes jóvenes previamente sanos (5,7). Existen diferentes reportes que sugieren que las infecciones invasivas por SBHGA, incluyendo la FN y el Síndrome del Shock Tóxico Estreptocócico (SSTS) se encuentran en aumento. Así como en un estudio prospectivo realizado durante el período 1992 a 1993 en Ontario, Canadá con 323 pacientes con infecciones invasivas por SBHGA, se encontró una incidencia de 1,5 casos/100.000 habitantes por año, de los cuales el 6% desarrolló FN y el 13% SSTS (8). En otro estudio realizado en el Haukeland University Hospital, en Noruega, entre 1992 y 1994 se halló una incidencia de 2 casos/100.000 habitantes de FN (9). En Palma de Mallorca, España, se estudió una población de 31 pacientes entre 1995 y 1998, que arrojó una incidencia

de infecciones invasivas por SBHGA de 5 a 10 casos/año, de los cuales 3 pacientes (9,6%) correspondían a FN y 2 pacientes (6,4%) a SSTS (10). En un estudio publicado por Bilton (11) en 1998, se describe una mortalidad de 38% con cirugía conservadora, tasa que disminuyó a 4% cuando se practicó la cirugía radical. Freischlag y col. (12) por su parte, cuyos pacientes estaban más graves, publican en su estudio una mortalidad de 71% con cirugía conservadora, cifra que disminuyó casi a la mitad (43%), cuando se optó por la cirugía radical, demostrando que la mortalidad es del 32% cuando la cirugía se realiza antes de las 24 hrs. del diagnóstico, frente al 70% cuando dicho período era mayor. Por tanto, debe considerarse la FN como una auténtica urgencia quirúrgica y recordar que sin desbridamiento quirúrgico la mortalidad es cercana al 100% (13). También es importante tener en cuenta otros factores determinantes en la evolución de estos casos como lo demuestra el estudio de Wall (14) quien demostró que un recuento de glóbulos blancos mayor de 15.400 tenía un valor predictivo positivo para FN de 26%, pero el valor predictivo negativo era de 99%, lo que significa

que se puede afirmar, con una certeza de 99%, que si el paciente tiene un recuento de menos de 15.400, no tiene una FN. Sin embargo, otro estudio de Brandt y Wahl (15) afirma que 38% (más de un tercio) de los pacientes con FN presentaron un recuento de glóbulos blancos menor de 10.000, lo que contrasta con el anterior, definitivamente esto dependería de la etapa en que se descubre la enfermedad.

La FN es una entidad mórbida de presentación muy variable, que desconcierta al equipo médico por su rápida instalación, agresividad y por el pronóstico muchas veces sombrío si no se piensa y actúa rápidamente ante su sospecha. Es preferible actuar con agresividad (desbridamiento del tejido hasta llegar a tejido sano), antibioticoterapia de amplio espectro, manejo multidisciplinario en la unidad de cuidados intensivos (16-18). El tratamiento quirúrgico es fundamental en estos casos, puesto que sin este la mortalidad es del 100% (19). El exceso de agresividad puede eliminar tejido sano, pero el exceso de prudencia puede costar la vida al paciente.

Referencias

1. Liu YM, Chi CY, Ho MW, Chen CM, Liao WC, Ho CM, Lin PC, Wang JH, Microbiology and factors affecting mortality in necrotizing fasciitis. *J Microbiol Inmunol Infect* 2005;38:430-5. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
2. Wong CH, Wang YS, The diagnosis of necrotizing fasciitis. *Curr Opin Infect Dis* 2005; 18:101-6. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
3. Edlich R, Cross CL, Dahlstrom JJ, Long WB 3rd, Modern concepts of the diagnosis and treatment of Necrotizing fasciitis. *J Emerg Med* 2010; 39:261-5. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
4. Shmid MR, Kossmann T, Duewell S, Differentiation of necrotizing fasciitis and celulitis using MR imagine. *AJR Am J Roentgenol* 1998; 170: 615-20. [\[PubMed\]](#)
5. Morales JR, Pena E, Polimeni JL, Napoli MC, Infecciones estreptocócicas. En: Jorge Osvaldo Gorodner. Enfermedades infecciosas. 2a ed. Rosario-Argentina: Corpus, 2004. Pp. 555-66.
6. Arjol LI, Ayala Ortiz CE, Ayala Ortiz FR, Bernachea S, Fascitis Necrotizante debida a Estreptococo β hemolítico Grupo A. Revisión. *Revista de Posgrado de la Vla Cátedra de Medicina* 2007; 163:12-5. [\[Google Scholar\]](#)
7. Azkarate Ayerdi B, Wichmann De Miguel MA, Arruabarrena Echeverria I, Martín Rodríguez FJ, Izquierdo Elena JM, Rodríguez Arondo F, Fascitis Necrosante por *S. pyogenes* en dos pacientes sanos. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2002;20:173-5. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
8. Bosch T, Riera M, Galmés M, Ramírez A y Alberti S, Infecciones invasoras por estreptococo del grupo A: características clínicas y análisis microbiológicos de 31 casos. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2001;19: 371-5. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
9. Fernández Guerrero ML, Martínez Quesada G, Bernácer Borja M, Sarasa Corral JL, La gangrena estreptocócica y la así llamada "enfermedad de las bacterias devoradoras de carne" una infección rara y devastadora. *Rev Clin Esp* 1999; 199: 84-8. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
10. Bueno Rodríguez PM, Mariño Fonseca J, Bueno Rodríguez JC, Martínez Paradela CR, Bueno Barreras E, Fascitis necrosante. *Rev. Cubana Ortop Traumatol* 1999;13: 43-53.
11. Bilton BD, Zibari GB, McMillan RW, Aultman DF, Dunn G, McDonald JC, Aggressive surgical management o necrotizing fasciitis serves to decrease mortality: a retrospective study. *Am Surg* 1998; 64:397-400. [\[PubMed\]](#)
12. Freischlag JA, Ajalat G, Busuttil RW, Treatment of necrotizing soft tissue infections the need for a new approach. *Am J Surg* 1985; 149:751-5. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
13. Daniel, E, Fascitis necrotizante, una complicación mortal en cirugía de varices. *Rev Colombiana Cirugía Vascular* 2007; 7:46.
14. Wall D, Klein S, Black S, de Virgilio C, A Simple Model to Help distinguishing necrotizing fasciitis from nonnecrotizing soft tissue infection. *J Am Coll Surg* 2000; 191:227-31. [\[PubMed\]](#)
15. Brandt MM, Corpron CA, Wahl W, Necrotizing soft tissue infections: a surgical disease. *Am Surg*. 2000; 66:967-70. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
16. Chong A, Delegge, M, Necrotizing fasciitis after direct percutaneous endoscopic jejunostomy. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 912-3. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
17. Urschel JD, Necrotizing soft tissue infections. *Postgrad Med J* 1999;75:645-9. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
18. May AK. "Infecciones Quirúrgicas". En Clínicas Quirúrgicas de Norteamérica 2009; 89:403-20. [\[Google Scholar\]](#)
19. Hasham S, Matteucci P, Stanley P, Hart N. Necrotising fasciitis. *BMJ* 2005; 330:830-2. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)

Enfermedad de Moyamoya y embarazo gemelar. Presentación de un caso y revisión de literatura

(Moyamoya disease and twin pregnancy. Case report and literature revision)

Airam Amoroso¹ , Gustavo Frontado¹, Hilarion Araujo², Verónica Montilla³

¹ Estudiante 6^{to} año Medicina, Universidad de Los Andes. ² Médico Especialista en Cirugía General, Adjunto del Servicio de Neurología, IAHULA. Mérida-Venezuela. ³ Médico Residente Postgrado Neurología, IAHULA, Mérida-Venezuela.

[CASO CLINICO]

Recibido: 29 de Septiembre de 2011. Aceptado: 22 de Enero de 2011.

Resumen

La enfermedad de Moyamoya es una vasculopatía oclusiva cerebral progresiva, caracterizada por estenosis u oclusión de la porción supraclinoida de la arteria carótida interna, principalmente de la arteria cerebral media y de la arteria cerebral anterior. Su aspecto angiográfico semeja el humo de cigarrillo que en japonés significa "moyamoya". Presentamos el caso de una paciente femenina de 28 años quien presentó cefalea y crisis epilépticas focales desde los 5 años de edad y embarazo gemelar de alto riesgo a los 16 años, que ameritó cesárea segmentaria; Panangiografía que revela imagen semejante a humo de cigarrillo consistente con Enfermedad de Moyamoya.

Palabras clave

Enfermedad de moyamoya. Embarazo gemelar. Estenosis. Arteria cerebral media. Panangiografía.

Abstract

Moyamoya disease is a progressive cerebral occlusive vasculopathy characterized by stenosis or occlusion of the supraclinoid portion of the internal carotid artery, mainly the middle cerebral artery and anterior cerebral artery. The angiographic appearance resembles "cigarette's smoke" which means in Japanese "moyamoya". We report the case of a 28 years old female who presented headache and focal seizures since 5 years old and a high-risk twin pregnancy at 16 years old, that required cesarean section; panangiography reveals a similar picture of "cigarette's smoke" consistent with Moyamoya disease.

Keywords

Moyamoya disease. Twin pregnancy. Stenosis. Middle cerebral artery. Panangiography.

Introducción

La enfermedad de Moyamoya (EM) es una vasculopatía que se caracteriza por una estenosis progresiva (hasta su oclusión), de la porción terminal de ambas carótidas internas, que puede incluir las arterias cerebrales anterior (ACA) y media (ACM), asociada a una red vascular anormal de vasos denominados de moyamoya y cuya clínica está caracterizada por cefalea, convulsiones, hemiparesia, hemiplejía y disartria (1). Su aspecto angiográfico semeja el humo de cigarrillo que en japonés significa "moyamoya".

A nivel mundial las estadísticas reportan mayor incidencia en el Este de Asia, siendo la mayoría de los casos reportados originarios de Japón, Corea y China. La incidencia anual estimada en Japón en 1994 era de 0,35 por cada 100.000 personas, mientras que en Europa era la décima parte de esto (2). En un estudio llevado a cabo por Roy Suholeiki en Estados Unidos, se reporta que la prevalencia de EM, en California y Washington, fue de 0,086 casos por 100.000 habitantes; en este mismo estudio, se hace un reporte desde el punto de vista étnico en el cual se destaca una prevalencia de 4,6 en asiáticos, 2,2 en afroamericanos y 0,5 en hispanos (3).

Es bien sabido que EM ha sido observada predominantemente en mujeres, con una relación mujer-hombre de 1,8:1. Teniendo un carácter bimodal, observándose un pico de incidencia en la primera y cuarta década de vida (2). En nuestro país no existen estadísticas oficiales sobre casos de EM, sólo reportes de casos aislados publicados.

Desde el punto de vista genético y de factor hereditario respecto a la EM, se han realizado múltiples estudios en los cuales se expresa el carácter autosómico dominante con penetrancia incompleta, pero sin embargo el factor hereditario de esta patología aún no ha sido determinado. Y Mineharu, K Takenaka, H Yamakawa realizaron un análisis de asociación de tejido inhibidor de metaloproteinasas 2 en 17q25 que mostró que un polimorfismo en la región del promotor se asoció significativamente con familiares MMD (F-MMD) (2).

La relación de transmisión maternal-paternal es de 3,44:1, mostrando predominancia maternal, y la transmisión madre-hija fue más comúnmente vista (60%). En éste mismo estudio, se encontraban dentro del universo familiar estudiado, 17 pares de gemelos, 14 de los cuales eran monocigotos, dos dicigotos y uno con cigocidad desconocida; la relación de gemelos monocigotos a dicigotos en la población general era aproximadamente 2:1, mientras que en los pacientes con EM era de 4,7-7,5:1, mostrando predominancia monocigota (2).

En la mayoría de la literatura revisada, no existen revisiones extensas del manejo del embarazo asociado con EM.

Presentamos el caso de una paciente con clínica desde los 5 años de edad, EM diagnosticada a los 14 años por panangiografía y que presentó embarazo gemelar a los 16 años complicado con convulsiones recurrentes y cuadriparesia; quien ha mantenido clínica de Accidentes Isquémicos Transitorios (AIT) durante los 12 años siguientes, último AIT en enero de 2011, con tratamiento farmacológico sintomático y sin secuelas neurológicas y motoras importantes.

Caso clínico

Femenino de 28 años de edad, quien consulta por cefalea con características similares a migraña y con crisis epilépticas focales con generalización secundaria tónica y tónico-clónicas recurrentes desde los 5 años de edad, actualmente controlada con Difenilhidantoina y Fenobarbital. Antecedentes Personales: Producto de Parto Simple Natural a

Término (PSNAT) controlado, no complicado, intradomiciliario. Conocida por el servicio de neurología desde el año 1992 por presentar cefalea vascular tipo migraña y crisis epiléptica parcial mixta. Diagnóstico angiográfico en 1998 con síndrome de Moyamoya. Antecedentes Familiares: Tío materno fallecido con tumor cerebral. Antecedentes Gineco-Obstétricos: Menarquia a los 11 años de edad, Ciclos Menstruales 30/5 días, eumenorreica, sexarquia a los 15 años de edad, 1 pareja sexual, Métodos Anticonceptivos niega, embarazo gemelar de alto riesgo a los 16 años de edad (año 2000), complicado con convulsiones y Amenaza de Parto Pretérmino (APP) secundaria a infección urinaria y síndrome anémico durante el primer trimestre de gestación.

A las 36 semanas presenta signos de focalización neurología: escotomas de pocos segundos de duración, desviación de comisura labial hacia el lado derecho y test de reactividad fetal (TRF) no reactivo con hipoactividad en feto 1 y frecuencia cardiaca fetal (FCF) no auscultable (evento aislado en la evolución clínica), se decide en conjunto por los servicios de neurología, anestesiología, ginecología y obstetricia y perinatología realizar cesárea segmentaria y esterilización quirúrgica, llevándose a cabo a las 36 semanas de gestación sin complicaciones, obteniéndose dos recién nacidos vivos aparentemente sanos, femeninos: feto 1 con peso al nacer de 1700 g, talla 40 cm, capurro 36 semanas, APGAR 8/9, feto 2: peso al nacer de 2000 g, talla 42 cm, capurro 37 y APGAR 9/9, circular de cordón irreductible.

Embarazo monocorial, biamniótico. Embarazo ectópico en 2010. Examen físico actual: Disminución de la agudeza visual y relación Venosa-Arterial (VA): 3:1, hemiparesia izquierda leve (FM: 4/5). Resonancia Magnética (RM) cerebral: Malformaciones en polígono de Willis, estenosis de carótida interna izquierda (CII) y Arteria Cerebral Media Izquierda (ACMI), ausencia de Arteria Cerebral Anterior Izquierda (ACAI), dilatación de las ramas del polígono de Willis lado derecho.

Panangiografía y angioresonancia: estenosis de vasos supraclínoideos bilaterales (imagen de humo de tabaco) (Fig. 1). Se confirma diagnóstico de enfermedad Moyamoya manteniéndose tratamiento sintomático.

Discusión

La enfermedad de Moyamoya (EM) es una patología de origen desconocido, descrita por primera vez en 1957 en Japón, por Takeuchi y Shimizu, como

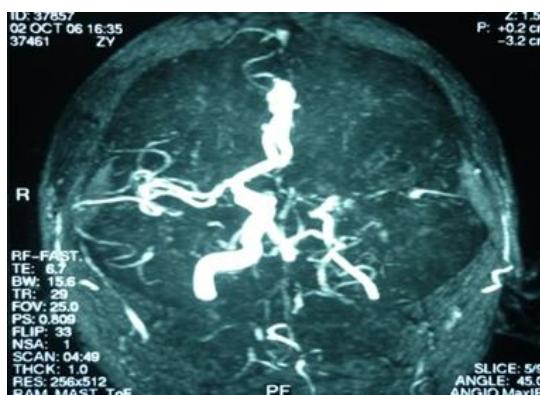


Figura 1. Angioresonancia de la paciente (Octubre de 2006).

una vasculopatía oclusiva cerebral progresiva caracterizada por estenosis u oclusión de la porción supraclinoidea de la arteria carótida interna (ACI) y más comúnmente la arteria cerebral media (ACM) y arteria cerebral anterior (ACA) (4). Los siguientes son los criterios diagnósticos de EM que fueron establecidos por el Ministerio de Salud del Japón en 1979: 1) Estenosis u oclusión de la porción intracerebral de la ACI, ACA y ACM; 2) vascularización arterial anómala alrededor de la estenosis; 3) Hallazgos bilaterales; 4) Ausencia de otra causa justificable (5).

Ésta patología se caracteriza por tener una distribución etaria bimodal, un grupo en la primera década y un segundo grupo entre los 30 y 40 años de edad (1). Durante la niñez, se caracteriza por presentarse clínicamente con episodios isquémicos cerebrales transitorios o permanentes. En adultos y, menos frecuente en niños, se manifiesta por episodios hemorrágicos con alta mortalidad. Afecta dos veces más al género femenino (5). Muchos de los pacientes femeninos con EM se encuentran en edad reproductiva, sin embargo, no ha habido revisiones extensas sobre el manejo del embarazo y el parto, asociados con dicha enfermedad. Durante el embarazo, el volumen de sangre circulante se incrementa en un 30 – 60%, del primer al segundo trimestre, en referencia con mujeres no gestantes. No existe evidencia que EM asociada con el embarazo aumente el riesgo de episodios hemorrágicos o isquémicos. No obstante, el aumento del volumen sanguíneo, el estado de hipercoagulabilidad y otras comorbilidades, pueden deteriorar el cuadro clínico durante el embarazo, por lo tanto, las pacientes que presentan la patología, deberían ser informadas de los riesgos potenciales del embarazo (6).

En relación con nuestra paciente, ésta cumple con los criterios diagnósticos de EM anteriormente

mencionados. Respecto al cuadro clínico, los hallazgos coinciden con los referidos por la literatura, con predominio del sexo femenino, inicio del cuadro con cefalea, hemiparesia y crisis focales, con generalización secundaria tónica y tónico-clónicas recurrentes, que iniciaron en la primera década de la vida.

Resulta de interés señalar la evolución clínica de la paciente, la cual inicia a los 5 años de edad, caracterizada por cefalea de fuerte intensidad, visión borrosa, disartria y hemiparesia; tratada con AINES y antiepilepticos referidos en la literatura como "tratamiento de elección farmacológico", sin observarse mejoría hasta la adolescencia.

Yanez y cols. Refieren que no existe tratamiento farmacológico para revertir o evitar la progresión del fenómeno moyamoya y que se han usado antico-agulantes, antiagregantes plaquetarios y vasodilatadores. Parte de éste tratamiento también incluye la aspirina, fundamentado en la presencia de émbolos trombóticos formados en los sitios estenóticos arteriales. En el Children's Hospital de Boston han usado heparina de bajo peso molecular, en dosis de 0,5 mg/kg dos veces al día, subcutánea, en pacientes neurológicamente inestables, que requieren anticoagulación rápidamente reversible previo a la cirugía y como vasodilatadores, se han usado los bloqueadores de los canales de calcio, especialmente en aquellos pacientes que presentan cefalea vascular de difícil manejo y como preventivo en caso de Accidentes Isquémicos Recurrentes (1).

A los 16 años de edad, presenta embarazo gemelar de alto riesgo, co-morbilidad que, según Komiyama et al, (6) no es un factor de riesgo que empeoraría el cuadro clínico, siendo esto incompatible con la clínica de nuestra paciente ya que, a partir de la semana 16 de gestación presentó crisis epilépticas focales recurrentes y cuadro de cuadriparesia que no exhibía antes de la gestación, razón por la cual se mantuvo el uso de antiepilepticos (Carbamazepina), midiendo los riesgos/beneficios de su uso durante el embarazo; aunado a esto, su clínica agrava debido al desarrollo de múltiples infecciones urinarias que conllevan a Amenaza de Parto Pretérmino (APP), a las 27 semanas de gestación, motivo por el cual amerita hospitalización. A las 33 semanas de gestación, en vista de prevalecer la clínica es nuevamente hospitalizada, se mantiene en observación con monitoreo continuo materno-fetal, útero-inhibición y anticonvulsivantes, y a la semana 36 de gestación, por presentar embarazo clínicamente a término, se decide realizar cesárea segmentaria más esterilización quirúrgica por sugerencia del servicio de Ginecología y Obstetricia en

conjunto con el servicio de Neurología. Se obtienen 2 recién nacidos vivos aparentemente sanos femenino.

Algunos autores han hecho propuestas sobre la mejor vía de culminación del embarazo en aquellas pacientes que presentan EM. Komiyama et al, (6) recomiendan el uso de cesárea segmentaria para evitar estados hipertensivos que se pueden desarrollar durante el trabajo de parto y que pueden desencadenar eventos cerebrales hemorrágicos, así como también eventos isquémicos ocasionados por la hiperventilación (6). El parto vaginal no presenta ninguna contraindicación y es utilizado como método de elección para evitar el estrés cardiovascular y sistémico que ocasiona el uso de anestésicos durante la cesárea (7). En conclusión el método a elegir siempre debe ser aquel que reduzca los riesgo tanto para la madre como para el feto, ajustándose a la clínica de ambos.

En el caso de nuestra paciente se toma la decisión de realizar cesárea segmentaria tomando en cuenta los siguientes criterios: 1) Presentar embarazo gemelar, el cual como esta descrito en la literatura, es un embarazo de alto riesgo por las complicaciones que el mismo puede ocasionar, entre ellas, preeclampsia y eclampsia, 2) Presentar crisis epilépticas focales recurrentes durante el embarazo, 3) Test de reactividad fetal hiporeactivo en feto numero 1 a la semana 36, 4) Solicitud de esterilización quirúrgica para evitar mayores complicaciones en los embarazos subsecuentes, 5) Embarazo clínicamente a término.

Los métodos imagenológicos más utilizados en la actualidad para realizar el diagnóstico de la EM son la Tomografía Axial Computarizada (TAC), la Angiografía Digital (AD) y la angioresonancia magnética nuclear (ARMN). Siendo actualmente el método de elección la ARMN ya que presenta 94% de sensibilidad y especificidad con menos efectos secundarios al no ser un método invasivo (1).

Suzuki y Takaku (1969) describieron 6 etapas evolutivas de la esteno-oclusión a través de la imagen angiográfica de la EM (5):

1. Estenosis bilateral de la ACI en su porción supraclinoides.
2. Mayor estenosis de la ACI. Moyamoya incipiente en la base del cráneo.
3. Moyamoya prominente. Desarrollo de los vasos anastomóticos. Momento del diagnóstico de la EM en la mayoría de los pacientes.
4. Compromiso de todos los vasos del polígono de Willis. Aumento de la circulación extracraneal.
5. Mayor evolución del estadio 4. Desarrollo de neovascularización extracraneal.
6. Irrigación de los hemisferios cerebrales a partir de la anastomosis intra-extra craneal.

Nuestra paciente en la actualidad se encuentra en el estadio 3 según la clasificación de Suzuki y Takaku. Diagnóstico comprobado por medios angiográficos.

Según Galicchio S. et al, la evolución natural de la EM es inevitablemente progresiva con elevada mortalidad, por lo que desde el inicio se han intentado múltiples tratamientos médicos, existiendo varias tendencias (4). Algunos autores como Doblas PA et al, sugieren que se puede mantener una terapia conservadora con tratamiento farmacológico a base de antiepilepticos, antiagregantes plaquetarios y en los casos que sea necesario, antihipertensivos o vasodilatadores (8). Sin embargo Kurokawa et al, presentaron una serie de 27 pacientes que no recibieron tratamiento quirúrgico y se mantuvieron con terapia farmacológica, de los cuales en 100% repitió AIT y el 50% presentó secuelas motoras y deterioro en las funciones cognitivas (9).

En la actualidad la tendencia terapéutica se inclina al tratamiento quirúrgico demostrándose resultados positivos importantes. Se sugiere el uso de técnicas combinadas de revascularización cerebral para desarrollar mejores resultados, disminuir las complicaciones y la progresión de la enfermedad y de esta manera proporcionar mejor calidad de vida. Se conocen dos tipos de procedimientos quirúrgicos de revascularización: directos e indirectos. Directa o bypass en donde se realiza la anastomosis de la arteria temporal superficial (ATS) con la ACM y la técnica indirecta también llamada encefaloduroarteriosinangiosis (EDAS) que consiste en la liberación de la ATS y unión al borde la incisión de la dura madre (1).

En el caso particular de nuestra paciente se ha mantenido conducta expectante con tratamiento farmacológico sintomático de las crisis epilépticas, actualmente con Difenhidantoina, Fenobarbital, Ácido Acetilsalicílico, Acetaminofén y Vitamina E en vista del bajo nivel socio económico y negativa de la paciente y familiares a la realización de tratamiento quirúrgico.

Haciendo un recuento de nuestro caso, hablamos de una paciente quien inicia sintomatología a los 5 años de edad, caracterizado por cefalea y crisis epilépticas focales con generalización secundaria tónica y tónico-clónicas; a los 16 años de edad embarazo gemelar de alto riesgo con agudización del cuadro neurológico, actualmente con 28 años de edad,

quien ha presentado hasta la actualidad en múltiples ocasiones AIT, ultima en Enero 2011 y se ha mantenido con tratamiento farmacológico sintomático hasta la fecha en vista de situación económica y negativa al tratamiento quirúrgico.

Es importante destacar que a pesar de las condiciones de nuestra paciente, con AIT a repetición y

en quien sólo se ha usado tratamiento farmacológico sintomático, ésta no ha desarrollado secuelas neurológicas y motoras que, según lo descrito en la literatura, se esperaría en aquellos pacientes en los cuales se permite la evolución natural de la enfermedad.

Referencias

1. Yañez PL, Paredes MM, Lapadula AM, Martínez TP, Duran HF, Enfermedad de Moyamoya, a propósito de dos casos. Rev Chil Pediatr 2008;79:629-35. [\[Google scholar\]](#)
2. Mineharu Y, Takenaka K, Yamakawa H, Inoue K, Ikeda H, Kikuta KI, Takagi Y, Nozaki K, Hashimoto N, Koizumi A, Inheritance pattern of familial moyamoya disease: autosomal dominant mode and genomic imprinting. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2006; 77:1025-9. [\[PubMed\]](#) [\[Google scholar\]](#)
3. Sucholeiki R, Chawla J, Moyamoya Disease. <http://reference.medscape.com/>. Marzo, 2011.
4. Galicchio S., Maza E, Jaimovich R, Arroyo HA, Enfermedad de Moya Moya. Arhc Arg Pediatr 1998; 96: 263-7. [\[Google scholar\]](#)
5. Acuña FA, O de Godoy C, Enfermedad de Moya-Moya. Pediatr (Asunción) 2010; 37: 42-7. [\[Google scholar\]](#)
6. Komiyama M, Yasui T, Kitano S, Sakamoto H, Fujitani K, Matsuo S, Moyamoya disease and pregnancy: case report and review of the literature. Neurosurgery 1998; 43: 360-9. [\[PubMed\]](#) [\[Google scholar\]](#)
7. Sun JC, Yakimov M, al-Badawi I, Honey CR, Hemorrhagic Moyamoya Disease during Pregnancy. Can J Neurol Sci 2000; 27: 73-6. [\[PubMed\]](#) [\[Google scholar\]](#)
8. Doblas PA; Barber MA; Eguiluz I; Valdivia E; Andérica JR; Aguilera I; Suárez M; Luna S; Abehsara M, Enfermedad de Moya-Moya y gestación. Clin Invest Ginecol Obstet. 2002; 29:75-8. [\[Google scholar\]](#)
9. Kurokawa T, Tomita S, Ueda K, Narasaki O, Hanai T, Hasuo K, Matsushima T, Kitamura K, Prognosis of occlusive disease of the circle of Willis (Moya Moya disease) in children. Pediatr Neurol 1985; 1: 274-7. [\[PubMed\]](#)

AVANCES EN BIOMEDICINA

Publicación Oficial del Instituto de Inmunología Clínica

Instrucciones a los autores

Se aceptan solamente artículos inéditos relacionados con cualquier aspecto de las ciencias biomédicas. Todo trabajo que se desee publicar debe enviarse a la Revista utilizando el correo electrónico: avanbiomed.idic@gmail.com, el mismo debe distribuirse en (4) archivos diferentes identificados de la siguiente manera:

- *Carta al Editor:* descripción corta del trabajo detallando el impacto de los resultados obtenidos, conflictos de interés, el tipo de artículo (Revisões, estado actual del problema, Artículos originales, Casos clínicos, Cartas al editor, Comunicaciones rápidas o novedades) y el área (Ciencias Básicas ó Clínicas).
- *Manuscrito:* compuesto por el cuerpo del trabajo en el siguiente orden: primera página con el título, autores con sus direcciones institucionales, e información del autor de correspondencia; segunda con el resumen; tercera página con el resumen en inglés; cuarta página con el cuerpo del trabajo; referencias; y la última página con las leyendas de las figuras debidamente identificadas. El trabajo puede ser publicado en idioma Inglés o Español. Debe incluir los datos del autor de correspondencia: dirección completa, número telefónico, número de fax, y correo electrónico. El Resumen y Abstract debe ser entre 250 palabras, incluyendo un máximo de 10 palabras clave.
- *Tablas:* las cuales se enumeran según orden de aparición en números arábigos, en formato sencillo (sin color). Cada una de las tablas debe tener un título breve, y si es necesario aclaratorias se deben hacer como notas al pie de página de la misma. Las unidades de medidas y estadísticas deben ser debidamente identificadas.
- *Figuras:* en formato TIFF de 200 – 300 dpi en resolución CMYK (para impresión). Cada figura ocupa una página del archivo, y la leyenda de ellas deben estar contenidas en el manuscrito.

Los documentos y las tablas deben ser enviados como archivo WORD 2003 compatible (.DOC). Las figuras deben ser enviadas como archivo POWERPOINT 2003 (.PPT). En caso de utilizar figuras, fotos o tablas de una fuente externa, debe ir acompañada de la respectiva carta de autorización de uso.

Tipos de publicación y distribución:

- *Artículo Original:* Título, Autores y Afiliaciones, Resumen, Abstract, Introducción, Metodología, Resultados, Discusión, Agradecimientos, Referencias, y Leyenda de Figuras. Título: máximo 20 palabras, en inglés y español. Número máximo de palabras del manuscrito sin referencias: 5.000. En Metodología, debe incluir una cláusula de aprobación por el comité de ética correspondiente, cuando aplique. Máximo 5 figuras y/o fotos y 2 tablas.
- *Artículo de Revisión y “estado actual del problema”:* Título, Autores y Afiliaciones, Resumen, Abstract, Manuscrito, Sumario, Agradecimientos, Referencias, y Leyenda de Figuras. Título: máximo 20 palabras en inglés y español. Número máximo de palabras del manuscrito sin referencias: 5.000. Máximo 5 figuras y/o fotos y 2 tablas.
- *Casos Clínicos:* Título, Autores, Afiliaciones, Resumen y Abstract, Introducción, Caso Clínico, Discusión, Reconocimiento, Referencias, Leyenda de Figuras. En Metodología, debe incluir una cláusula de aprobación por el comité de ética correspondiente. Título: máximo 20 palabras en inglés y español. Número máximo de palabras del

manuscrito sin referencias: 3.000. Se aceptan 2 fotos con edición de la cara del paciente (pixelado ó barra sobre los ojos).

- *Comunicaciones Rápidas:* Título, Autores y Afiliaciones, Resumen, Abstract, Introducción, Resultados, Discusión, Metodología, Agradecimientos, Referencias, y Leyenda de Figuras. Título: máximo 20 palabras en inglés y español. Número máximo de palabras del manuscrito sin referencias: 2.000. En Metodología, debe incluir una cláusula de aprobación por el comité de ética correspondiente. Máximo 3 figuras y/o fotos y 1 tablas.
- *Editorial:* manuscrito de máximo 1.000 palabras y sus referencias.

Referencias:

Las referencias bibliográficas se citan de acuerdo a orden de aparición utilizando números Arábigos entre Paréntesis, por ejemplo: (1). A la hora de escribir la referencia se utiliza el formato Vancouver tomando en consideración que se deben incluir todos los autores, y el nombre de la revista debe ser abreviado acorde con el sistema adoptado por el Index Medicus, según los ejemplos anexos:

Revistas:

1. Pettersen FO, Torheim EA, Dahm AE, Aaberge IS, Lind A, Holm M. An exploratory trial of cyclooxygenase type 2 inhibitor in HIV-1 infection. *J Virol* 2011; 85:6557-66.

Libros:

2. Berrueta L, Goncalves L, Salmen S. Respuesta inmune frente a virus, 1era Ed. Mérida: CODEARE-ULA, 2005.

Sitio web:

3. McCook A. Pre-diabetic condition linked to memory loss [internet]. 2010 [cited 2010 Apr 14]. Available from: <http://preventdisease.com/news.html>.

Sistema de arbitraje

Todos los trabajos sometidos a la Revista son enviados a arbitraje, siempre y cuando cumpla con las normas editoriales mínimas, por lo que en una primera fase los manuscritos serán revisados por el comité editorial a fin de determinar si esta dentro del alcance de la revista y cumple con las normativas de la revista. Una vez aprobado por el comité editorial será enviado a revisores externos, con experticia en el área, quienes determinaran de manera anónima, si el manuscrito es: 1) aceptado sin correcciones, 2) aceptable con correcciones menores, 3) aceptable con correcciones mayores y amerita nueva evaluación por el revisor o 4) rechazado. El arbitraje para los Trabajos Originales, Revisiones, Reporte de Casos Clínicos y Comunicaciones Rápidas es realizado por al menos dos (2) expertos en el área. Los árbitros tienen un plazo de tiempo no mayor a 15 (quince) días hábiles para enviar su respuesta. Si las opiniones de dos de los árbitros coinciden, el Comité Editorial puede aceptar la respuesta de dos árbitros; en caso de discrepancia se pueden consultar árbitros adicionales. Las opiniones de los árbitros, así como la autoría de los trabajos, son estrictamente confidenciales. Los autores reciben las opiniones completas de los árbitros consultados. La Revista da un plazo no mayor a dos (2) meses a los autores, para responder punto por punto las opiniones de los árbitros y realizar las modificaciones sugeridas; estas últimas deben ser resaltadas en el texto a fin de facilitar la evaluación de los revisores. Si éstos toman más tiempo del estipulado el trabajo es rechazado o considerado como nuevo.

Instructions for authors

The Journal will only allow original articles to be published, which have to relate with any aspect of biomedical sciences. Every research that wishes to be published first has to be sent to the magazine using the following email: avanbiomed.idic@gmail.com; the work has to be distributed in four (4) different files, as follow:

- *Letter to the editor:* short description of the article highlighting the obtained results, main points, kind of article (Review articles and state of the art, original articles, case reports, letters to the editor, Short communications, novel) and the area of research (Basics or Clinical Science)
- *Manuscript:* composed by the body work in the following order: first page with the title, authors with their institutional directions and information of correspondence of the author; second page with the abstract; third page with the abstract in Spanish, fourth page with the body work; references; and the last page with the figure legends properly identified. The article can be published in English as well as in Spanish. It must include the information of the corresponding author: complete address, phone number, fax number and email. The abstract and the Spanish abstract must have 250 words, including up to 10 keywords.
- *Tables:* which are numerated according to order of apparition in Arabic numbers, in simple layout (without color). Each one of the tables must have a proper, and if it's necessary, any commentaries must be added as a foot note of the same page. The measurement units and statistics have to be properly identified.
- *Figures:* in layout TIFF of 200 – 300 dpi on CMYK resolution (for printing). Each figure occupies one page of the file, and the legend of this must contained the manuscript.

The documents and the tables have to be sent as a file WORD 2003 compatible (.DOC). The figures must be sent as a file POWERPOINT 2003 (.PPT). In case of using figures, pictures or tables of a external source, must be accompanied by the authorization letter of use.

Types of publication and distribution:

- *Original article:* Titles, Authors and Affiliations, Abstract, Spanish Abstract, Introduction, Methodology, Results and Figure legends. Title: up to 20 words in Spanish and English. Manuscript maximum number of words without references: 5.000. In Methodology, it must include an approbation clause for the committee of correspondent ethic when it applies. Figures or pictures: Up to 5. Table: 3.
- *Review articles and state of the art:* Title, Authors and Affiliations, Abstract, Spanish Abstract, Manuscript, Summary, Acknowledgments, References and Figures legend. Title up to 20 words in Spanish and English. Manuscript maximum words without references: 5.000. Maximum of 5 figures and pictures and 2 tables.
- *Case reports:* Title, Authors, Affiliations, Summarize and Abstract, Introduction; Clinic case, Discussion, Acknowledgment, References; Figure legends. The Methodology, most include the approbation clause from the correspondent ethic committee. Title: Up to 20 words in Spanish or English. The Manuscript maximum word numbers without references: 3.000. Two (2) pictures of the patient with face edition will be accepted (pixeled or with black bars covering the eyes).

- *Short communications:* Title, Authors and Affiliations, Summarize; Abstract, Introduction, Results, Discussion; Methodology, Acknowledgement, References and Figure Legends. Title: up to 20 words in Spanish and English. The Manuscript maximum word numbers without references: 2.000. The Methodology must include an approbation clause from the correspondent ethic committee. Up to 3 figures or pictures and one table.
- *Editorial:* Manuscript maximum words: 1.000; and references.

References:

The Bibliographic references will be cited in order of apparition using Arabic numbers between parenthesis, for example: (1). The writing style should be according to the Vancouver Format having in consideration that it must include every author. The journal name should be abbreviated according to the system adopted by Index Medicus. For example

Journals:

1. Pettersen FO, Torheim EA, Dahm AE, Aaberge IS, Lind A, Holm M. An exploratory trial of cyclooxygenase type 2 inhibitor in HIV-1 infection. *J Virol* 2011; 85:6557-66.

Books:

2. Berrueta L, Goncalves L, Salmen S. Respuesta inmune frente a virus, 1era Ed. Mérida: CODEPRE-ULA, 2005.

Web site:

3. McCook A. Pre-diabetic condition linked to memory loss [internet]. 2010 [cited 2010 Apr 14]. Available from: <http://preventdisease.com/news.html>.

Arbitrage system

Every article that wishes to be published in the journal must be sent by the arbitrage and has to have the minimum editorial requirement, so that in a first phase, the manuscripts will be reviewed by the editorial committee to establish if is within the scope and fulfills with the standards of the journal. Once approved by the editorial board, the manuscript will be sent to external reviewers with expertise in the area, who anonymously determine if the manuscript is: 1) accepted without corrections, 2) acceptable with minor corrections, 3) acceptable with major corrections and warrants further evaluation by the reviewer or 4) rejected. Arbitration to the original papers, reviews, reports of clinical cases and rapid communication is performed by at least two (2) experts in the area. The arbitrage for the Original Article, Revisions for the clinical cases and fast communications will be done by at least 2 experts in the area. The arbiters will have a period of time of 15 working days to send their response. If the opinions of two of them matches, the Committee Editorial may accept the response of two arbitrators, in case of discrepancy, it may need to consult additional referees. The opinions of the referees and authorship of the work are strictly confidential. The authors will receive full views of the referees consulted. The journal will provide two (2) months for the authors to reply to the referees acknowledgement and make the suggested changes, that must be highlighted on the text in order to facilitate the assessment of the reviewers. If they take longer than stated, the work will be rejected or considered new.

Depósito Legal: PPI201102ME3935

ISSN: 2244-7881

Repositorio Institucional de la Universidad de los Andes

URL: erevistas.saber.ula.ve/index.php/biomedicina

Tabla de contenido

- 1 EDITORIAL
- 2-3 CARTAS AL EDITOR
Dificultades en la enseñanza de prácticas de sexo seguro y en la adherencia al uso del preservativo
Guillermo Terán-Angel, Nubia Silva Gutiérrez
- ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN**
- 4-8 **Purificación de fibroblastos gingivales a partir de tejido de la mucosa bucal**
Gingival fibroblast purification from oral mucose tissue
Karla Padrón, Siham Salmen, Lisbeth Berrueta, Erika González, Lorena Dávila, Joselyn Rojas, Lisbeth Sosa, Daniela Olávez, Eduvigis Solórzano
- 9-17 **Muerte celular inducida por condiciones ambientales adversas en *Calibrachoa parviflora* (Petunia)**
Cell death induced by adverse environmental conditions in Calibrachoa parviflora (Petunia)
Daniela Montes-Berrueta, Sofía Dugarte-Da Silva, Nathaly Rojas-Duque, Siham Salmen, Lisbeth Berrueta
- REVISIONES**
- 18-29 **Inflamasomes – Fighting the enemy from within**
Inflamasomas – atacando al enemigo desde adentro
Joselyn Rojas
- 30-37 **Anisakidosis, inflamación e hipersensibilidad**
Anisakidosis, inflammation and hypersensitivity
Guillermo Terán-Angel, Joselyn Rojas
- CASOS CLÍNICOS**
- 38-41 **Apósitos de quitosano para el tratamiento de pie diabético**
Chitosan films for the diabetic foot treatment
Gladys Velazco, Anajulia González, Reynaldo Ortiz
- 42-45 **Fascitis necrotizante de punto de partida abdominal: a propósito de un caso**
Necrotizing fasciitis from abdominal starting point: purpose of case
Dayyorsem Canelón, Andrea Fargier, Gustavo León, Maria A. Silva, Estrella Uzcátegui
- 46-50 **Enfermedad de Moyamoya y embarazo gemelar. Presentación de un caso y revisión de literatura**
Moyamoya disease and twin pregnancy. Case report and literature revision
Airam Amoroso, Gustavo Frontado, Hilarión Araujo, Verónica Montilla
- 51 INSTRUCCIONES A LOS AUTORES
- 52 INSTRUCTIONS FOR AUTHORS