

VOL 82 - Nº3
Mayo - Agosto de 2018
Ciudad de Bs. As. Argentina
ISSN 1515-6761 Ed. Impresa
ISSN 2250-5903 Ed. CD-ROM

Bioquímica y Patología Clínica



Alexander Fleming
Compartió con Florey y Chain el premio Nobel por el
“descubrimiento de la penicilina y su efecto curativo
sobre las enfermedades infecciosas” en 1945.

Revista de la Asociación Bioquímica Argentina.
Publicación cuatrimestral.



Bioquímica y Patología Clínica

Revista de la Asociación Bioquímica Argentina

SUMARIO

- Pág. 11 **Editorial**
La Bioquímica, expansión sin límites
Dra. Silvia B. González
Presidente Asociación Bioquímica Argentina (ABA)
- Pág. 12 **Nueva prueba diagnóstica para autoanticuerpos en Miastenia Gravis basado en un sistema de micropartículas fluorescentes libre de células**
Paz, Mariela Laura; Manuelli, Paula Natalia; González Maglio, Daniel Horacio; Aguirre, Florencia; Villa, Andrés; Leoni, Juliana; Barrantes, Francisco José.
- Pág. 18 **Factores de riesgo cardiometabólico en embarazadas, niños y adolescentes**
Ponce, Graciela Mabel; García, Jorge Alberto; Quezada, Andrés Orlando; Rodríguez, María Alejandra.
- Pág. 22 **Western blot parcialmente desnaturalizante de Transtirretina en plasmas de portadores de la mutación V30M**
Cardini, Juan; Sáez, María Soledad; Llanos, Macarena; Sorroche, Patricia Beatriz; Lorenzón, María Victoria; Ainda, Maximiliano; Grigera, Pablo Rafael.
- Pág. 28 **Sífilis: situación entre los años 2014 y 2018 en un hospital de la ciudad de La Plata**
Copparoni, Guido; González, Julieta Anahí; Zubillaga, Marina Yael, Rivera, Amelia Juliana; Farah Azul; Ferranti Samantha; Guzzetti Pilar; Bernal, Natalia Elisabet; Goñi, Silvia Inés; Marcuzzo, Graciela Dina; Etchegoyen, María Cecilia.
- Pág. 34 **Biotecnología aplicada a la salud: el caso de la Esclerosis Múltiple. PARTE 1**
Báez, Francisco; Cardini Rocca, Juan Martín; Ferrari, Irina Jazmín; Llanos, Macarena; Elías, María José ina; Sterin Prynch, Aída Edith.
- Pág. 43 **Cronograma de Cursos 2019**

Bioquímica y Patología Clínica

REVISTA DE LA ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA

Venezuela 1823 - Piso 3 - CP (1096)
Buenos Aires - Argentina
Tel/ fax: 4384-7415 / Tel: 4381-2907
e-mail: info@aba-online.org.ar
www.aba-online.org.ar
Registro Nacional de Derechos de Autor N° 034772
Publicación cuatrimestral

COMISIÓN DE REVISTA

Director:

Dr. Fernando D. Brites

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Argentina.

Secretaria:

Dra. Fabrina Capecce

Hospital General de Niños Pedro Elizalde, Argentina.

Comité Editorial:

Dr. Orlando Gabriel Carballo

Hospital Carlos G. Durand. Hospital Italiano de Buenos Aires. Instituto Universitario,
Hospital Italiano de Buenos Aires. Argentina.

Dra. Isabel Desimone

Hospital Interzonal General de Agudos Evita de Lanús. Universidad Kennedy. Argentina.

Dr. Jaime Kovensky

Hospital Arturo U. Illia, Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires. Carrera de Medicina,
Universidad Nacional de la Matanza. Argentina.

Dr. Julián Verona

Hospital de Balcarce Dr. Felipe A. Fossati. Argentina.

Correctoras:

Lic. Inés Carozza (Castellano)

Lic. María Victoria González Eusevi (Inglés)

Secretarios Administrativos:

Sr. Gastón Goldberg

Sr. Jorge Signorelli

ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA - Fundada el 3 de septiembre de 1934

COMISION DIRECTIVA

Presidente: Dra. Silvia B. González

Vicepresidente: Dra. Patricia Otero

Secretaria: Dra. Viviana Osta

Tesorera: Dra. Isabel Desimone

1º Vocal Titular: Dr. Orlando G. Carballo

2º Vocal Titular: Dr. Alberto Villagra

3º Vocal Titular: Dra. María José Rial

1º Vocal Suplente: Dra. María Rugiero

2º Vocal Suplente: Dr. Eduardo Mormandi

3º Vocal Suplente: Dr. Santiago Fares Taie

COMISION REVISORA DE CUENTAS

Titular 1º: Dra. Silvia Morilla

Titular 2º: Dra. Estella Meyer

Titular 3º: Dra. Silvia Cajiao

1º Vocal Suplente: Dra. Graciela Astarita

2º Vocal Suplente: Dra. Claudia Ayuso

COMISIONES INTERNAS

PRENSA Y DIFUSIÓN

Presidente: Dra. Laura Colitto

Secretario: Dr. Santiago Fares Taie

Vocales:

Dr. Eduardo Mormandi

CERTIFICACION

Presidente: Dr. Alberto Villagra

Secretario: Dra. Viviana Osta

Vocales:

Dra. María José Rial

CURSOS

Presidente: Dra. Silvia González

Secretaria: Dra. María Soledad Caldirola

Vocales:

Dra. María de la Paz Domínguez

Dra. Liliana Maggi

Dra. María José Rial

Dra. Alejandra Svartz

Dra. Marysia Szefer

COMITÉ CIENTÍFICO ASESOR

Dra. Mónica Aixalá

Dr. Gloria Alvarez

Dra. Liliana Arias

Dra. Alicia Blanco

Dr. Orlando Gabriel Carballo

Dra. Silvia González

Dr. Gabriel Migliarino

Dr. Eduardo Mormandi

Dra. Raquel Osatinsky

Dr. Jorge Rey

Dra. María José Rial

Dra. Sandra Rozental

Dra. Gabriela Santizo

Dra. Nora Slobodianik

PREMIOS Y DISTINCIONES

Dra. Alicia Blanco

Dr. Fernando Brites

Dra. Nilda Fink

Dr. Nestor Litwin

Dra. Raquel Osatinsky

REVISIÓN

Biología aplicada a la salud: el caso de la Esclerosis Múltiple. PARTE 1

Báez, Francisco; Cardini Rocca, Juan Martín; Ferrari, Irina Jazmín; Llanos, Macarena; Elías, María Jose ina; Sterin Prynck, Aída Edith.

Departamento de Bioquímica Aplicada, Instituto Universitario del Hospital Italiano, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

La revisión es un trabajo conjunto realizado para la asignatura Biotecnología del último año de Bioquímica, del Instituto Universitario del Hospital Italiano de Buenos Aires. Argentina

Dirección de correspondencia:: aida.sterin@hospitalitaliano.org.ar

Resumen

La Esclerosis Múltiple es una enfermedad crónica del sistema Nervioso Central que hasta ahora no tiene un tratamiento curativo. En esta revisión se han repasado los aportes de la biotecnología al diagnóstico, tratamiento y detección de nuevos blancos terapéuticos de esta compleja patología.

Palabras clave: Esclerosis Múltiple, sistema nervioso central, Biofármacos, terapias biológicas, biomarcadores, microbiota, trasplante de células madre hematopoyéticas.

Abstract

Multiple Sclerosis is a central nervous system chronic disease that until now has no curative treatment. In this paper, we review the contributions of biotechnology to the diagnosis, treatment and detection of new therapeutic targets of this complex pathology.

Keywords: Multiple Sclerosis, central nervous system, biopharmaceutics, biological therapy, biomarkers, microbiota, hematopoietic stem cell transplantation.

¿A que llamamos Biotecnología?

En el documento "Inventario diagnóstico de las biotecnologías en MERCOSUR y comparación con la Unión Europea / BIOTECH ALA-2005-017-350-C2" llamado "Manual de Indicadores de Biotecnología" [1], Mario Albornoz y colaboradores han considerado que "la biotecnología es un campo fuertemente transversal y heterogéneo, que implica la utilización de diferentes técnicas provenientes de distintas disciplinas y con muy variados campos de aplicación".

En dicho documento se proporcionó una definición de mucho interés que resume las propuestas de la OTA-USA (1981), la Organización para la Comercialización y Desarrollo Económico OCDE (OECD por sus siglas en inglés) (1982) y la CEPA-Canadá (1985), según la cual "la biotecnología es la aplicación de la ciencia y la ingeniería al uso, directo o indirecto, de organismos vivos (o parte de ellos), en sus formas naturales o modificadas, de una forma innovadora, para la producción de bienes y servicios o para la mejora de procesos industriales existentes. Incluye la implementación de varias herramientas modernas surgidas de la genética, la bioquímica, la inmuoquímica, la ingeniería química, como las tecnologías de ADN recombinante entre otras tecnologías de bioprocesamiento".

Da Silva[2] clasifica las distintas aplicaciones que fueron surgiendo en relación a la biotecnología, en distintos colores (Figura 1).

Cabe señalar que, a partir de 1953, con la definición de la estructura del ADN, en relativamente poco tiempo; se sucedieron avances tecnológicos que, convergiendo con el desarrollo de las ciencias biológicas, permitieron la emergencia de la biotecnología con un importante potencial disruptivo en muchos aspectos. Estas tecnologías aplicadas a la salud determinaron avances invaluable que se fueron transformando en herramientas estratégicas para el diagnóstico y tratamiento de patologías. Entre las herramientas más disruptivas se encuentran: la tecnología de ADN recombinante, el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa, el desarrollo de anticuerpos monoclonales, la generación de las primeras líneas de células madre embrionarias humanas, las técnicas automatizadas de secuenciación, la obtención de la secuencia completa del genoma humano, la producción de proteínas recombinantes, el desarrollo de las células madre pluripotentes inducidas, el nacimiento de la terapia celular y regenerativa, la terapia génica, el desarrollo de herramientas de diagnóstico molecular y el hallazgo de nuevos marcadores moleculares. Estos avances se han convertido en alternativas estratégicas para el diagnóstico y tratamiento de una gran variedad de enfermedades graves y crónicas que afectan la calidad de vida del paciente, en particular, para aquellas con una aproximación terapéutica compleja, como es el caso de la Esclerosis Múltiple (EM).

Figura 1. Clasificación de las distintas aplicaciones de la Biotecnología según Da Silva [2].



Tabla I. Algunos de los diferentes tipos celulares que tienen un rol necesario en el desarrollo de la fisiopatología de la enfermedad.

Tipo celular	Sub tipo celular	Son activadas/ diferenciadas por	Producen	Mecanismo de acción
Linfocitos T4	Linfocitos T CD4+ T helper 1 (Th1)	Interleuquina 12 (IL-12).	Factor de transcripción Tbet.	Tbet regula la expresión génica de Interferón gamma (IFN γ).
	Linfocitos T CD4+ T helper 17 (Th17)	Factor de Crecimiento a Transformante y las Interleuquinas IL-6, 21 o 23. B1 (TGF b1).	Factor de transcripción ROR γ t.	Regula a la expresión de Interleuquina IL-17.
	Linfocitos T CD8+ Son más abundantes que los CD4+ en las placas de enfermos con EM.		Tumor Necrosis Factor alfa (TNFalfa) e Interferón γ (IFN γ) en grandes cantidades.	TNFalfa afecta la estructura y funcionalidad de la membrana neuronal induciendo su apoptosis. IFN γ genera la muerte neuronal por neurotoxicidad.
Linfocitos B4	Linfocitos B CD20+	Moléculas antigénicas	Autoanticuerpos contra mielina y citoquinas pro inflamatorias como TNFalfa	Neuro- toxicidad Neuro- degeneración. Desmielinización.
Microglía y macrófagos⁴	Microglía	Citoquinas y productos de degradación de mielina.		Afecta la integridad de la barrera hematoencefálica y atrae macrófagos periféricos al SNC.
	Macrófagos		Moléculas con actividad neurotóxica como TNF alfa.	Neuro- degeneración.
Astroцитos⁴		Citoquinas y productos de degradación de mielina.	Cantidades importantes de CCL-2 y TNF alfa.	Promueven la actividad inflamatoria del SNC.
Oligodendrocitos⁴		Estímulos tóxicos, traumáticos e inflamatorios.	Controlan la producción y mantenimiento de la mielina en el SNC.	

Esclerosis Múltiple

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante crónica del Sistema Nervioso Central (SNC). Constituye una de las principales causas de discapacidad en la población adulta joven. Si bien su etiología es aún incierta, en su patogénesis estaría involucrada una compleja interacción entre factores ambientales y genéticos no dilucidados completamente [3].

Su histopatología clásicamente muestra una infiltración perivascular de células del sistema inmunológico a través de la barrera hemato-encefálica. Estas células invaden el parénquima encefálico y provocan desmielinización mediante la destrucción directa de la mielina, activando una reacción inflamatoria local mediada por la microglía residente, o causando la apoptosis oligodendrocitaria por mecanismos tóxicos locales [4] (Tabla I).

Fármacos utilizados para el tratamiento de la Esclerosis Múltiple

Los fármacos que se utilizan para el tratamiento de EM se resumen en la tabla II. En general, tienen un efecto principalmente antiinflamatorio y son más efectivos en la etapa temprana de la enfermedad [5].

De los fármacos descritos como tratamiento para la EM en la Tabla II, cinco (interferon beta, natalizumab, alemtuzumab, daclizumab, ocrelizumab) [16] son Biofármacos [6].

Aplicaciones de herramientas biotecnológicas en el diagnóstico y tratamiento de la Esclerosis Múltiple

Biofármacos ¿Qué son y cómo se producen?

La Agencia Europea de Medicamentos (EMA/74562/2006) define Medicamento Biológico (MB) como aquél cuyo principio

Tabla II. Principales fármacos utilizados para el tratamiento de la Esclerosis Múltiple.

FÁRMACO
• INTERFERON BETA (aprobado en 1993-1996) ¹
• ACETATO DE GLATIMARER (aprobado en 1996) ²
• MITOXANTRONA (Aprobado en 2000) ³
• NATALIZUMAB (Aprobado en 2004) ⁴
• FINGOLIMOD (Aprobado en 2010) ⁵
• TERIFLUNOMIDA (Aprobado en 2012) ⁶
• DIMETIL FUMARATO (Aprobado en 2013) ⁷
• ALEMTUZUMAB (aprobado en 2014) ⁸
• DACLIZUMAB (aprobado en 2016) ⁹
• OCRELIZUMAB (aprobado en 2017) ¹⁰

él. Los Medicamentos Biotecnológicos son aquellos MB producidos por técnicas de ADN recombinante o tecnología de hibridación (anticuerpos monoclonales). Los Medicamentos Biotecnológicos se llaman “Biofármacos” o “Productos Farmacéuticos Biotecnológicos”.

Los organismos vivos utilizados para producir el principio activo de un Biofármaco pueden ser bacterias, células de mamífero, células de insectos, levaduras, algas, plantas o animales, a los que se les transfiere, mediante técnicas de ingeniería genética, el gen que codifica para el principio activo deseado. Cada sistema biológico-productivo (organismos vivos), utilizados por la industria farmacéutica, tiene sus características particulares de costo: beneficio. (Tabla III).

Durante el desarrollo de un nuevo Biofármaco, se evalúa cuál de los sistemas biológico-productivos es el apropiado teniendo en cuenta, principalmente, las características moleculares del principio activo, por ejemplo: si la proteína nativa es glicosilada y si su glicosilación es importante para su actividad biológica in vivo, también se evalúa la cantidad de Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) necesario por dosis; los potenciales contaminantes que pueden generarse, etc.

En las tablas IV y V, se puede observar que hay una gran diferencia en la cantidad de principio activo por dosis necesaria para los distintos tratamientos de EM, esto está relacionado entre otras variables, con la actividad específica de cada proteína [actividad biológica / mg de proteína] [6].

En la tabla IV, vemos por ejemplo que el Interferón beta 1a es glicosilado, al igual que la proteína nativa, por lo tanto, el sistema óptimo de expresión son las células de mamífero (Tabla III), en cambio el Interferón beta 1b carece de glicosilación y es producido en bacterias. El hecho de que la proteína sea diferente a la nativa impacta en la actividad biológica, esto implica que es necesaria una cantidad mayor de IFA por dosis para alcanzar el mismo efecto.

Los anticuerpos monoclonales, además de ser proteínas glicosiladas, requieren concentraciones por dosis hasta 1000 veces mayores que otras proteínas recombinantes, por ejemplo, 300 mg de Natalizumab *versus* 0,30 mg de Interferón beta 1a (Tablas IV y V). Esto tiene doble implicancia, a nivel del sistema biológico - productivo, es necesario 1000 veces más cantidad de IFA para igual cantidad de dosis de producto final, a nivel fisiológico, los riesgos relacionados con la potencial inmunogenicidad del principio activo es mayor al aumentar la concentración por dosis.

Bioterapias

Dentro de las Bioterapias, se revisaron la terapia celular y los hallazgos a nivel de microbiota intestinal.

Tabla III. Comparación de sistema de expresión para la producción de Biofármacos.

CARACTERÍSTICA / HUÉSPED	BACTERIAS	LEVADURAS	INSECTOS	CEL. MAMÍFERO
Facilidad de uso				
Costos del medio y equipamiento				
Solubilidad				
Modificaciones post traduccionales				
Tiempo requerido				
Niveles de expresión				

Terapias celulares. Trasplante de Células Madre Hematopoyéticas.

Las células madre hematopoyéticas representan el 0,01 % de la población de la médula ósea y son capaces de restablecer de manera duradera la hematopoyesis después de una terapia mieloablativa, ya que pueden dar origen a todos los elementos de la sangre.

El trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) se utiliza para restablecer la función medular e inmune en pacientes con una variedad de enfermedades malignas hematológicas, enfermedades de la médula ósea no malignas adquiridas, enfermedades genéticas asociadas con una anormal hematopoyesis o alteración en la función medular, y como soporte de pacientes que reciben quimioterapia en altas dosis.

Tipos de trasplante:

- Autólogo: cuando las células provienen del mismo enfermo.
- Alogénico: es el trasplante en el que las células provienen de otro individuo sano inmunocompatible con el paciente.

Antecedentes en relación a la Esclerosis Múltiple

La potencial eficacia terapéutica de las células madre hematopoyéticas se apoya en diferentes ensayos realizados [7].

En 1995, el TCMH fue sugerido como tratamiento de la EM considerando que esta enfermedad es autoinmune y basándose en la evidencia obtenida en modelos de Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE) inducida en ratones.

El TCMH autólogo en EM se basa en usar quimioterapia para inducir inmunoblación con la subsecuente reconstitución del sistema inmune con células propias tolerantes.

En el 1997, el TCMH se utilizó en pacientes con una forma primaria progresiva de la enfermedad (EMPP) en centros euro-

peos, que comenzaron a publicar los resultados de sus ensayos clínicos con más de 15 pacientes.

En 1998 se llevó a cabo en Milán el consenso de Células Madre Hematopoyéticas (CMH) en EM y se concluyó que la eficacia del TCMH sólo podría ser determinada en un estudio multicéntrico, prospectivo, fase III, comparativo y controlado, que evalúe si existe un beneficio en contraste con las opciones terapéuticas actuales. El consenso de Italia fundó cimientos para protocolos de TCMH, con criterios precisos, descritos por Comi y colaboradores en el año 2000 "Guidelines for autologous blood and marrow stem cell transplantation in multiple sclerosis: a consensus report written on behalf of the European Group for Blood and Marrow Transplantation and the European Charcot Foundation. BMT-MS Study Group".

En 2002 se realizó un estudio multicéntrico retrospectivo, de bases de datos del European Blood and Marrow Transplant Group (EBMT) sobre 85 pacientes a los que se trató con CMH autólogas en 20 centros hospitalarios [17].

Con fundamento en este y otros estudios más pequeños, el TCMH autólogo, previa supresión del sistema inmune fue propuesto como una forma de tratamiento para estabilizar la enfermedad.

En su artículo "Hematopoietic stem cell transplantation for multiplesclerosis: ¿is it a clinical reality?", Bakhuraysah y colaboradores [17] resumen los resultados de estudios realizados por distintos investigadores de distintos países. En Rusia Shevchenko y colaboradores [8] realizaron TCMH con alta dosis de inmunosupresión en 99 pacientes, 98 mostraron estabilización neuronal después de seis meses del trasplante y mejoría en la escala de discapacidad. No se registró ninguna muerte post-trasplante. En Suecia (MS Center), Bowen y colaboradores [9]

Tabla IV. Biofármacos – proteínas recombinantes utilizados en Esclerosis Múltiple. Principales características de las proteínas recombinantes desarrolladas por técnicas biotecnológicas para el tratamiento de la EM.

Interferones (proteínas recombinantes)	
Está aprobado para el tratamiento de la Esclerosis Múltiple en sus formas recombinantes 1b y 1a.	
Interferón beta 1b	Interferón beta 1a
Blanco: Matrix metaloproteinase MMP	
Sistema productivo: se produce en bacterias <i>Escherichia coli</i>	Sistema productivo: se produce en células de mamífero: fibroblasto de células de ovario de hámster (CHO)
Característica molecular: no se encuentra glicosilado y tiene un aminoácido cambiado: una serina sustituye a una cisteína en la posición 17	Característica molecular: Está glicosilado, es muy similar al Interferón beta que se produce en el organismo en forma natural
Vía de administración: subcutánea (SC)	Vía de administración: intramuscular (IM)
Dosis: 0,250 mg / día cada dos días (0,750 mg / semana)	Dosis: 0,30 mg una vez por semana
Actividad específica: 32 millones UI/mg	Actividad específica: 200 millones UI/mg.

reportaron la eficiencia y seguridad del tratamiento afirmando que la mejora en la calidad de vida fue notable. En Brasil, Guimarães y colaboradores [10] afirmaron que, si bien el trasplante conlleva complicaciones en el procedimiento, el impacto es positivo ya que observaron un 67 % de supervivencia libre de progresión en los tres años siguientes al trasplante y mejora en la calidad de vida. Por último, en Grecia, Fassas y colaboradores [11] analizaron un grupo de 35 pacientes, demostrando que el trasplante es una terapia útil para los casos agresivos, pero no es recomendada en la totalidad de los pacientes con EM. Registraron dos muertes por complicaciones post trasplante.

En resumen, según estos trabajos [17] con TCMH se logra:

- Evitar lesiones neuronales posteriores al trasplante.
- Mejorar la calidad de vida del paciente en comparación con el tratamiento de referencia actual (Natalizumab).
- Disminuir las infecciones por virus u hongos.
- Disminuir la autoinmunidad sin tener que erradicar la totalidad de las células hematopoyéticas del paciente.

La microbiota como blanco terapéutico

Icaza-Chávez [2013] [12] describió en su artículo “Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad” que el término microbiota hace referencia a la comunidad de microorganismos vivos residentes en un nicho ecológico determinado. La microbiota residente en el intestino humano es una de las comunidades más densamente pobladas, incluso más que el suelo, el sub-

suelo y los océanos. En el intestino grueso de los mamíferos la cifra de microorganismos se eleva a 10^{12} - 10^{14} . Este número es mayor, incluso, que el de células humanas [13]. El ecosistema microbiano del intestino (microbiota intestinal) incluye muchas especies nativas que colonizan permanentemente el tracto gastrointestinal, y una serie variable de microorganismos que sólo lo hacen de manera transitoria. Al conjunto formado por los microorganismos, sus genes y sus metabolitos se les denomina microbioma. El microbioma humano se refiere a la población total de microorganismos con sus genes y metabolitos que colonizan el cuerpo humano, incluyendo el tracto gastrointestinal, el genitourinario, la cavidad oral, la nasofaringe, el tracto respiratorio y la piel.

El Proyecto del Microbioma Humano ha identificado aproximadamente al 30 % de la microbiota intestinal [14] y, junto con el proyecto Metagenómica del Tracto Intestinal Humano en Europa y muchos otros grupos, trabaja activamente para identificar a todos los genes de la microbiota.

A las alteraciones de la microbiota intestinal y la respuesta adversa del huésped a estos cambios se le ha denominado disbiosis. La disbiosis se ha asociado con afecciones tan disímiles como el asma, las enfermedades inflamatorias crónicas, la obesidad [15].

Para determinar si la EM se encuentra asociada con el cambio de la microbiota habitual, Chen y colaboradores [16] analizaron 31 muestras de materia fecal en pacientes con EM Re-

Tabla V. Biofármacos –Inmunoterapéuticos utilizados en Esclerosis Múltiple. Principales características de los anticuerpos monoclonales desarrolladas por técnicas biotecnológicas para el tratamiento de la EM.

Anticuerpos monoclonales	
Natalizumab Blanco terapéutico: anticuerpo monoclonal dirigido contra α 4-integrina, inhibe la adherencia de los leucocitos activados al endotelio inflamado	Alemtuzumab Blanco terapéutico: anticuerpo monoclonal dirigido contra células CD52, antígeno de superficie presente en linfocitos T y B
Sistema productivo: Se produce en células de mieloma murino NS/O, que crecen en suspensión	Sistema productivo: Se produce en fibroblastos obtenidos de ovario de hamster (CHO), crecen adheridas a una superficie
Dosis: Infusión de 300 mg cada cuatro semanas	Dosis: 12 mg / día por cinco días consecutivos, y un año después 12 mg / día por tres días consecutivos
Vía de administración: Intravenosa	Vía de administración: Infusión intravenosa
Daclizumab: Blanco terapéutico: anticuerpo monoclonal dirigido a la subunidad α del receptor de la IL2	Ocrelizumab: Blanco terapéutico: anticuerpo monoclonal dirigido al antígeno CD20 presente en linfocitos B provocando citotoxicidad. Primer Biofármaco para la forma más agresiva de la enfermedad (EMPP) entre el 10 y el 15 por ciento de los casos de EM
Sistema Productivo: Se produce en células de mieloma murino NS/O, que crecen en suspensión	Sistema Productivo: Se produce en fibroblastos de obtenidos de ovario de hámster (CHO), crecen adheridas a una superficie
Dosis: 150 mg una vez por mes	Dosis: -Inicial: 300 mg (segunda dosis luego de dos semanas). -Mantenimiento: 600 mg cada 6 meses
Vía de administración: subcutánea	Vía de administración: infusión intravenosa

mitente - Recurrente (EMRR). El análisis se realizó mediante el programa IM_TORNADO que comparó los resultados obtenidos entre la microbiota de controles normales con pacientes de EM.

Se realizaron secuencias de pares de bases del genoma bacteriano (hasta 250 pares de bases) activando las secuencias finales de un fragmento de material genético. Esto permite obtener secuencias alineables y de alta calidad llamadas secuencias de extremos apareados.

Las secuencias de extremos apareados facilitan la detección de rearrreglos genómicos y elementos repetitivos en una secuencia.

Chen y colaboradores [26] describieron que en pacientes con EMRR se obtuvo una microbiota intestinal con distinta proporción de cepas bacterianas en comparación al grupo control. Los pacientes con EMRR demostraron tener al menos dos veces más *Pseudomonas*, *Pedobacter*, *Blautia*, *Dorea* y *Mycoplana* en su microbiota y al menos dos veces menos *Adlercreutzia*, *Collinsella*, *Lactobacillus* y *Parabacteroides* en comparación con el grupo control. Otro dato que encontró el estudio fue la correlación entre la microbiota intestinal y el estadio de la enfermedad, puesto que las proporciones de la microbiota son diferentes en pacientes en remisión o recidiva.

Si los datos se confirman podrían contemplarse tratamientos complementarios, como cambios en la alimentación, agregado de pre probióticos para favorecer la microbiota que se considere "normal".

Marcadores genéticos

En medicina, el término "biomarcador" refiere al indicador del estado particular de una enfermedad. Muchos se relacionan con la actividad de genes específicos que codifican las proteínas implicadas en la inflamación, o ligadas al seguimiento de la respuesta a terapias modificadoras de la enfermedad. Los genes que se expresan de manera diferente en la EM se pueden convertir en biomarcadores para diagnóstico, seguimiento o eventual tratamiento.

Wang y colaboradores [17] describieron al gen de la subfamilia 1 grupo H miembro 3 (NR1H3) como posible nuevo marcador genético relacionado con la EM; para su investigación parten de dos premisas:

- Que estudios familiares y de gemelos con EM, han demostrado la existencia de un componente genético implicado en la enfermedad.
- Que la identificación de genes y mutaciones responsables de las formas mendelianas de enfermedad proporciona una visión mecanicista de la ontología de la enfermedad.

Con estas dos premisas planteadas, la estrategia de análisis fue buscar a una familia con múltiples incidentes de EM. La familia analizada tenía tres generaciones, con datos de ADN de 9 ellos, y 5 con la enfermedad ya diagnosticadas.

La técnica elegida para el análisis fue *Exome sequencing*. Este análisis tiene la particularidad de ser una técnica de secuenciación específica hacia los exones del material genético estudiado. Esta secuenciación es un *gold estándar* a la hora de

estudiar variaciones genéticas responsables de lo que se llaman enfermedades de transmisión Mendeliana.

Según los resultados que obtuvieron, los autores describieron que se encontró una variación que se observó únicamente en los pacientes diagnosticados con EM: la NR1H3.

Se analizó una segunda familia con múltiples incidentes de EM que manifestaron la misma variación.

Datos del estudio genético

El gen NR1H3 codifica para un receptor nuclear x hepático α (LXR α) que forma un complejo con el receptor X retinoide alfa (RXRA). Esta dimerización desencadena una secuencia de señales que están involucradas en el control de la regulación de la transcripción de los genes relacionados con la homeostasis de los lípidos, inflamación e inmunidad innata. Cuando se produce la mutación pArg415Gln, (un cambio de glutamina por arginina en la posición 415 de este gen) se genera un cambio conformacional en el receptor impidiendo la dimerización. Al no producirse la dimerización no hay un control de la inflamación, ni del sistema inmune que elimine los mediadores proinflamatorios y, como consecuencia, hay una respuesta inflamatoria intensificada que daña las vainas de mielina.

Análisis transcripcional

Se mutó artificialmente Arg415Ala para ver la importancia de este residuo en el proceso de dimerización y se observó que hay una disminución de las funciones [27].

La mutación identificada provoca una disminución de ABCA1 en LXRA afectando a la transcripción y provocando una pérdida de la función.

Los pacientes con dicha mutación (incidencia de < 1 por cada 1000 pacientes), presentan una respuesta inflamatoria exacerbada en el sistema nervioso, y un proceso de remielinización de axones limitado, ya que sus genes periféricos de mielina están mal regulados, resultando en desmielinización crónica, pérdida de neuronas y la progresión de la enfermedad. Otros estudios en los que han tratado a ratas con agonistas de LXR y provocando la reversión de los síntomas clínicos, la inflamación celular y la desmielinización [27].

La conclusión de los autores es que esta mutación que desregula la transcripción está involucrada en la EM Progresiva.

El artículo de Wang y colaboradores [27] fue publicado en Junio de 2016 y generó, inmediatamente, discusión y controversia. Varios investigadores analizaron los datos publicados frente a bases de datos públicos de la Exome Aggregation Consortium (ExAC; <http://exac.broadinstitute.org>) [18] y en The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium [19] y sus conclusiones fueron que la diferencia de ésta mutación con los controles de dichas bases de datos no fue significativa, por lo tanto NR1H3 no podría considerarse un marcador ligado a la EM.

La respuesta de Wang y colaboradores [20] no se hizo esperar y en diciembre publicó un artículo en la misma revista, explicando que el abordaje comparativo que hicieron las dos instituciones fue realizado como caso-control y no puede analizarse de la misma manera cuando se trata de un estudio fami-

liar. Wang insistió en que el resultado es válido y que debe confirmarse comparando datos con otros estudios familiares.

La discusión quedó planteada como una discrepancia metodológica y durante 2017 no se profundizó; sin embargo, la controversia en cuanto a la interpretación de los resultados obtenidos, en la investigación sobre el Receptor Nuclear NR1H3 en la EM Familiar es muy interesante porque la informática y las comunicaciones permiten discusiones de resultados prácticamente en tiempo real. La importancia de los resultados amerita el seguimiento hasta que se confirmen o rechacen las diferentes hipótesis.

Conclusión

Lo que surge del análisis de los diferentes artículos, es el importante rol que tuvo y tiene la biotecnología como generador de desarrollos que aportan alternativas, tanto en la detección de nuevos blancos diagnósticos/terapéuticos, como en la búsqueda de nuevos Biofármacos que mejoren la calidad de vida de los pacientes [6].

En relación a las bioterapias como el TCMH, si bien es necesario tener los resultados de un estudio multicéntrico fase III, hay centros importantes donde investigadores experimentados han llevado a cabo ensayos clínicos con resultados prometedores en relación a la mejora en la calidad de vida de los pacientes [17].

El estudio de la microbiota digestiva, es un punto de vista diferente y atractivo. Esta tecnología ha avanzado mucho en los últimos años y es un dato que, si bien requiere el análisis de mayor cantidad de casos, no se puede dejar de tener en cuenta a la hora de tratar a un paciente [26].

En la parte 2 de este artículo se profundizará sobre las características de los Biofármacos inmunoterapéuticos, así como sobre los resultados publicados en 2017 de un estudio multicéntrico internacional fase II con 5 años de seguimiento post trasplante, con resultados alentadores, se analizará la relación entre la microbiota intestinal y el SNC y se discutirá sobre otros tipos de biomarcadores.

Los avances biotecnológicos son permanentes, por lo que es imprescindible seguir actualizando y revisando la información en el futuro.

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Marcelo Kauffman, a la Dra. Susana Llesuy, al Dr. Miguel De Cristófano, y a la Dra. Adriana Carlucci por su colaboración en la corrección de este artículo.

Referencias bibliográficas

1. Centro Redes para el Programa Biotech. Inventario de Capacidades en Biotecnología. 2007;122.
2. Dasilva EJ. The colours of biotechnology: Science, development and humankind. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2004;7(3).
3. Dyment, D.A., G.C. Ebers and ADS. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2004;3(2):104–10.
4. Quintana FJ. Inmunopatología de la Esclerosis Múltiple. *Medicina [B Aires] [Internet]*. 2014;(74):404–10. Available from: http://www.redalyc.org/pdf/106/10638613.pdf?origin=publication_detail
5. Thieman WJ, Palladino MA. Introducción a la biotecnología [Internet]. Pearson Educaci{ó}; 2010. Available from: <https://books.google.com.mx/books?id=NSnqZwEACAAJ>
6. Torkildsen O, Myhr KM, Bø L. Disease-modifying treatments for multiple sclerosis - a review of approved medications. *Eur J Neurol*. 2016;23:18–27.
7. Dhib-Jalbut S, Marks S. Interferon-β mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology*. 2010;74(SUPPL.).
8. Rizvi SA, Kim E, Moodie J. Glatiramer in the treatment of multiple sclerosis. *Int J Nanomedicine*. 2006;1(3):283–9.
9. Martinelli V, Radaelli M, Straffi L, Rodegher M, Comi G. Mitoxantrone: benefits and risks in multiple sclerosis patients. *Neurol Sci [Internet]*. 2009;30(2):167. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10072-009-0142-7>
10. Rudick RA, Stuart WH, Calabresi PA, Confavreux C, Galletta SL, Radue E-W, et al. Natalizumab plus Interferon Beta-1a for Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med [Internet]*. 2006;354(9):911–23. Available from: https://www.lib.uwo.ca/cgi-bin/ezpauthn.cgi?url=http://search.proquest.com/docview/223926144?accountid=15115%5Cnhttp://vr2pk9sx9w.search.serialssolutions.com/?ctx_ver=Z39.88-2004&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&rft_id=info:sid/ProQ:nursing&rft_val_fmt=info:ofi
11. Mitchell P, Med M, Wriedt C, Graves S, Phil D, Staples MP, et al. A Placebo-Controlled Trial of Oral Fingolimod in Relapsing Multiple Sclerosis. *Sci York*. 2009;557–68.
12. Miller AE, Wolinsky JS, Kappos L, Comi G, Freedman MS, Olsson TP, et al. Oral teriflunomide for patients with a first clinical episode suggestive of multiple sclerosis (TOPIC): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol [Internet]*. Elsevier; 2017 Jan 30;13(10):977–86. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70191-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70191-7)
13. Linker RA, Gold R. Dimethyl Fumarate for Treatment of Multiple Sclerosis: Mechanism of Action, Effectiveness, and Side Effects. *Curr Neurol Neurosci Rep [Internet]*. 2013;13(11):394. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11910-013-0394-8>
14. Coles AJ. Alemtuzumab Therapy for Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2013;10(1):29–33.
15. Kappos L, Wiendl H, Selmaj K, Arnold DL, Havrdova E, Boyko A, et al. Daclizumab HYP versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med [Internet]*. 2015;373(15):1418–28. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1501481>
16. Sorensen PS, Blinkenberg M. The potential role for ocrelizumab in the treatment of multiple sclerosis: Current evidence and future prospects. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*. 2016. p. 44–52.
17. Bakhuraysah MM, Siatskas C, Petratos S. Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis: is it a clinical reality? *Stem Cell Res Ther [Internet]*. 2016;7(0c-

- tober]:12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26772391><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4715306>
18. Shevchenko JL, Kuznetsov AN, Ionova TI, Melnichenko VY, Fedorenko DA, Kurbatova KA, et al. Long-term outcomes of autologous hematopoietic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning in multiple sclerosis: physician's and patient's perspectives. *Ann Hematol* [Internet]. 2015;(2015):1149–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25711670>
 19. Bowen JD, Kraft GH, Wundes A, Guan Q, Maravilla KR, Gooley TA, et al. Autologous hematopoietic cell transplantation following high-dose immunosuppressive therapy for advanced multiple sclerosis: Long-term results. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47(7):946–51.
 20. Guimaraes FA, Oliveira-Cardoso EA, Mastropietro AP, Voltarelli JC, Santos MA. Impact of autologous hematopoietic stem cell transplantation on the quality of life of patients with multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr* [Internet]. 2010;68(4):522–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20730303>
 21. Fassas A, Kimiskidis VK, Sakellari I, Kapinas K, Anagnostopoulos A, Tsimourou V, et al. Long-term results of stem cell transplantation for MS: A single-center experience. *Neurology*. 2011;76(12):1066–70.
 22. Icaza-Chávez ME. Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Rev Gastroenterol México* [Internet]. 2013;4(78):240–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rgmx.2013.04.004>
 23. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1998;95(12):6578–83. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.95.12.6578>
 24. NIH HMP Working Group TNHW, Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res* [Internet]. 2009;19(12):2317–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19819907><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2792171>
 25. Loh G, Blaut M. Role of commensal gut bacteria in inflammatory bowel diseases. *Gut Microbes*. 2012;3(6):544–55.
 26. Chen J, Chia N, Kalari KR, Yao JZ, Novotna M, Soldan MMP, et al. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci Rep* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;6:28484. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27346372><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4921909>
 27. Wang Z, Sadovnick AD, Traboulsee ALL, Ross JPP, Bernales CQ, Encarnacion M, et al. Nuclear Receptor NR1H3 in Familial Multiple Sclerosis. *Neuron*. 2016;90(5):948–54.
 28. Erratum: NR1H3 p.Arg415Gln Is Not Associated to Multiple Sclerosis Risk [*Neuron* (2016) 92(2) (333–335)](S0896627316306948)[10.1016/j.neuron.2016.09.052]. *Neuron*. 2016. p. 929.
 29. Minikel EV, MacArthur DG. Publicly Available Data Provide Evidence against NR1H3 R415Q Causing Multiple Sclerosis. *Neuron*. 2016;92(2):336–8.
 30. Wang Z, Sadovnick AD, Traboulsee AL, Ross JP, Bernales CQ, Encarnacion M, Yee IM, de Lemos M, Greenwood T, Lee JD, Wright G, Ross CJ, Zhang S, Song W, Vilariño-Güell C. Case-Control Studies Are Not Familial Studies. *Neuron*. 2016;92(2):339-341.