

Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas



**Volumen 9, N° 1
Año 2006**

Revista arbitrada dedicada a estudios humanos, animales y de laboratorio relacionados con la investigación biológica y clínica.

Publicada semestralmente por la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas. Caracas, República Bolivariana de Venezuela.

Dirección: Av. Ppal de Los Chorros entre transversal Alfredo Jahn y Alvarez Michaud, Qta. Colegio de Bioanalistas. Caracas, Venezuela.

ISSN: 1315-1746
Depósito Legal: pp 199202DF899
Suscrita a Lilacs, Asereme Bireme

Consejo Directivo

Editora

Dra. Ana Monzón de Orozco

Gerencia Editorial

Dr. Carlos Aponte

Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas (S.V.B.E)

Junta Directiva

Presidente

Dr. Axel Rodolfo Santiago

Dirección General

Msc María Elvira Rojas

Dirección Científica

Dr. Ana Monzón de Orozco

Dirección Administrativa

Msc Priscila Bastidas

Dirección de Proyectos y Divulgación Científica

Dr. Julio Cesar González

Comisión de Estudio de Credenciales

Lic. Ludovina Guerra de Barreto (Coordinadora)

Lic. Milagros Cárdenas

Lic. Cristina Gutiérrez

Comisión para otorgar unidades crédito

Lic. Josefina Guariguata (Coordinadora)

Lic. Graciela Maggi

Comité de Redacción

Prof. Antonio Velásquez

Lic. Eliud Marín

Lic. Gabriel González

Lic. Mery Bell Maldonado

Esp Rosa Pabón



Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

CONTENIDO

| | |
|---|-----|
| Editorial | 1 |
| Resistencia a carbapenems mediada por metalo-β-lactamasas en bacilos Gram negativos aislados de ambientes hospitalarios Torres Luis, Salazar Mariángela, Moran Alejandra, González Andreina, Sanoja Lluvia, Calvo Alberto, Rodríguez Nicolas, Chalbaud Valentina, Carias Carolina, Aguilar Fanny, Peña Caridad, Montilla Ninoska, Bolívar Arelis, R. Pedroza | 3 |
| Valor pronóstico de los niveles séricos de la Interleukina- 6 en Linfoma No Hodgkin Priva Zabner de Oziel, Claudia Galizia, Rosa Somoza, Valentina Wallis, Jean Desenne, Marina González, Antonieta Natale, Greta Acquatella, Marisela Morales, Yasmín Ordóñez, María Alejandra Torres, Ana Monzón de Orozco, Aixa Müller | 11 |
| Eficacia analgésica del clorhidrato de tramadol en el trabajo de parto José Yoel Guzmán C., María del Carmen Jorge, Blanca Sonia Guerrero Chacón, Próspero Alberto Rojas Martínez, Alexander O. Mendoza Rivas | 22 |
| Aislamiento de hongos anemófilos en un ambiente laboral hospitalario Pabón de Santiago R., Santiago A. R., Naranjo F. | 28 |
| Caracterización de la expresión y aislamiento de proteínas de choque térmico (HSP) en <i>Trypanosoma cruzi</i> Torrealba Saibel, Ferraz Sabrina, Pérez José Luis, Mosca Walter y Campos Yelitza | 32 |
| Antropometría materna y porcentaje de grasa corporal como métodos para evaluación nutricional durante el embarazo Próspero Alberto Rojas Martínez, José Yoel Guzmán Carrión, María del Carmen Jorge Álvarez, Blanca Sonia Guerrero Chacón, Marta Hurtado Pulyoza, Anna Sarracino Metròpoli, José A. López Mora | 40 |
| Valores normales de las fosfatasas alcalinas en embarazadas a las 24 y 28 semanas de gestación Guillermina Salazar de Dugarte, Pedro Faneite Antique, Francis Pineda de Molina | x46 |



Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

CONTEN

| | |
|---|----|
| Editorial | 1 |
| Carbapenems resistance mediated by metallo-beta-lactamases in Gram negatives bacilli isolated from hospital environments Torres Luis, Salazar Mariángela, Moran Alejandra, González Andreina, Sanoja Lluvia, Calvo Alberto, Rodríguez Nicolas, Chalbaud Valentina, Carías Carolina, Aguilar Fanny, Peña Caridad, Montilla Ninoska, Bolívar Arelis, R. Pedroza | 3 |
| Prognostic value of serum interleukin-6 in Non Hodgkin's Lymphoma Priva Zabner de Oziel, Claudia Galizia, Rosa Somoza, Valentina Wallis, Jean Desenne, Marina González, Antonieta Natale, Gretta Acquatella, Marisela Morales, Yasmín Ordóñez, María Alejandra Torres, Ana Monzón de Orozco, Aixa Müller | 11 |
| Analgesic efficacy of tramadol clorhidrate in active phase of labor José Yoel Guzmán C., María del Carmen Jorge, Blanca Sonia Guerrero Chacón, Próspero Alberto Rojas Martínez, Alexander O. Mendoza Rivas | 22 |
| Isolating anemophilous fungi in a hospital working environment Pabón de Santiago R., Santiago A. R., Naranjo F. | 28 |
| (HSP) Hot shock proteins isolation and expression in <i>Trypanozoma cruzi</i> Torrealba Saibel, Ferraz Sabrina, Pérez José Luis, Mosca Walter y Campos Yelitza | 32 |
| Antropometría materna y porcentaje de grasa corporal como métodos para evaluación nutricional durante el embarazo Próspero Alberto Rojas Martínez, José Yoel Guzmán Carrión, María del Carmen Jorge Álvarez, Blanca Sonia Guerrero Chacón, Marta Hurtado Pulyoza, Anna Sarracino Metrópoli, José A. López Mora | 40 |
| Normal values of phosphatases in patients between 24 and 28 weeks of pregnancy Guillermina Salazar de Dugarte, Pedro Fancite Antique, Francis Pineda de Molina | 46 |

EDITORIAL

Después de muchos años de arduo trabajo el Comité Ejecutivo de la Federación de Colegios de Bioanalistas de Venezuela, conjuntamente con la Comisión Electoral, lograron una convocatoria por parte del Consejo Nacional Electoral para realizar las elecciones gremiales correspondientes a más de nueve años de espera, tiempo en el cual las autoridades de todo el gremio de Bioanálisis mantuvieron la estructura gremial como un todo, a pesar del cansancio y agotamiento que este largo tiempo produjo en sus dirigentes.

Hoy, ya tenemos nuevas autoridades y desde esta tribuna científica queremos felicitar a todas las dirigencias gremiales electa. Sepan todas ellas que queremos que sigamos trabajando por nuestra unidad gremial por las reivindicaciones de todos los Bioanalistas, por el logro de mejores y más adecuados convenios colectivos, que logremos incentivar a todas las Escuelas de Bioanálisis del País para que tengamos postgrados en todas nuestras especialidades. De esta forma los Bioanalistas lograremos los sitios que nos corresponden en la administración Pública y Privada.

Sin lugar a dudas la Junta Directiva de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas desea agradecer profundamente a los miembros del Comité Ejecutivo de la FECOBIOVE y en especial a su Presidenta Lic. Blanca Chirinos por todo el apoyo y colaboración que tuvo para con nosotros. A los miembros del Instituto de Previsión Social del Bioanalista ya su Presidenta la Lic. María Elena Odreman, su apoyo ha sido valioso para el desarrollo logístico de nuestros Congresos y Jornadas

De igual manera agradecemos a los Miembros de la Junta Directiva del Colegio de Bioanalistas de Dto. Federal y Edo. Miranda en especial a la Lic. Ilse Martínez su Presidenta quien fue para nosotros de gran valor humano durante nuestra gestión.

Queremos felicitar a la nueva Junta Directiva de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas la cual me honro en presidir, quienes regirán los destinos de esta Sociedad durante el lapso 2006-2008, desde ya estamos a la orden de todas las autoridades gremiales recién elegidas, somos un equipo de trabajo y así hemos concebido nuestro respaldo gremial, sin egoísmo, envidias ni ideologías políticas que puedan castrar los programas científicos que nos hemos trazados desde que fuimos elegidos como Junta Directiva transitoria. Cuenten con todos y cada uno de nosotros para que nuestro gremio mantenga su posición ante la Sociedad y el País.

Axel Rodolfo Santiago
Presidente
Sociedad Venezolana
de Bioanalistas Especialistas



Resistencia a carbapenems mediada por metalo- β -lactamasas en bacilos Gram negativos aislados de ambientes hospitalarios*

Torres Luis ^{1,2}, Salazar Mariángela ¹, Moran Alejandra ¹, González Andreina ¹, Sanoja Lluvia ¹, Calvo Alberto ³, Rodríguez Nicolás ⁴, Chalbaud Valentina ⁵, Carías Carolina ⁵, Aguilar Fanny ⁶, Peña Caridad ⁷, Montilla Ninoska ⁸, Bolívar Arelis ⁹, R. Pedroza ²

RESUMEN

Los carbapenems son antibióticos que muestran una potente actividad bactericida contra bacilos Gram negativos, se unen a PBP's esenciales y además son estables ante la mayoría de β -lactamasas. En múltiples ocasiones estas drogas constituyen la única opción terapéutica. En los últimos años se ha incrementado la resistencia a estos antibióticos, por múltiples mecanismos de resistencia, siendo el de mayor importancia y relevancia la producción de carbapenemasas. Las metalo- β -lactamasas (MBLs), son carbapenemasas localizadas a nivel cromosómico y plasmídico, pertenecientes al grupo-3 de Bush, necesitan cofactores de metales (Zn^{2+}), por lo tanto su actividad es inhibida por agentes químicos quelantes como el EDTA. Debido al impacto clínico y epidemiológico que genera este mecanismo de resistencia nos planteamos detectar fenotípicamente y molecularmente la presencia de metalo- β -lactamasas en 49 bacilos Gram negativos (*P. aeruginosa* y *A. baumannii*) resistentes a carbapenems provenientes de ocho centros hospitalarios de Caracas-Venezuela. La detección de carbapenemasas se realizó mediante el test de Hodge y Masuda, la identificación de metalo- β -lactamasas se llevó a cabo mediante doble difusión del disco demostrando el efecto sinérgico que ejerce el EDTA sobre la actividad del IPM, igualmente se emplearon tiras de E-test de IPM e IPM/EDTA. Se utilizaron ensayos de PCR para la identificación de genes MBLs tipo *VIM-2*, tipo *IMP-2* e Integrones Clase I. Los tests de Hodge/Masuda evidenciaron un total de 38 (77%) cepas con actividad hidrolítica para el IPM, los ensayos fenotípicos demostraron un número de 30 (61,2%) cepas productoras de metalo- β -lactamasas. En 18 (60%) de estas cepas, se detectó la presencia de genes *bla_{oxa}* mediante ensayos de PCR. En la mayoría (94%) de estos aislados, se evidenció la presencia de integrones clase I. Estas MBLs pueden estar asociadas a ADN plasmídico y eventualmente pueden ser transferidas a otros géneros bacterianos y ser diseminadas en el ambiente hospitalario si las medidas de control y vigilancia epidemiológicas no son adecuadas.

Palabras clave: Metalo- β -lactamasas, carbapenems, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, infección hospitalaria.

Carbapenems resistance mediated by metallo-beta-lactamases in Gram negatives bacilli isolated from hospital environments

SUMMARY

The carbapenems are antibiotics that show a powerful bactericide activity against gram negative bacilli, they join essential PBP's and are stable in the presence of almost all β -lactamasas. In multiple occasions these drugs are the only therapeutic option. Over the last years, the resistance against these antibiotics has increased, this has been caused by different resistance mechanisms, from which the most important is the production of carbapenemasas. The metallo- β -lactamasas (MBLs), are carbapenemasas located at chromosomal and plasmatic level, and that belong to the Bush group-3, they need metal cofactors (Zn^{2+}), so that their activity is inhibited by chemical chelating agents like EDTA. Due to the clinical and epidemiologic impact that this resistance mechanism generates, we proposed ourselves to detect the phenotypic and molecular presence of metallo- β -lactamasas in 49 gram negative bacilli (*P. aeruginosa* and *A. baumannii*) resistant to carbapenems obtained from eight hospital centers of Caracas-Venezuela. The detection of carbapenemasas was realized by the test of Hodge and Masuda; the identification of metallo- β -lactamasas was done by the double diffusion disc showing the synergistic effect that exerts the EDTA over the IPM activity, equally we used IPM e IPM/EDTA E-test strips. We used PCR assays for the identification of MBLs genes type *VIM-2*, type *IMP-2* and class I integrons. The Hodge/Masuda tests showed a total of 38 (77%) of strains with hydrolytic activity for the IPM, the phenotypic assays resulted with 30 (61,2%) strains that produce metallo- β -lactamasas. In 18 (60%) of these strains, we detected the presence of *bla_{oxa}* genes by PCR assays. In almost all (94%) of these isolates, we evidenced the presence of class I integrons. These MBLs can be associated to plasmidic DNA and eventually can be transferred to other bacterial kinds and disseminate in hospital environments if the control and epidemiologic guidelines are not adequate.

Key words: Metallo- β -lactamasas, carbapenems, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* hospitalary infection.

* Trabajo ganador del Premio Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas otorgado en el Congreso Venezolano de Bioanálisis año 2006.

1. Cátedra de Microbiología, Escuela de Bioanálisis, UCV. 2. Sección de Biología Molecular de Agentes Infecciosos, Instituto de Medicina Experimental, UCV. Secciones de Bacteriología de los Laboratorios. 3. Policlínica Metropolitana. 4. Hospital José G. Hernández. 5. Hospital J. M. de los Ríos. 6. LAICUT. 7. Hospital de Clínica Caracas. 8. Hospital Domingo Luciani. 9. Hospital Universitario de Caracas. Itorresucv@yahoo.com, raquelpedroza@cantv.net.

Introducción

Los carbapenems son antibióticos pertenecientes a la familia de los β -lactámicos, son considerados compuestos muy activos para tratar infecciones producidas por microorganismos resistentes a la mayoría de los β -lactámicos, gracias a su estabilidad frente a β -lactamasas y a la alta capacidad de unión a las proteínas fijadoras de penicilina (1,2). La aparición e incremento de aislamientos a nivel mundial de bacilos Gram negativos resistentes a estos, constituye un problema de salud pública que cada día cobra mayor auge en los centros asistenciales, con mayor énfasis en las unidades de cuidados intensivos, debido a la presión selectiva que sufren estas cepas, aunado al grado de inmunosupresión de los pacientes, permitiéndose con esto la facilidad de crear microepidemias intrahospitalarias (3,4).

Entre los principales mecanismos de resistencia a los carbapenems se encuentran: baja permeabilidad de la membrana, pérdida de las porinas, sistemas de expulsión activa y producción de enzimas inactivantes (4). El mecanismo enzimático está representado por las carbapenemasas enzimas con capacidad de hidrolizar los carbapenems, dentro de este grupo se encuentran las carbapenemasas tipo OXA, β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) del grupo 2f y las metalo- β -lactamasas (MBLs); estas últimas son dependientes de zinc como cofactor para su actividad (3).

Las MBLs son las enzimas de mayor relevancia clínica y epidemiológica, pues generan un alto nivel de resistencia a todos los β -lactámicos excepto el aztreonam (5,6), presentan una alta mortalidad asociada a la infección, persisten en el ambiente hospitalario, y están asociadas a integrones, estructuras genéticas que permiten la captación y almacenamiento de genes de resistencia (7,8). Los cassettes génicos de resistencia asociado a integrones, pueden ser transferidos a otros géneros bacterianos, debido a que generalmente se encuentran ubicados en elementos genéticos móviles como los transposones y plásmidos conjugativos, de esta manera se garantiza el recambio génico, la transferencia de genes de resistencia y su diseminación en el ambiente hospitalario, situación que incrementa y agrava el contexto clínico y epidemiológico (7,8).

Tomando en cuenta que en nuestro país, los datos del programa de vigilancia de la resistencia antimicrobiana, evidencian un incremento progresivo en los últimos años de la resistencia a carbapenems entre diversos Bacilos Gram negativos y que de la misma manera son escasos los estudios que determinen el tipo de mecanismos de resistencia implicado en dichos aislados. En el presente trabajo nos planteamos detectar la presencia de metalo- β -lactamasas en una población de bacilos Gram negativos resistentes y con susceptibilidad intermedia a carbapenems. La caracterización fenotípica y molecular de las

cepas ensayadas, permitió conocer la existencia de los principales mecanismos de resistencia asociados a estas drogas, por otra parte, se estableció epidemiología local de los mecanismos de resistencia a dichos antibióticos, hecho que contribuye a realizar los ajustes adecuados en la metodología de detección fenotípica en el laboratorio clínico, así como la creación de registros para consumo local, nacional e internacional, lo cual permitiría alertar y atacar la problemática antes de que surjan epidemias en los centros asistenciales del país. De tal manera, que se pretende: generar información que clínicamente facilite la disminución de la presión selectiva que se ejerce con el uso de estas drogas y epidemiológicamente proporcione datos en relación a la resistencia a estos antibióticos en nuestros centros asistenciales. Cabe destacar que este es el primer trabajo realizado en Venezuela, que evidencia la presencia de genes bla_{VIM} en aislados de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

Materiales y métodos

Muestra

La muestra en estudio, estuvo conformada por 49 cepas de bacilos Gram negativos que mostraron un patrón de sensibilidad intermedia o resistencia a los carbapenems; criterios de selección tomados a partir de la CLSI en el 2005 para *Pseudomonas aeruginosa*., *Acinetobacter* spp., y Enterobacterias (9).

Estas cepas fueron aisladas en las secciones de Bacteriología de los siguientes centros asistenciales: Hospital J. M de los Ríos (JMR), Hospital General del Oeste "José Gregorio Hernández" (JGH), Policlínica Metropolitana (PM), Maternidad Concepción Palacios (MCP), Hospital Universitario de Caracas (HUC), Hospital Domingo Luciani (HDL), Hospital Clínicas Caracas (HCC), Urológico San Román (USR).

Secuencia de los iniciadores utilizados en el estudio para la detección molecular de las MBLs de las familias VIM-2, IMP-2 e Integrones de Clase I.

Determinación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana

El estudio de susceptibilidad fue realizado mediante la metodología de Kirby Bauer sugerida por la CLSI 2005, a catorce antibióticos de diferentes familias (9).

Detección de Carbapenemasas

Test de Hodge: Para la realización del test se inoculó la superficie de una placa de Agar Mueller Hinton con una cepa de *E. coli* ATCC-25922 con una turbidez de 0,5 del estándar McFarland, posteriormente se colocó una estria desde el centro a la periferia de la placa con la cepa en estudio y se dejó a temperatura ambiente durante 15 min, una vez transcurrido

este tiempo se procedió a colocar un disco de IMP con una concentración de 10 µg en el centro de la placa y se incubó a 37°C durante 24 horas. La presencia de una reducción del halo

de sensibilidad de la cepa *E. coli* ATCC-25922, es producto de la inactivación del antibiótico ejercida por la actividad hidrolítica de las carbapenemasas (15).

Tabla 1. Secuencia de los iniciadores para la tipificación de MBLs de la familia IMP-2, VIM-2 e integrones clase I.

| Nombre iniciador | Secuencia (5'→3') | Producto de amplificación | Referencia |
|------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| Eubacterial 16S ARNr plus | 5' - AAC TGG AGG AAG GTG GG AT - 3' | 371 pb | Mason, W y col, 2001(10) |
| Eubacterial 16S ARNr minus | 5' - AGG AGG TGA TCC AAC CGC A - 3' | 371 pb | Mason, W y col, 2001(10) |
| Iniciador IMP-2 plus | 5' - GTT TTA TGT GTA TGC TTC C - 3' | 678 pb | Shibata, N y col, 2003 (11) |
| Iniciador IMP-2 minus | 5' - AGC CTG TTC CCA TGT AC - 3' | 678 pb | Shibata, N y col, 2003 (11) |
| Iniciador VIM-2 plus | 5' - CCG ATG GTG TTT GGT CGT AT - 3' | 744 pb | Yatsuyanagi, J y col, 2004(12) |
| Iniciador VIM-2 minus | 5' - GAA TGC GCA GCA CCA GGA T - 3' | 744 pb | Yatsuyanagi, J y col, 2004(12) |
| Iniciador VIM-2 ^a plus | 5' - GTC TAT TTG ACC GCG TC - 3' | 270 pb | Toleman, M* y col, 2002 (13) |
| Iniciador VIM-2 ^a minus | 5' - CTA CTC AAC GAC TGA GCG - 3' | 270 pb | Toleman, M* y col, 2002 (13) |
| Iniciador In CS minus | 5' - GGC ATC CAA GCA GCA AGC - 3' | Variable | Di Conza y col, 2002 (14) |
| Iniciador In CS plus | 5' - AAG CAG ACT TGA CCT GAT - 3' | Variable | Di Conza y col, 2002 (14) |

Detección de Metalo-β-lactamasas

E-Test: Para la realización de este test se colocaron tiras impregnadas con imipenem (IMP)/ imipenem + EDTA (IMPI) en un placa de Agar Mueller Hinton inoculada con una dilución de cada cepa al 0,5 de la escala MacFarland. Se incubaron a 37°C durante 24 horas. Fue considerada la presencia de metalo-β-lactamasas cuando la relación entre la CIM IMP/ CIM IPI era = a 8 (16). Sin embargo, ciertos autores refieren que relaciones = a 5,3 deben ser tomadas en cuenta, ya que cabe la posibilidad de que la expresión de varios mecanismos de resistencia enmascare la presencia de la metaloenzima, disminuyendo la sensibilidad de la prueba (5). Estas consideraciones fueron tomadas en cuenta en nuestro estudio.

Test de EDTA de Doble difusión del disco: en una placa de Agar Mueller Hinton inoculada con una dilución de cada cepa problema al 0,5 de la escala McFarland, fueron colocados un disco de meropenem (MEM), y un disco de imipenem (IMP), entre un disco de papel filtro con una solución de EDTA al 3%, separados a una distancia de 15 mm. De la misma manera se colocó otro disco de IMP al cual se le añadió 20 µl de EDTA al 3%, se incubó a 37°C por 24 horas (16). Un resultado positivo se evidenciaba, por la presencia de un efecto sinérgico (deformación del halo de inhibición) entre el disco de EDTA 3% y alguno de los dos carbapenems o por la obtención de una diferencia = 4 mm entre los halos de inhibición del disco de IMP/EDTA y el disco IMP.

Reacción de la Cadena de Polimerasa (PCR)

El procedimiento se llevó a cabo según una modificación del protocolo de Chanawong y col (17): La reacción de amplificación fue realizada con 2,5 µl de Buffer de PCR (INVITROGEN) 2,0 µl de MgCl₂ (INVITROGEN) 1,0 µl de

desoxinucleotidos difosfato 10 Mm, 1,0 µl de cada primers, 1,0 µl de suspensión celular y 16,5 µl de mezcla Agua -Taq polimerasa (INVITROGEN).

El termociclador BIORAD gene cyler™ fue programado según los siguientes protocolos de trabajo: **IMP-2:** 1 ciclo de ruptura celular a 95°C por 4 minutos, 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 1 minuto, annealing a 55°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto y 30 segundos y 1 ciclo de extensión final a 72°C por 3 minutos. **VIM-2:** 1 ciclo de ruptura celular a 95°C por 4 minutos, treinta (30) ciclos de: desnaturalización a 94°C por 1 minuto, annealing a 55°C por 45 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto y 1 ciclo de extensión a 72°C por 1 minuto. **INTEGRONES CLASE I:** Un 1 ciclo de ruptura celular a 95°C por 10 minutos, treinta (30) ciclos de: desnaturalización a 94°C por 1 minuto, annealing a 55°C por 1 minuto y 30 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto y 1 ciclo de extensión a 72°C por 5 minutos.

Para certificar que la técnica fue realizada en las condiciones ideales se empleó un control positivo con primers universal (amplifica la subunidad 16S ARNr, región conservada en todas las bacterias, necesario para verificar la extracción del ADN), control positivo M-5129 para VIM-2, control positivo M-7017 para IMP-2 (ambos controles donados por el Dr. Marcelo Galas, Instituto Carlos Malbrán Buenos Aires Argentina) y un control positivo para integrones *E. coli* 4412 (17), control negativo *P. aeruginosa* ATCC 27853 y un control de contaminación sin DNA.

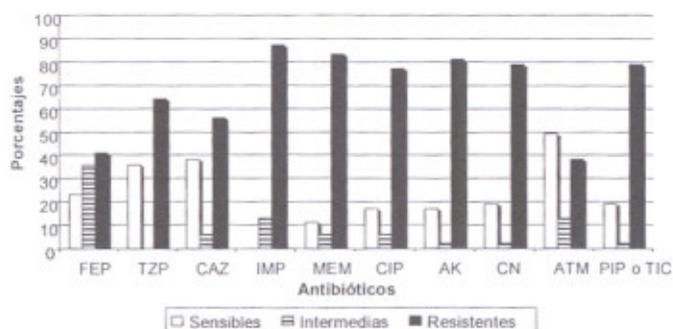
Los productos de amplificación fueron detectados en gel de agarosa al 1,2% teñido con bromuro de etidio al 0,5 µg/ml.



Resultados

Patrón de susceptibilidad antimicrobiana

P. Aeruginosa y A. baumannii



En este gráfico se puede observar el alto nivel de resistencia a múltiples antibióticos, entre la familia de los B-lactámicos, el aztreonam es la droga que presenta menor porcentaje de resistencia (38%), este resultado se correlaciona con la presencia de MBLs ya que este tipo de enzimas no hidrolizan dicha droga. De la misma manera se puede observar que para las alternativas terapéuticas amikacina, gentamicina y ciprofloxacina, los niveles de resistencia alcanzan el 80%.

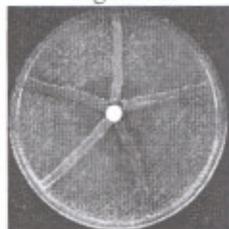
Detección fenotípica y molecular de MBLs.

En la Tabla 2 podemos observar que las metodologías realizadas para la detección fenotípica de MBLs son predictivas de la presencia de MBLs del tipo VIM-2, con excepción de tres cepas que resultaron Hodge y EDTA positiva, E-Test negativo y molecularmente presentaba MBLs de tipo VIM-2.

Tabla 2. Comparación entre los resultados del Test de Hodge, Test de EDTA al 3%, metodología por E-Test y detección molecular de MBLs del tipo VIM-2.

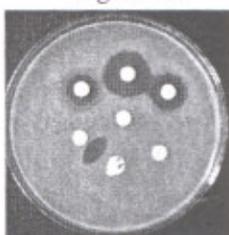
| Microorganismos analizados | Test Hodge Positivo | | Test EDTA Positivo | | E-Test Positivo | | VIM-2 Positivo | |
|----------------------------|---------------------|------|--------------------|------|-----------------|------|----------------|------|
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| <i>A. baumannii</i> | 11 | 22.4 | 05 | 10.2 | 03 | 7.5 | 3 | 6.1 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 27 | 55.1 | 25 | 51.0 | 20 | 50 | 15 | 30.6 |
| <i>Enterobacterias</i> | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 |
| Totales | 38 | 77.5 | 30 | 61.2 | 23 | 57.5 | 18 | 36.7 |

Figura 1a.



Detección de carbapenemasas mediante el test de Hodge.

Figura 1b.



Detección de MBLs mediante difusión del disco

Figura 1c.



Detección de MBLs mediante E-test

Figura 1. Detección fenotípica de Carbapenemasas y Metallo-B-lactamasas.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

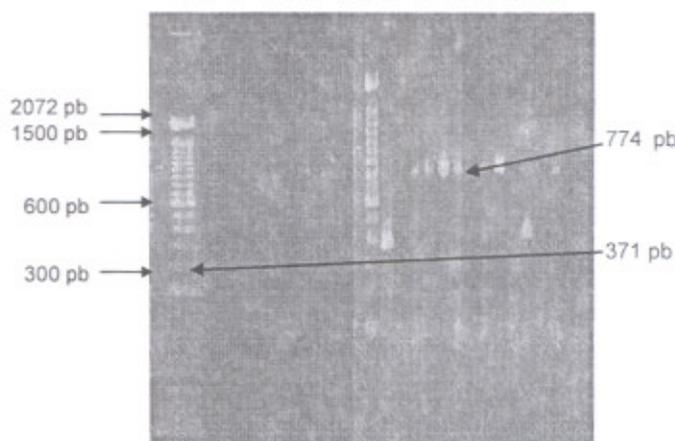


Figura 2. Detección de MBLs de la familia VIM-2 por PCR. Corrida Electroforética en gel de agarosa 1,2%. Carriles: 1) DNA ladder 100pb. 2) Control positivo Pae-M5109 (ADN bacteriano). 3) Control negativo Pae-ATCC-27853. 4) Control positivo Pae-M5109. 5) Pae-408. 6) Pae-418. 7) Pae-419. 8) Pae-5100. 9) Pae-425. 10) Pae-426. 11) Pae-429. 12) Pae-449. 13) Pae-571. 14) Control negativo (sin DNA).

Los productos de amplificación de PCR que se muestran en la Figura 2, corresponden a los resultados de la detección de MBLs de la familia VIM-2, en los cuales se observó una banda que se encuentra en el rango de 774 pb, la misma se correlaciona con el tamaño teóricamente estimado en la búsqueda de la secuencia del gen de VIM-2 en el Gen Bank, que es de 774 pb.

Detección Molecular de Integrones Clase I en aquellas Cepas Productoras de Metalo- β -Lactamasas tipo VIM-2

De las 18 cepas (60%) caracterizadas genótipicamente, que resultaron MBLs de la familia VIM-2, se encontró que 17 (94%) presentaban integrones clase I, mostrando diferentes bandas con pesos moleculares entre 250 pb y superiores a 2072 pb; destacando que en 10 cepas se observó un patrón repetido de bandas entre 1400 y 1500 pb, en 12 de ellas bandas entre 400 y 500 pb y 9 mostraron bandas con pesos moleculares elevados (entre 2000 y =2072 pb).

Tabla 3. Tipificación molecular de Integrones clase I en cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* productoras de MBLs de la familia VIM-2 aisladas de los ocho Centros Asistenciales del área Metropolitana de Caracas 2005-2006.

| Microorganismos analizados | Detección molecular de integrones clase I | | |
|----------------------------|---|--------------|-----|
| | Nº cepas totales | Nº positivos | % |
| <i>A. baumannii</i> | 3 | 2 | 67 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 15 | 15 | 100 |
| Totales | 18 | 17 | 94 |

En la corrida electroforética correspondiente a la figura 3 se muestra la migración del producto de amplificación de diferentes cepas como sigue: carril 1 marcador de peso molecular de 100 pares de base, control positivo *P. aeruginosa* M5109 con primer universal, carril 2 control negativo *P. aeruginosa* ATCC-27853 para integrones, carril 3 control positivo *E. coli* 4412 para Integrones, carriles del 4 al 18 y 19 cepas de *P. aeruginosa* respectivamente, carril 20 control negativo sin DNA y carril 21 marcador de peso molecular *fago* ϕ Hind III.

Detección Molecular de Metalo- β -Lactamasas tipo IMP-2

A partir de las 17 cepas que demostraron ser negativas para la caracterización molecular de las MBLs de la familia VIM-2, se realizó la detección de MBLs del tipo IMP-2 en donde a pesar que los controles positivos y negativos mostraron amplificación en la reacción, las cepas probadas no presentaron amplificación positiva con estos iniciadores; sin embargo esto no excluye la presencia de otras MBLs en esas cepas o la presencia de IMP-2 en las cepas productoras de VIM-2.

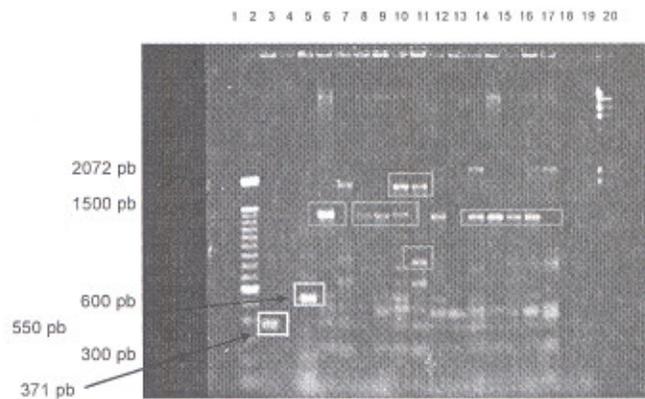


Figura 3. Detección de Integrones de clase I por PCR. Corrida Electroforética en gel de agarosa 1,2%. Carriles: 1) DNA ladder 100pb. 2) Control positivo Pae-M5109 (ADN bacteriano). 3) Control negativo Pae-ATCC-27853. 4) Control positivo E.coli 4412. 5) Pae-408. 6) Pae-415. 7) Pae-419. 8) Pae-420 9) Pae-425. 10) Pae-427. 11) Pae-426. 12) Pae-429. 13) Pae-449. 14) Pae-564. 15) Pae-571. 16) Pae-573. 17) Pae-590. 18) Pae-593. 20) Control negativo (sin DNA). 20) DNA Lambda Hind III.

Discusión

En los últimos años la aparición y diseminación de cepas multirresistentes a diversos antibióticos, en Bacilos Gram negativos, especialmente *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y en menor grado en Enterobacterias; supone un grave problema terapéutico y epidemiológico. Estos microorganismos se han convertido en los últimos años en los patógenos nosocomiales más relevantes como causantes de numerosas epidemias intrahospitalarias a nivel mundial, afectando especialmente a pacientes críticos que ingresan a las unidades de cuidados intensivos. Los carbapenems constituyen una de las mejores opciones terapéuticas por su alta eficacia para el tratamiento de estas infecciones; sin embargo, su uso indiscriminado asociado a otros factores propios del ambiente hospitalario y condiciones del paciente, han permitido la aparición de cepas resistentes a este antibiótico; permitiéndose de este modo la disminución de la eficacia terapéutica y la fácil propagación de estos microorganismos en el ambiente hospitalario.

Los resultados del Test de Hodge de la población en estudio, revela que el mecanismo enzimático es el que aparentemente prevalece, tal como se observa en diversos estudios realizados, entre ellos el realizado por el Sentry (2005), en donde se demuestra que a partir de aislamientos de bacilos Gram negativos no fermentadores (*Acinetobacter* y *Pseudomonas*) resistentes a carbapenems recolectados de varios países (6).

En relación a la detección fenotípica de MBLs mediante el Test de EDTA, se demostró que existe un alto porcentaje de resultados positivos (61,2%) en estas cepas de bacilos Gram negativos correspondiente a 30 aislamientos de un total de 49. En algunos casos la interpretación del resultado del Test de EDTA fue complicada, añadiendo el hecho de que variaciones en la preparación del disco o distancias entre los discos en la placa modifican el resultado, es por ello que se estandarizó el método de acuerdo a los ensayos realizados y las cepas controles productoras de MBLs (*P. aeruginosa* M-5129, *P. aeruginosa* M-7017), y las cepas controles no productoras de MBLs (*E. coli* ATCC- 25992 y *P. aeruginosa* ATCC-27853). Para disminuir el hecho de que la solución de EDTA pudiese interferir en el crecimiento de las cepas y distorsionar el resultado, resultó mucho más eficaz la utilización de EDTA al 3% y la alternativa del método utilizando 4 discos IMP, MEM, EDTA e IMP+EDTA; sin embargo no se pudo eliminar por completo la distorsión del resultado, causado por la inhibición competitiva del EDTA sobre otras reacciones enzimáticas en ciertas cepas ensayadas, tales como PacPM408, AbeJMR418, PacMAT433, PacHCC575; en estos casos se restó el excedente del valor (mm) del halo de EDTA al halo de IMP+EDTA (Ej. EDTA 9 mm, IMP+EDTA 15 mm, el nuevo valor de IMP+EDTA es de 12 mm).

En cuanto al E-Test, 40 de las cepas estudiadas fueron analizadas con esta metodología, encontrándose un alto porcentaje de resultados positivos tomando como punto de corte el valor de 5,33 en la relación IMP/ IMP-EDTA (5). La mayoría de los mismos se encontraron en aislados de *P. aeruginosa*, estos resultados sugieren que al obtener relaciones en el rango de 5,33 mediante la metodología de E-test, se debe tratar en la medida de lo posible de confirmar la detección mediante ensayos más sensibles, ya que en diversos casos demostramos molecularmente la presencia de genes MBLs tipo VIM en cepas cuyos puntos de corte fueron 5,33. En cuanto a las cepas de *A. baumannii* se observó que el mayor porcentaje de las cepas resultaron negativas con relaciones menores a 5,33.

En relación a la detección genotípica de MBLs encontramos que nuestra población ensayada presentó los genes para MBLs de la familia VIM-2 de acuerdo con los análisis realizados con dos iniciadores diferentes para VIM-2 (VIM-2 y VIM-2a), los cuales mostraron un 100% de reproducibilidad. En el estudio se observó que el mayor porcentaje de esta enzima se encuentra en los aislamientos de *P. aeruginosa* tal y como lo demuestran los reportes realizados por el SENTRY en el año 2005 (6), así como estudios realizados por Poirel y Nordmann en el 2002 donde señalan la detección de esta variante enzimática fundamentalmente en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* (3).

Cabe destacar que la detección de MBLs VIM-2 en las cepas de *A. baumannii* es el primer hallazgo realizado en nuestro país; en relación a esto, en Latinoamérica son escasos los reportes de MBLs de la familia VIM en *A. baumannii* (6). Sin embargo en el porcentaje correspondiente a cepas negativas para la tipificación molecular, no se puede descartar la presencia de otros miembros de MBLs dentro de las cuales sería de importancia investigar MBLs del tipo SPM-1, ya que como lo refieren ciertos estudios ha sido encontrada únicamente en Latinoamérica (Brasil) en aislamientos de *P. aeruginosa* (13), hecho que resulta de importancia epidemiológica por su cercanía geográfica con nuestro país. El estudio molecular permitió demostrar que la detección fenotípica puede predecir la presencia de MBLs, así como también que en el área Metropolitana de Caracas se encuentran cepas productoras de MBLs del tipo VIM-2 hecho que se correlaciona con el reporte realizado por el Antimicrobial Surveillance Program, en el año 2004 en tres cepas de *P. aeruginosa* Caracas-Venezuela (6), del mismo modo reafirma la diseminación de dichos clones enzimáticos en América ya que existen reportes de estas enzimas donde destacan la presencia de VIM-2 en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* en Cali-Colombia (18), Argentina y USA.

Las cepas que resultaron negativas para la detección de VIM-2 fueron caracterizadas en la búsqueda de MBLs de tipo IMP-2, selección hecha por ser este tipo de enzima la más frecuentemente encontrada después de VIM-2, así como también por la homología aminoacídica; con respecto a lo anterior no se detectaron cepas positivas, sin embargo; no puede ser descartada como se mencionó anteriormente la presencia de otro tipo de MBLs como variantes de IMP, VIM y SPM-1, entre otras en esta población, ya que existen estudios donde reflejan la presencia de VIM-7 en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* en USA (19), IMP-16 en aislamientos de *P. aeruginosa* Brasil (6), IMP-1 en cepas de *A. baumannii* en Argentina y Brasil (6), así mismo tampoco puede ser excluida la posibilidad de que la población que mostró detección genotípica positiva para VIM-2 presenten alguna de las previamente nombradas e incluso MBLs del tipo IMP-2.

La determinación genotípica de integrones clase I en las cepas portadoras de genes VIM-2 sugiere que en nuestra población, probablemente estos genes estén asociados a dichas estructuras genéticas; tal como lo señalan diversos estudios (18) donde demuestran la localización de estos genes de resistencia en MBLs de la familia VIM-2. La ubicación de estos genes, a su vez en elementos móviles como los plásmidos, facilita la expansión de estos elementos de resistencia en diversos géneros bacterianos así como su diseminación en los centros asistenciales si no son tomadas en cuenta medidas de control. La mayoría de las cepas VIM-2 positivas mostraron la presencia de varias bandas sugestivas de integrones, situación

que evidencia que las cepas portadoras de estos genes MBLs y de otros genes de resistencia, tienen la capacidad de albergar y capturar genes de resistencia a diferentes antibióticos, transferirlos mediante conjugación si los mismos están asociados a plásmidos conjugativos y diseminarlos a otros géneros bacterianos, situación que ya se está evidenciando a nivel mundial, con los recientes reportes de Enterobacterias productoras de MBLs, sin duda alguna, este panorama genera un importante reto a la terapéutica antimicrobiana actual y al laboratorio de microbiología, que debe estar en la capacidad de detectar, vigilar e informar estos mecanismos de resistencia.

En este trabajo no se detectó la presencia de MBLs en las cepas de enterobacterias estudiadas, probablemente la resistencia observada en estos aislados, se debe a la expresión de varios determinantes de resistencia, como la sobreexpresión de la B-lactamasa cromosómica AmpC y a la disminución de la permeabilidad, por pérdida de porinas (3,4,6).

En relación a las cepas positivas para MBLs del tipo VIM-2 se observó correlación para las metodologías del Test de EDTA y de E-Test, sin embargo, se encontraron tres resultados discrepantes en los cuales la relación IMP/IMP-EDTA fue menor a 5,3 mm, lo cual puede ser causado por un efecto inhibitorio producido por el EDTA o que posiblemente la expresión de la enzima se encuentre en un rango que no pueda ser detectado por dicha metodología (5), así como también cabe la probabilidad tal y como señala Sanchez y col, que la expresión de varios mecanismos de resistencia enmascare la presencia de la metaloenzima, disminuyendo la sensibilidad de la prueba (5).

A pesar de la utilidad de los test fenotípicos descritos como técnicas de uso rápido en el laboratorio de microbiología, los resultados de este estudio indican y apoyan la sugerencia de otros autores con respecto a la necesidad de realizar también detección molecular para la caracterización específica de nuevas carbapenemasas.

Conclusiones y recomendaciones

De un total de 49 cepas ensayadas en este trabajo, donde se evidenció resistencia y resistencia intermedia a carbapenems se obtuvieron los siguientes resultados:

Existe un alto porcentaje (77%) de cepas positivas para la detección fenotípica de carbapenemasas por la metodología del Test de Hodge.

El 61,2% de cepas estudiadas presentaron resultados positivos en la detección de MBLs mediante Test de EDTA.

La metodología del E-Test, la cual fue realizada a 40 de las 49

cepas estudiadas indica que el 57% son productoras de MBLs fenotípicamente.

Se obtuvo que 37% de un total de 49 cepas ensayadas presentan MBLs de la familia VIM-2 en los géneros de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*.

A partir de las cepas productoras de MBLs de la familia VIM-2 se detectó la presencia de integrones clase I, evidenciándose que el 94% de estas 18 cepas, presentan estas estructuras de almacenamiento y reservorio genético, lo cual posiblemente indique que estos integrones estén asociados a la transferencia genética de estas metaloenzimas.

Se recomienda utilizar el Test de EDTA al 3% como prueba de rutina para la detección de MBLs en el laboratorio de microbiología, pues se obtienen resultados confiables con esta metodología.

Los profesionales de la salud deben incrementar medidas de bioseguridad en los hospitales para evitar la transmisión de un paciente a otro de estas cepas, tales medidas incluyen el correcto aseado de las manos, el uso de guantes y batas desechables por paciente, entre otras cosas, pues de no ser así este problema ha de incrementarse aún más e incluso que estas cepas se diseminen a los ambientes extrahospitalarios, tal como ocurrió con las BLEE.

Referencias

- Gómez-Lus R. Caracterización de meropenem. Rev Esp Quimioter 1993; 10 (supl. 2): 3-5.
- Honorato J. Características farmacológicas del meropenem. Rev Esp Quimioter 1994; 10 (supl.): 141-2.
- Nordmann P and Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clinical Microbiology and Infection 2002; (8): 321-31.
- Livermore David M. Of Pseudomonas, porins, pumps and carbapenems. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2001; 47: 247-250.
- Sanchez A, Salso S, Culebras E, Picazo J. Resistencia a carbapenems por metaloenzimas en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Esp Quimioterap 2004; 17(4): 336-340.
- Sader H, Castanheira M, Mendes R, Toleman M, Walsh T y col. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamasas in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 2005; 57-61.
- Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo, J, et al. Characterization of VIM-2, a Carbapenem-Hydrolyzing Metallo- β -Lactamase and Its Plasmid- and Integron- Borne Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate in France. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2000; 44(4): 891-897.
- Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, et al. PCR Typing of Genetic Determinants for



- Metallo- β -Lactamases and Integrases Carried by Gram-Negative Bacteria Isolated in Japan, with Focus on the Class 3 Integron. *J Clin Microbiol* 2003; 41(12): 5407-5413.
9. Wikler M, Cockerill F. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; fifteenth informational supplements 2005; 25(1):40-42.
 10. Mason W, Blevins J, Bwnken K, Wibowo N, Ojha N, Ismeltzer M. Multiplex PCR protocols for the diagnostic of staphylococcal infectious. *Journal Clinical Microbiology* 2001. 39(9):3332-3338.
 11. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibawama K, Kato H. PCR typing of genetics determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram negative bacterial isolated in Japan with focus on the class 3 integron. 2003. *Journal of Clinical Microbiology*.41(12):5407-5413.
 12. Yatsuyanagi J, Saito S, Harata S, Suzuki N, Ito Y, Amano K. Class I integron containing metallo-beta-lactamases genes *bla_{VIM-2}* in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48(2): 626-628.
 13. Toleman M, Simm T, Gales A, Iedenbach D, Jones R, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2002; 50: 673-679.
 14. Di Conza J, Ayala J, Power P, Mollerach M, Gutkind G. (2002). Novel class I integron (InS21) carrying *bla_{CTX-M-2}* in *Salmonella enterica* serovar infantis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46, 2257-2261.
 15. Young D, Lee K, Yum J, Shin R, Rossolini G and Chong Y. Modified Hodge test and EDTA-disk synergy test to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*. 2001; 7: 88-91.
 16. Luzzaro F, Endimiani A, Docquier J, Mugnaioli C, Beonignori M, Amicosante G y col. Prevalence and Characterization of Metallo- β -lactamases and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Diagnostic Microbiology and Infectious disease* 2004; 48: 131-135.
 17. Torres L, Pedroza R, Díaz S, Hudson V, Morales L. Detección de Genes que Codifican β -Lactamasas de Espectro Extendido de los Grupos CTX-M-1 y CTX-M-2 Asociados a Integrones Clase I en Enterobacterias Aisladas en Centros Hospitalarios. Trabajo no publicado. Universidad Central de Venezuela; 2005.
 18. Villegas M, Lolans K, Olivera M, Suarez C, Correa A, Queenan A, Quinn J y the Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First Detection of Metallo- β -Lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; 50 (1): 226 - 229.
 19. Toleman M, Rolston K, Jones R. and Walsh T. *bla_{VIM-2}*, an Evolutionarily Distinct Metallo- β -Lactamase Gene in a *Pseudomonas aeruginosa* Isolate from the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48(1): 329-332.



Valor pronóstico de los niveles séricos de la Interleukina-6 en Linfoma No Hodgkin

Priva Zabner de Oziel, Claudia Galizia, Rosa Somoza, Valentina Wallis, Jean Desenne, Marina González, Antonieta Natale, Gretta Acquatella, Marisela Morales, Yasmin Ordóñez, Maria Alejandra Torres, Ana Monzón de Orozco, Aixa Müller

RESUMEN

La Interleukina-6 (IL-6) es una potente citoquina inmunomoduladora identificada como factor pronóstico en Linfoma No Hodgkin (LNH). El objetivo del trabajo fue investigar el valor pronóstico de la IL-6 en pacientes con LNH, su correlación con las características clínico-patológicas, los marcadores biológicos: lactato deshidrogenasa (LDH), Beta 2 microglobulina (B2M), Proteína C reactiva (PCR), Velocidad de sedimentación globular (VSG), Aspartato aminotransferasa (AST), Alanina amino transferasa (ALT) y Fosfatasa alcalina (FALC); el Índice Pronóstico Internacional (IPI), la evolución clínica y sobrevida. Se recolectaron muestras de suero de 61 pacientes con Linfoma No Hodgkin (LNH) antes de iniciar el tratamiento, de edad promedio 52 años (rango 19-78 años), de los cuales 46 casos (76%) se clasificaron como linfomas agresivos y 15 casos (24%) como linfomas indolentes. Según el IPI, 13 casos (21%) se categorizaron de alto riesgo y 48 (79%) de bajo riesgo. El tiempo promedio de seguimiento de la enfermedad correspondió a 30 meses (rango 3-48 meses). Se procesaron 20 muestras de controles sanos donantes del Banco de Sangre. Las muestras de los pacientes y los controles se conservaron a -70°C hasta su procesamiento. La IL-6 se determinó aplicando el método de inmunoensayo enzimático adsorbente (ELISA), sensibilidad $<0,7$ pg/ml y los marcadores biológicos: B2M, PCR, VSG, LDH, ALT, AST y FALC, por métodos de Inmunoensayo enzimático sobre micropartículas (MEIA), aglutinación directa, Wintrobe, y cinético, respectivamente. Los niveles séricos de IL-6 en los pacientes con LNH (mediana 3,03 pg/ml, rango $<0,7$ -267), fueron significativamente superiores al grupo control (mediana $<0,7$ pg/ml, rango $<0,7$ - 1,99) $p < 0,05$. Resultaron significativamente elevados en pacientes con: >2 regiones extraganglionares ($p = 0,03$), enfermedad voluminosa $>10\text{cm}$ ($p=0,04$) y niveles elevados de: LDH ($p=0,0001$), B2M ($p=0,0001$), PCR ($p=0,0001$), AST ($p=0,0001$), y VSG ($p=0,01$). Los pacientes de alto riesgo presentaron niveles de IL6 significativamente superiores al grupo de bajo riesgo ($p=0,04$). Las concentraciones de IL-6 se correlacionaron significativamente de forma lineal y directa con: síntomas B, IPI, LDH, B2M, PCR y AST ($p < 0,05$). Se detectaron niveles elevados de IL-6 ($> 1,99$ pg/ml) en el 46% de los pacientes que entraron en remisión completa, el 52% de los que entraron en remisión parcial, el 75% con progresión de enfermedad y el 63% de los fallecidos. En el grupo total de los pacientes con LNH, la sobrevida global de los pacientes con niveles elevados de IL-6 fue significativamente inferior comparada con el grupo de pacientes con niveles séricos de IL-6 normales ($p=0,007$). Los resultados obtenidos sugieren la significancia de niveles elevados de IL-6 como marcador pronóstico adverso en pacientes con LNH.

Palabras clave: Interleukina-6, Linfoma No Hodgkin, factores pronósticos.

Prognostic value of serum interleukin-6 in Non Hodgkin's Lymphoma

SUMMARY

Interleukin-6 (IL-6) is a potent immunomodulatory cytokine being identified as a prognostic factor for Non-Hodgkin's Lymphoma (NHL). The aim of this study was to investigate the prognostic value of IL-6 in patients with NHL, its correlation with the clinical - pathological - characteristics, and the biological markers: Serum Lactate Dehydrogenase (LDH), Beta 2 microglobulin (B2M), C-Reactive Protein (CRP), Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR), Serum Aspartate Transaminase (AST), Serum Alanine Transaminase (ALT), Serum Alkaline Phosphatase (ALP); the International Prognostic Index (IPI), the clinical following-up and the survival. 61 serum samples were collected from patients with NHL before starting the treatment; the mean age of the patients group was 52 years (range 19-78 years old), 46 cases (76%) were classified as aggressive lymphomas and 15 cases (24%) as indolent lymphomas. According to the IPI, 13 cases (21%) were classified as high risk group and 48 cases (79%) as low risk group. The average time of following-up was 30 months (range 3-48 months). 20 healthy control samples, coming from blood bank donors were taken. All patients and control samples were kept at -70°C until their processing. The IL-6 was determined applying the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) sensitivity < 0.7 pg/ml, and the biological markers: B2M, CRP, ESR, LDH, AST, ALT and ALP by the method of micro particle enzyme immunoassay (MEIA), direct agglutination, wintrobe and kinetic respectively. The IL-6 serum levels in the patients (median 3.03 pg/ml, range < 0.7 -267), were significantly higher than the control group (median < 0.7 pg/ml, range < 0.7 - 1.99) $p < 0.05$. The IL-6 serum concentrations resulted significantly elevated in patients with: more than 2 extranodal sites ($p=0.03$), bulky disease > 10 cm ($p=0.04$) and increased values of: LDH ($p=0.0001$), B2M ($p=0.0001$), CRP ($p=0.0001$), AST ($p=0.0001$) and ESR ($p=0.01$). The high risk patients showed up IL-6 levels significantly higher than the low risk group

Dirección: Instituto de Oncología y Hematología (IOH), U.C.V.- M.S: Unidad de Linfoma, Laboratorio de Inmunología, Laboratorio General.
Solicitar copia a: Priva Zabner de Oziel: privaoziel@hotmail.com

($p=0.04$). The IL-6 levels were significantly correlated in a linear and direct way with: B symptoms, IPI, B2M, LDH, CRP and AST ($p<0.05$). The IL-6 levels were elevated (> 1.99 pg/ml) in the following groups of patients: 46% of the patients who had a complete remission, 52% of the patients who had a partial remission response, 75% with disease progression and 63% of the non survivors. In the whole group, patients with elevated serum IL-6 levels had inferior overall survival ($p=0.007$) compared with those with normal serum IL-6 levels. Our research results suggest that IL-6 elevated levels can be helpful as a prognostic marker in NHL patients.

Key words: Interleukin-6, Non Hodgkin's Lymphoma, prognostic factors.

Introducción

Los Linfomas No Hodgkin (LNH) son un grupo heterogéneo de neoplasias linfoides que presentan una diversidad de cuadros clínicos y diferentes respuestas al tratamiento. Su incidencia ha aumentado notablemente en los últimos 30 años. En la mayoría de los casos las causas del LNH son desconocidas, aún cuando se han asociado factores de riesgo como inmunodeficiencias, agentes infecciosos, infección por VIH-SIDA, enfermedades autoinmunes, desórdenes linfoproliferativos post-transplante, alteraciones genéticas, edad, sexo, medio ambiente, exposición ocupacional, dietas y otras exposiciones (1-8).

En cuanto a la patogénesis, los LNH resultan de la expansión clonal de linfocitos B ó T que son transformados en diferentes etapas durante el proceso de diferenciación y maduración (1-4).

La aplicación de marcadores clínicos y biológicos de significancia pronóstica son útiles para el abordaje de los pacientes con LNH. En este sentido, el Índice Pronóstico Internacional (IPI) (9), comprende cinco (5) factores de riesgo: edad mayor de 60 años, estadio clínico III - IV (enfermedad avanzada), número de áreas extraganglionares > 1 , estado funcional alterado (Karnofsky $< 70\%$) y niveles elevados de lactato deshidrogenasa (LDH $> 100\%$ del valor referencial), permitiendo la categorización de los pacientes en cuatro (4) grupos de riesgo, en base al número de factores adversos: bajo riesgo (ninguno o un solo factor), riesgo intermedio bajo (dos factores), intermedio alto (tres factores) y alto riesgo (cuatro o cinco factores). Este modelo predictivo originalmente fue establecido para los LNH agresivos y posteriormente fue validado para todos los grados de malignidad, siendo útil para el diseño y selección de protocolos terapéuticos (10).

En los años subsiguientes a la publicación del IPI se han estudiado una variedad de marcadores biológicos que pudieran complementar la información aportada por el IPI. En relación a la patogénesis de los LNH, las citoquinas juegan un rol de importancia, como factor pronóstico relacionado con la respuesta del paciente frente al tumor y su respuesta inmunológica (11). Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular, producidas por linfocitos y macrófagos y actúan en forma autocrina y paracrina. Funcionan regulando las

respuestas inmune e inflamatoria, la hematopoyesis, las respuestas de fase aguda y otros procesos biológicos (12).

La Interleukina-6 (IL-6) es una potente citoquina inmunomoduladora y pleiotrópica, originalmente identificada como el factor 2 estimulante de células B, y ha mostrado tener un significado patogénico y pronóstico en LNH. Es un potente factor de crecimiento y diferenciación, producido por varios tipos celulares que incluyen linfocitos T y B normales y neoplásicos, monocitos, macrófagos, fibroblastos y hepatocitos. Estimula la secreción de reactantes de fase aguda, induce fiebre y sudoración, siendo un inductor de la síntesis de fibrinógeno hepático e inhibidor de la síntesis hepática de la albúmina y raramente es detectada o se encuentra en muy bajas concentraciones en el suero de individuos sanos. Los niveles de IL-6 se han correlacionado con el pronóstico y la sobrevida en pacientes con LNH de diferentes grados de malignidad (13-15).

En el presente estudio nos proponemos investigar el valor pronóstico de los niveles de la IL-6 en pacientes con Linfoma No Hodgkin, su correlación con las características clínico patológicas y marcadores biológicos tales como: Lactato deshidrogenasa (LDH), Beta 2 Microglobulina (B2M), Proteína C reactiva (PCR), Aspartato Amino Transferasa (AST/SGOT), Alanina Amino Transferasa (ALT/SGPT), Fosfatasa alcalina (FALC), y Velocidad de sedimentación globular (VSG), así como su relación con la evolución clínica y sobrevida de los pacientes.

Materiales y métodos

Pacientes

Se evaluaron 61 pacientes con diagnóstico de Linfoma No-Hodgkin (LNH) confirmado clínica e histopatológicamente, los cuales acudieron a la consulta de linfoma del Instituto de Oncología y Hematología U.C.V.- Ministerio de Salud, durante el período 1999 al 2004, siendo el tiempo promedio de seguimiento de la enfermedad de 30 meses (rango 3 - 48 meses). Se incluyeron pacientes sin recibir tratamiento previo y con serología VIH negativo. Se excluyeron del estudio pacientes con enfermedades asociadas tipo diabetes, insuficiencia renal y otras, con LNH previamente tratado y pacientes VIH positivo.

Los pacientes se clasificaron histopatológicamente según la

clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (16). Para la estadificación de los pacientes se aplicó el sistema de clasificación de ANN ARBOR: siendo los estadios I- II (enfermedad localizada), y estadios III- IV (enfermedad avanzada) (17). El estado funcional de los pacientes se determinó aplicando la escala de Karnofsky (18). De acuerdo al IPI se clasificaron los grupos de riesgo: bajo riesgo (favorable e intermedio bajo) y alto riesgo (intermedio alto y alto riesgo). En la práctica clínica con fines pronósticos los LNH se subdividieron en dos categorías: linfomas indolentes y agresivos.

Grupo control:

Se incluyeron 20 individuos aparentemente sanos, donantes de Banco de Sangre, para establecer los valores de referencia (VR) de la determinación de los niveles séricos de la IL-6.

Evolución clínica:

Los pacientes se trataron con esquemas de primera línea establecidos internacionalmente para los Linfomas No Hodgkin.

La evaluación clínica se consideró bajo los siguientes criterios (19):

Remisión completa (R.C.): se define como la desaparición de todas las manifestaciones clínicas y signos de la enfermedad, con normalización de las alteraciones radiológicas y de los datos bioquímicos que fueran anormales antes de iniciar la quimioterapia. Una vez finalizado el tratamiento, la respuesta se mantendrá, al menos tres meses. En caso de infiltración de la médula ósea, la desaparición de la enfermedad morfológica/histológica, deberá ir unida a normalización de las cifras hematológicas periféricas (<12 g/dl de Hb, > 100.000 plaquetas/ mm^3 y > 1.500 granulocitos/ mm^3).

Remisión Parcial (R.P > 50%): Se define como la reducción del 50% o más de la enfermedad medible durante al menos un mes. Debe haber ausencias de citopenias periféricas.

Progresión: Aumento en la frecuencia o en la severidad de los síntomas, o aparición de nuevas áreas afectadas, o progresión de más de un 25% en las localizaciones tumorales iniciales.

Sobrevida Global (S.G.): Es el tiempo transcurrido desde que se hace el diagnóstico y se inicia o no un tratamiento hasta la muerte ocasionada por la enfermedad inicial que se está evaluando o hasta la fecha del último control.

Sobrevida Libre de Enfermedad (S.L.E.): Es el tiempo transcurrido entre la fecha de RC y la nueva aparición de síntomas y signos de enfermedad (recaída).

Métodos:

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción venosa, antes de la administración del tratamiento. Para la muestra de sangre total se utilizaron tubos con anticoagulante EDTA y para la obtención del suero tubos estériles sin anticoagulante, los cuales se centrifugaron a 2500 rpm, por 10 min y se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento. Las muestras de suero de pacientes y controles se procesaron bajo las mismas condiciones.

Interleukina - 6 (IL-6):

Los niveles de IL-6 se determinaron en las muestras de suero de pacientes, estándares y controles, aplicando un ensayo inmunoabsorbente (ELISA), cuantitativo tipo sándwich (Quantikine: R&D Systems, catálogo D6050).

Se adicionaron 100 μl de las muestras, controles y estándares, a una microplaca de poliestireno de 96 pozos, presentando un anticuerpo monoclonal murino anti-IL-6 fijado a la fase sólida (anticuerpo de captura), y se incubó por dos (2) horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron cuatro (4) ciclos de lavados con solución de buffer para remover las proteínas no fijadas. Seguidamente se agregaron 200 μl de un anticuerpo policlonal anti - IL-6 conjugado con peróxidasa de rábano y se incubó por dos (2) horas. Terminado este periodo, se realizaron cuatro (4) lavados para remover el reactivo anticuerpo policlonal - enzima, no fijado al complejo antígeno- anticuerpo formado en la primera fase del ensayo. A continuación, se añadieron a los pozos 200 μl de la solución sustrato (peróxido de hidrógeno - cromógeno tetrametilbenzidina) y se incubó por 20 min a temperatura ambiente, produciéndose el desarrollo de color proporcional a la concentración de IL-6 originalmente presente en la muestra. El desarrollo de color se detuvo por la adición de 50 μl de la solución de parada (Ácido sulfúrico 2N) y la intensidad del color se cuantificó mediante un lector de microplacas a una longitud de onda de 450nm.

Nivel de sensibilidad del ensayo: 0,70 pg/ml.

LDH, AST, ALT Y FALC: Las enzimas se analizaron por métodos cinéticos UV, utilizando un Autoanalizador de química sanguínea (Hitachi modelo 704 Roche): LDH (VR: 80-285 u/l, Invelab catálogo N 89289), ALT (VR: ≤ 38 u/l, Roche catálogo 851121), AST (VR: ≤ 41 u/l, Roche catálogo 851132), FALC (VR: ≤ 290 u/l, Roche catálogo N° 816388)

PCR: Se utilizó el método semicuantitativo, prueba directa de aglutinación en placa (Wiener Lab. Lot.006531). VR: ≤ 6 mg/dl.

B2M: Se determinó mediante el método de Inmunoensayo enzimático sobre micropartículas (MEIA), sistema IMX. (Abbot, cat. N 69-2197/R11). VR: $\leq 3,4$ mg/dl.



Indicadores hematológicos: VSG por el método Wintrobe 1h, VR: 0-15 mmh.

Análisis estadístico:

Se aplicaron las pruebas estadísticas no paramétricas: Test U-Mann-Whitney para determinar las diferencias en la distribución de los marcadores entre los grupos, expresadas por la mediana y el Coeficiente de correlación de Spearman rank-sum para determinar la correlación entre los factores pronósticos. Se aplicó la prueba exacta de Fisher para el análisis de las frecuencias; las curvas de sobrevida se analizaron por el método de Kaplan – Meier y la prueba de Log-rank, para establecer la significancia estadística de los factores pronósticos.

La significancia estadística se estableció como $p = 0,05$.

Resultados:

Características clínico-patológicas y marcadores biológicos de los pacientes con LNH:

En el presente estudio se evaluaron 61 pacientes con LNH. En la Tabla 1 se muestran las características clínico- patológicas: 69% de los pacientes con edad > de 60 años (rango 19-84 años), 59% del sexo femenino, 61% correspondió al subtipo histológico linfoma difuso de células grandes tipo “B”. En relación a las categorías pronósticas el 75% correspondió a LNH agresivos y el 25% a LNH indolentes. El 56% de los pacientes presentaron enfermedad avanzada (estadio clínico III-IV), 10% estado funcional alterado, 66% con afectación extraganglionar > 1 región, 46% presentaron síntomas B, 66% enfermedad voluminosa > 10 cm. El 18% presentaron compromiso de médula ósea y el 54% enfermedad abdominal. Respecto al IPI, el 79% correspondió a LNH de bajo riesgo y el 21% de alto riesgo.

En la Tabla 2 se observan los marcadores biológicos evaluados en la población estudiada. El 15%, 21%, 13%, 13%, 18%, 41% y el 43% de los pacientes evaluados presentaron respectivamente niveles elevados de LDH, B2M, AST, ALT, FALC, PCR y VSG, en base a los valores de referencia establecidos. Se consideraron niveles elevados de LDH a los valores mayores al 100% del límite superior del valor de referencia (9).

Niveles séricos de IL-6 en controles sanos:

La distribución de los niveles séricos de IL-6 determinados en la población de controles sanos no correspondió a una distribución gaussiana, estableciéndose el rango de referencia de < 0,7 - 1,99 pg/ml, con un valor de mediana de 0,7 pg/ml. Valores de IL-6 superiores al criterio de positividad (1,99 pg/ml) se consideraron elevados.

Tabla 1. Características clínico-patológicas de los pacientes con Linfoma No Hodgkin.

| Características | | N (61) | % |
|----------------------------|------------------------------|--------|----|
| Edad | ≤60 años | 19 | 31 |
| | > 60 años | 42 | 69 |
| Sexo | Masculino | 25 | 41 |
| | Femenino | 36 | 59 |
| Clasificación histológica | Difuso de células grandes | 37 | 61 |
| | Células del manto | 1 | 1 |
| | Parecido Burkitt | 1 | 2 |
| | Células grandes anaplásica T | 3 | 5 |
| | Células T periféricas | 2 | 3 |
| | Inmunoblástico | 2 | 3 |
| | Folicular | 6 | 10 |
| | Linfocítico pequeño | 4 | 7 |
| Tipos de tumores | Tipo maltoma | 2 | 3 |
| | Micosis fungoide | 3 | 5 |
| | | | |
| Categorías | Agresivos | 46 | 75 |
| | Indolentes | 15 | 25 |
| Estadio clínico | I-II | 27 | 44 |
| | III-IV | 34 | 56 |
| Estado funcional Karnofsky | ≤ 70% | 6 | 10 |
| | > 70% | 55 | 90 |
| Enfermedad extraganglionar | ≤ 1 | 21 | 34 |
| | > 1 | 40 | 66 |
| Síntomas B | Ausente | 33 | 54 |
| | Presente | 28 | 46 |
| Enfermedad voluminosa | ≤ 10 cm | 21 | 34 |
| | > 10cm | 40 | 66 |
| Compromiso de médula ósea | Ausente | 50 | 82 |
| | Presente | 11 | 18 |
| Enfermedad abdominal | Ausente | 28 | 46 |
| | Presente | 33 | 54 |
| IPI | Bajo riesgo | 48 | 79 |
| | Alto riesgo | 13 | 21 |

IPI: Índice pronóstico internacional
 Bajo riesgo (bajo e intermedio bajo)
 Alto riesgo (intermedio alto y alto riesgo)

Niveles séricos de IL-6 en pacientes con LNH:

Los pacientes con LNH presentaron niveles de IL-6 (mediana 3,03 pg/ml, rango < 0.7-267), significativamente superiores al grupo control (mediana 0,7 pg/ml, rango <0.7-1,99) $p < 0,05$.



Tabla 2. Valores de los marcadores biológicos en pacientes con Linfoma No Hodgkin.

| Marcadores | | Nº pacientes (61) | % |
|-------------------|------------|-------------------|----|
| LDH* | ≤ 570 U/L | 52 | 85 |
| | > 570 U/L | 9 | 15 |
| B2M | ≤3,4 mg/l | 48 | 79 |
| | > 3,4 mg/l | 13 | 21 |
| AST | ≤ 38 U/L | 53 | 87 |
| | > 38 U/L | 8 | 13 |
| ALT | ≤41 U/L | 53 | 87 |
| | > 41 U/L | 8 | 13 |
| FALC | ≤ 290 U/L | 50 | 82 |
| | > 290 U/L | 11 | 18 |
| PCR | ≤ 6 mg/dl | 36 | 59 |
| | > 6 mg/dl | 25 | 41 |
| VSG | ≤ 15 mmh | 20 | 57 |
| | >15 mmh | 15 | 43 |
| Valor desconocido | | 26 | |

PCR: Proteína C Reactiva
 FALC: Fosfatasa alcalina
 B2M: Beta 2 microglobulina
 ALT: Alanina amino transferasa
 AST: Aspartato amino transferasa
 VSG: Velocidad de sedimentación globular
 LDH*: Lactato deshidrogenasa
 (100% del limite superior del valor de referencia)

De los 61 pacientes evaluados, 35 (57%) presentaron niveles séricos de IL-6 significativamente elevados (> 1,99 pg/ml) y 26 (43%) niveles indetectables o por debajo del nivel de sensibilidad del ensayo (0,70 pg/ml) p <0.05 (Tabla 3).

Tabla 3. Niveles séricos de IL-6 en pacientes con Linfoma No Hodgkin.

| Niveles séricos de IL-6 | ≤ 1,99 pg/ml | >1,99 pg/ml | p* |
|----------------------------|--------------|-------------|--------|
| No. Total de Pacientes =61 | | | |
| No. de pacientes (%) | 26 (43%) | 35 (57%) | |
| Mediana | 0,22 | 8,03 | < 0,05 |
| Rango | < 0,7 - 1,99 | <0,7 - 267 | |

*p significativa = 0,05. Prueba U-Mann-Whitney.

Asociación de niveles séricos de IL-6 con las características clínico-patológicas y los marcadores biológicos en los pacientes con LNH:

La Tabla 4 presenta la asociación de los niveles séricos de IL-6 con las características clínico – patológicas de los pacientes evaluados. Los niveles de IL-6 resultaron significativamente elevados en los pacientes que presentaron las siguientes características clínico-

patológicas: afectación de mas de 1 área extranodal (mediana 3,03 pg/ml, rango 0,7-70,8) p=0.03 y enfermedad voluminosa > de 10 cm (mediana 3,70 pg/ml, rango 3.87-267) p =0.03.

Tabla 4. Asociación de los niveles de IL-6 con las características clínico-patológicas de los pacientes con Linfoma No Hodgkin.

| Características | | N (61) | Mediana (pg/ml) | Rango | p * |
|----------------------------|-------------|--------|-----------------|-------------|------|
| Edad | ≤ 60 años | 19 | 2,72 | 1,47-74,8 | 0,81 |
| | > 60 años | 42 | 3,29 | 3,87-66,83 | |
| Estadio clínico | I-II | 27 | 1,79 | 1,68-66,8 | 0,07 |
| | III- IV | 34 | 3,60 | 0,7-267 | |
| Estado Funcional Karnofsky | ≤ 70 % | 6 | 9,64 | 23,7-66,8 | 0,15 |
| | > 70 % | 55 | 2,72 | 0,7-70,78 | |
| Enfermedad extraganglionar | ≤ 1 | 21 | 1,93 | 1,68-74,8 | 0,03 |
| | > 1 | 40 | 3,03 | 0,7-267 | |
| Enfermedad voluminosa | ≤10 cm | 21 | 1,68 | 1,47-70,7 | 0,04 |
| | > 10 cm | 40 | 3,70 | 3,87-267 | |
| Enfermedad abdominal | Ausente | 28 | 3,20 | 1,68 -267,1 | 0,80 |
| | Presente | 33 | 2,41 | 1,47 - 70,7 | |
| IPI | Bajo riesgo | 48 | 2,60 | 0,7-74,8 | 0,04 |
| | Alto riesgo | 13 | 8,03 | 3,55-267 | |
| Síntomas B | Ausente | 33 | 1,00 | 3,03-74,8 | 0,80 |
| | Presente | 28 | 7,30 | 1,68-23,7 | |
| Compromiso de medula ósea | Ausente | 50 | 3,29 | 0,7-74,8 | 0,59 |
| | Presente | 11 | 2,93 | 1,68-40,29 | |

IPI: Indice pronostico internacional
 p* significativa = 0,05. Test U-Mann-Whitney
 Bajo riesgo (bajo e intermedio bajo)
 Alto riesgo (intermedio alto y alto riesgo)

En relación a los marcadores biológicos (Tabla 5), los niveles de IL-6 se asociaron significativamente con niveles elevados de: LDH (mediana 12,61 pg/ml, rango 0,7-267) p=0,0001, B2M (mediana 9,17 pg/ml, rango 3,87-70,8) p=0,0001, PCR (mediana 8,86 rango 1,47-74,8) p=0,0001 y AST (mediana 11,30 pg/ml, rango 4,8-267) p=0,0001.



Tabla 5. Asociación de los niveles de IL-6 con las características biológicas de los pacientes con Linfoma No Hodgkin.

| Variables | | N (61) | Mediana (pg/ml) | Rango | p * |
|-------------------|------------|--------|-----------------|------------|--------|
| LDH | ≤570 U/L | 52 | 2,36 | 6,05-40,29 | 0,0001 |
| | > 570 U/L | 9 | 12,61 | 0,7-267 | |
| B2M | ≤3,4 mg/l | 48 | 1,79 | 0,7-66,8 | 0,0001 |
| | > 3,4 mg/l | 13 | 9,17 | 3,87-70,8 | |
| AST | ≤ 38 U/L | 53 | 2,05 | 1,68-74,8 | 0,0001 |
| | > 38 U/L | 8 | 11,30 | 4,8-267 | |
| ALT | ≤ 41 U/L | 53 | 2,87 | 0,7-74,8 | 0,55 |
| | > 41 U/L | 8 | 4,59 | 1,47-70,9 | |
| FALC | ≤ 290 U/L | 50 | 2,93 | 0,7-267 | 0,94 |
| | > 290 U/L | 11 | 3,03 | 3,03-74,8 | |
| PCR | ≤6 mg/dl | 36 | 0,85 | 0,7-25,1 | 0,0001 |
| | >6 mg/dl | 25 | 8,86 | 1,47-74,8 | |
| VSG | ≤ 15 mmH | 20 | 49 | 0,7-3,66 | 0,01 |
| | > 15 mmH | 15 | 25 | 0,7- 70,79 | |
| Valor desconocido | | 26 | | | |

FALC: Fosfatasa alcalina
 VSG: Velocidad de sedimentación globular
 PCR: Poteina C reactiva
 AST: Aspartato amino transferasa
 B2M: Beta 2 microglobulina
 ALT: Alanina amino transferasa
 LDH: Lactato deshidrogenasa
 (100% del limite superior del valor de referencia)
 *p significativa = 0,05. Test U-Mann-Whitney

Asociación de los niveles séricos de IL-6 con los grupos de riesgo de acuerdo al IPI:

Los niveles de IL-6 resultaron significativamente elevados en los pacientes del grupo pronóstico de alto riesgo (mediana 8,03 pg/ml, rango 3,55-267) respecto al grupo pronóstico de bajo riesgo (mediana 2,60 pg/ml, rango 0,7-74,8) p=0,04.

Correlación de los niveles de IL-6 con las características clínico-patológicas y los marcadores biológicos en pacientes con LNH:

Los niveles de IL-6 se correlacionaron con las características clínico- patológicas (Tabla 6) y con los marcadores biológicos (Tabla 7). Se observó una correlación significativa directa y lineal con los siguientes marcadores: IPI p= 0,05, síntomas B p=0,0001, LDH p= 0,02 (Figura 1), B2M p=0,0001 (Figura 2), AST p= 0,05 (Figura 3), PCR p= 0,0001 (Figura 4) y VSG p= 0,0003.

Tabla 6. Correlación de los niveles séricos de IL-6 con las características clínico-patológicas en pacientes con Linfoma No Hodgkin.

| Características | r | p* |
|----------------------------|------|--------|
| Edad | 0,07 | 0,62 |
| Estadio Clínico | 0,21 | 0,12 |
| Estado Funcional | 0,18 | 0,17 |
| Enfermedad Extraganglionar | 0,01 | 0,97 |
| Enfermedad voluminosa | 0,20 | 0,15 |
| IPI | 0,26 | 0,05 |
| Síntomas B | 0,50 | 0,0001 |
| Enfermedad Abdominal | 0,01 | 0,93 |
| Medula ósea | 0,10 | 0,46 |

IPI: Índice pronostico internacional
 p* significativa = 0,05. Coeficiente de correlación de Spearman rank-sum

Tabla 7. Correlación de los niveles séricos de IL-6 con los marcadores biológicos en pacientes con Linfoma No Hodgkin.

| Características | r | p* |
|-----------------|------|--------|
| LDH | 0,31 | 0,02 |
| B2M | 0,49 | 0,0001 |
| AST | 0,27 | 0,05 |
| ALT | 0,22 | 0,11 |
| FALC | 0,20 | 0,14 |
| PCR | 0,68 | 0,0001 |
| VSG | 0,62 | 0,0003 |

LDH : Lactato deshidrogenasa
 PCR: Proteina C Reactiva
 B2M: Beta 2 microglobulina
 VSG: Velocidad de sedimentación globular
 AST: Aspartato amino transferasa
 FALC: Fosfatasa alcalina
 ALT: Alanina amino transferasa
 p* significativa = 0,05. Coeficiente de correlación de Spearman rank-sum

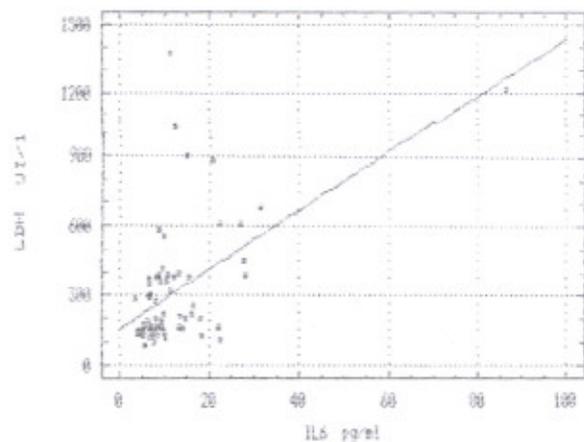


Figura 1. Correlación de los niveles séricos de IL- 6 con los niveles de LDH (r= 0,31, p= 0,02) Coeficiente de correlación Spearman rank-sum.

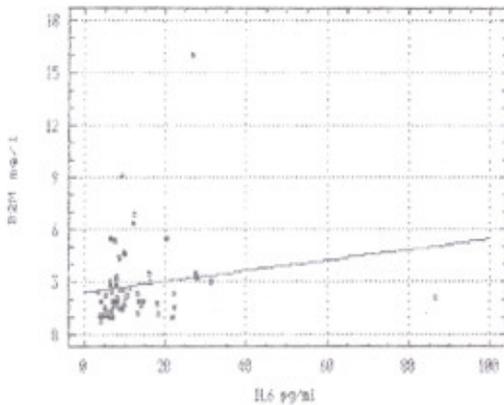


Figura 2. Correlación de los niveles séricos de IL-6 con las concentraciones de B2M ($r= 0.49, p= 0,0001$) Coeficiente de correlación Spearman rank sum.

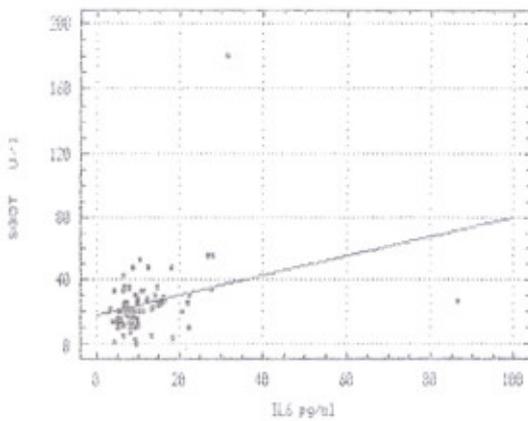


Figura 3. Correlación de los niveles séricos de IL-6 con los niveles de AST (SGOT) ($r= 0.27, p= 0,05$) Coeficiente de correlación Spearman rank sum.

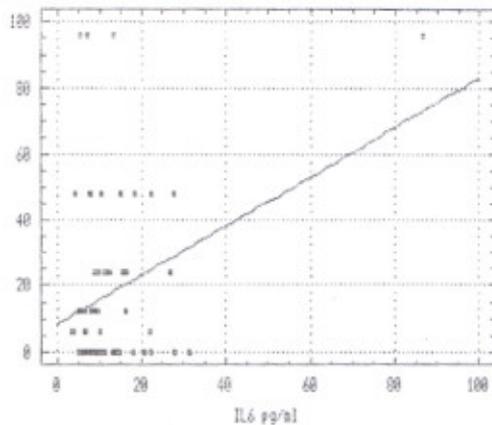


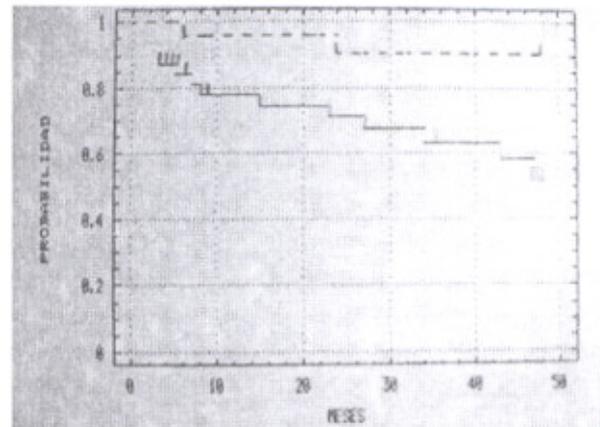
Figura 4. Correlación de los niveles séricos de IL-6 con las concentraciones de PCR ($r= 0.68, p=0,0001$) Coeficiente de correlación Spearman rank sum.

Niveles séricos de IL-6 y evolución clínica de los pacientes con LNH:

En la Tabla 8 se observan los niveles de IL-6 antes de iniciar el tratamiento. Aunque no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos, se observaron niveles elevados de IL-6 ($> 1,99$ pg/ml) en el 46% de los pacientes que entraron en remisión completa, el 52% de los pacientes que respondieron parcialmente, 75% de los pacientes con progresión de la enfermedad y el 63 % de los pacientes que fallecieron.

Análisis univariado y sobrevida

Para el análisis de la sobrevida, el tiempo promedio del seguimiento clínico fue de 30 meses (rango 3- 48 meses). En el grupo total de los pacientes evaluados, el análisis univariado de la sobrevida mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a los niveles de la IL-6. La probabilidad de la SG de los pacientes con niveles elevados de IL-6 ($>1,99$ pg/ml) fue significativamente inferior ($p= 0,007$) comparada con la del grupo de pacientes con niveles normales o indetectables (Figura 5). No se obtuvieron resultados significativos respecto a la SLE en el grupo total.



| | N | Eventos |
|---------------------------|----|---------|
| — Mayor de 1,99 pg/ml | 35 | 15 |
| - - - Menor de 1,99 pg/ml | 26 | 3 |

$P=0.007$

Figura 5. Curva de sobrevida global de acuerdo a los niveles séricos de IL-6 en el grupo total de pacientes con LNH. $p= 0,007$ Método Kaplan-Meier.

Se realizó el análisis univariado de las curvas de sobrevida global respecto a las diferentes variables pronósticas en los grupos de pacientes con LNH agresivos (Tabla 9) e indolentes (Tabla 10). En relación a la IL-6, el análisis univariado de las curvas de SG para el grupo de pacientes con LNH agresivos y LNH indolentes no mostraron diferencias estadísticamente significativas. No se obtuvieron resultados significativos en el análisis univariado de la SLE para ninguno de los grupos pronósticos anteriormente evaluados.

Tabla 8. Niveles séricos de IL-6 y evolución clínica de los pacientes con LNH.

| Evolución clínica | Nº pacientes | % | Nº pacientes (IL-6 > 1,99 pg/ml) | % | Nº pacientes (IL-6 ≤ 1,99 pg/ml) | % | p* |
|--------------------------|--------------|----|----------------------------------|----|----------------------------------|----|----|
| Remisión completa (RC) | 28 | 46 | 13 | 46 | 15 | 54 | NS |
| Remisión parcial (RP) | 25 | 41 | 13 | 52 | 12 | 48 | NS |
| Respuesta global (RC+RP) | 53 | 87 | 26 | 49 | 27 | 51 | NS |
| Progresión | 8 | 13 | 6 | 75 | 2 | 25 | NS |
| Muerte | 24 | 39 | 15 | 63 | 9 | 37 | NS |

P* significativa = 0,05 Prueba exacta de Fisher. NS: no significativa

Tabla 9. Análisis univariado de la sobrevida global en pacientes con LNH agresivos.

| Variables | Nº pacientes (n = 46) | 4 años SG (%) | p* |
|----------------------------|-----------------------|---------------|--------|
| Edad | | | |
| ≤60 años | 31 | 68 | NS |
| >60 años | 15 | 53 | |
| Estadio clínico | | | NS |
| I-II | 20 | 65 | |
| III-IV | 26 | 62 | |
| Estado funcional Karnofsky | | | NS |
| ≤70 % | 2 | 50 | |
| >70% | 44 | 64 | |
| Enfermedad extraganglionar | | | NS |
| ≤1 | 17 | 62 | |
| > 1 | 29 | 63 | |
| Enfermedad voluminosa | | | NS |
| Ausente | 13 | 69 | |
| Presente | 33 | 64 | |
| IPI | | | 0,0013 |
| Bajo riesgo | 39 | 72 | |
| Alto riesgo | 7 | 14 | |
| LDH | | | 0,04 |
| ≤ 570 U/L | 43 | 92 | |
| > 570 U/L | 3 | 33 | |
| B2M | | | 0,02 |
| ≤3,4 mg/dl | 36 | 69 | |
| > 3,4 mg/dl | 10 | 50 | |
| AST | | | NS |
| ≤38 U/L | 41 | 63 | |
| > 38 U/L | 5 | 60 | |
| ALT | | | NS |
| ≤41 U/L | 41 | 59 | |
| > 41 U/L | 5 | 100 | |
| FALC | | | NS |
| ≤290 U/L | 31 | 65 | |
| > 290 U/L | 15 | 60 | |
| PCR | | | NS |
| ≤ 6 mg/dl | 19 | 68 | |
| > 6 mg/dl | 27 | 59 | |
| VSG | | | NS |
| ≤15 mmH | 1 | 100 | |
| > 15 mmH | 25 | 72 | |
| Valor desconocido | 20 | | |
| IL-6 | | | NS |
| ≤ 1,99 pg/ml | 20 | 72 | |
| > 1,99 pg/ml | 26 | 0 | |

p* significativa = 0,05. NS: no significativa. Prueba de Log-rank
 AST: Aspartato Amino Transferasa LDH : Lactato deshidrogenasa
 ALT: Alanina amino transferasa FALC: Fosfatasa alcalina
 B2M: Beta 2 microglobulina
 VSG: Velocidad de sedimentación globular
 IL-6: Interleukina 6
 SG: sobrevida global

Tabla 10. Análisis univariado de la sobrevida global en pacientes con LNH indolentes.

| Variables | Nº pacientes (n = 15) | 4 años SG (%) | p* |
|----------------------------|-----------------------|---------------|-------|
| Edad | | | NS |
| ≤60 años | 10 | 45 | |
| >60 años | 5 | 40 | |
| Estadio clínico | | | NS |
| I-II | 5 | 40 | |
| III-IV | 10 | 45 | |
| Estado funcional Karnofsky | | | NS |
| ≤70 % | 3 | 33 | |
| >70% | 12 | 46 | |
| Enfermedad extraganglionar | | | NS |
| ≤ 1 | 4 | 50 | |
| > 1 | 11 | 42 | |
| Enfermedad voluminosa | | | NS |
| Ausente | 9 | 50 | |
| Presente | 6 | 33 | |
| IPI | | | NS |
| Bajo riesgo | 15 | 38 | |
| Alto riesgo | 0 | | |
| LDH | | | 0,008 |
| ≤ 570 U/L | 12 | 54 | |
| > 570 U/L | 3 | 0 | |
| B2M | | | NS |
| ≤ 3,4 mg/dl | 11 | 42 | |
| > 3,4 mg/dl | 4 | 50 | |
| AST | | | NS |
| ≤ 38 U/L | 14 | 47 | |
| > 38 U/L | 1 | 0 | |
| ALT | | | NS |
| ≤ 41 U/L | 14 | 47 | |
| > 41 U/L | 1 | 0 | |
| FALC | | | NS |
| ≤ 290 U/L | 11 | 50 | |
| > 290 U/L | 4 | 25 | |
| PCR | | | NS |
| ≤ 6 mg/dl | 7 | 38 | |
| > 6 mg/dl | 8 | 50 | |
| VSG | | | 0,01 |
| ≤ 15 mmH | 1 | 100 | |
| > 15 mmH | 3 | 57 | |
| Valor desconocido | 11 | | |
| IL-6 | | | NS |
| ≤ 1,99 pg/ml | 7 | 50 | |
| > 1,99 pg/ml | 8 | 43 | |

p* significativa = 0,05. NS: no significativa. Prueba de Log-rank
 AST: Aspartato amino transferasa LDH : Lactato deshidrogenasa
 ALT: Alanina amino transferasa FALC: Fosfatasa alcalina
 B2M: Beta 2 microglobulina
 VSG: Velocidad de sedimentación globular
 IL-6: Interleukina 6
 SG: sobrevida global

Las variables pronósticas asociadas significativamente con la SG en el grupo de pacientes con LNH agresivos (Tabla 9) fueron: IPI ($p = 0,0013$), LDH ($p = 0,04$), y B2M ($p = 0,02$), mientras que las variables: edad, estadio clínico, enfermedad extraganglionar, estado funcional, enfermedad voluminosa, PCR, AST, ALT, FALC, y VSG no resultaron significativas. El análisis univariado de las curvas de SG de los pacientes con LNH indolentes (Tabla 10) fue estadísticamente significativo respecto a los niveles de LDH ($p = 0,008$) y VSG ($p = 0,01$).

En relación al análisis univariado de los marcadores pronósticos respecto a la SLE en el grupo de pacientes con LNH agresivos, el IPI fue la única variable con significancia estadística entre los grupos de bajo riesgo y alto riesgo ($p = 0,001$).

Discusión

La IL-6 ha sido objeto de estudio como marcador pronóstico en pacientes con LNH. Se ha demostrado que desempeña un papel preponderante en los procesos metabólicos, inmunológicos y de respuesta inflamatoria, además de su injerencia en la regulación del sistema inmune, hematopoyético y otros procesos biológicos (11-12).

En el presente estudio evaluamos los niveles séricos de IL-6 pretratamiento en un grupo de pacientes con LNH, los cuales resultaron significativamente elevados en los pacientes comparados con el grupo de controles sanos. El criterio de positividad establecido para los niveles elevados de IL-6 ($> 1,99$ pg/ml) determinado en el grupo control, coincidió con valores similares reportados en estudios de población sana, aplicando el mismo método (13,15).

El 57% de los pacientes con LNH presentaron niveles séricos de IL-6 significativamente elevados ($> 1,99$ pg/ml) y el 43% mostraron niveles normales o por debajo del nivel de sensibilidad del ensayo (0,70 pg/ml), sugiriendo su importancia como factor pronóstico en el abordaje de nuevos casos de LNH, tal como ha sido reportado en trabajos previamente publicados (13-15).

Niveles elevados de IL-6 se asociaron significativamente con factores pronósticos adversos tales como: afectación extranodal > 1 , enfermedad voluminosa > 10 cm, IPI y niveles elevados de: LDH, B2M, AST, PCR y VSG. Las evidencias de la literatura sugieren que la IL-6 puede ser producida tanto por las células malignas como por linfocitos benignos reactivos, relacionándose su expresión con la reacción del paciente frente al tumor y su respuesta inmune (11, 21). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Seymour J.F. y col. (13), Preti H.A. y col. (22) y Niitsu N. y col. (23), quienes estudiando

pacientes con LNH obtuvieron una asociación significativa de niveles elevados de IL-6 con características clínico-patológicas como: enfermedad voluminosa, IPI, y niveles elevados de LDH y B2M. En relación al IPI, los pacientes con pronóstico de alto riesgo presentaron niveles de IL-6 significativamente superiores al grupo de bajo riesgo. Estos resultados sugieren la utilidad pronóstica de los niveles séricos de la IL-6, aportando información sobre la actividad de la enfermedad y para la toma de decisiones de protocolos terapéuticos apropiados (20).

Los niveles séricos de IL-6 correlacionaron significativamente de forma directa y lineal con el IPI, síntomas B, LDH, B2M, AST, PCR, y VSG. Similarmente los trabajos de El Far M. y col. (14) reportaron la correlación de niveles elevados de IL-6 en pacientes con LNH con la presencia de síntomas B. Los resultados de Niitsu y col. (23) sugieren que niveles elevados de IL-6 pudieran relacionarse con la diseminación de la enfermedad o crecimiento tumoral, determinado por la correlación significativa de la IL-6 con los síntomas B, enfermedad voluminosa, estado funcional y niveles elevados de LDH. La fuerte correlación entre los niveles de IL-6 y la presencia de síntomas B, estaría basada en los efectos pirogénicos y metabólicos de la IL-6. Esta molécula por sí sola pudiera causar fiebre, sudoración nocturna y pérdida de peso. Debido al efecto pirogénico de la IL-6, la mediación de la inhibición de las enzimas lipogénicas y/o el desarrollo de anorexia, pudieran causar la pérdida de peso (24-26). La correlación entre los niveles elevados de IL-6 y B2M pudiera ser secundaria a la proliferación incrementada de las células linfomatosas debido a la estimulación por la IL-6, causando un incremento en el recambio de la molécula de B2M unida a la membrana celular. Además, se ha reportado que la IL-6 puede incrementar la expresión de los genes de las moléculas clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) en fibroblastos humanos y la expresión de las proteínas del CMH clase I en células de carcinoma de colon. Dado que la B2M es el componente de la cadena liviana de las moléculas clase I del CMH, la IL-6 pudiera incrementar la cantidad de B2M liberada de la membrana de las células tumorales o del tejido no maligno (27-29). Estudios previos han demostrado que la IL-6 es un potente inductor de la síntesis de fibrinógeno hepático, el mayor determinante de la VSG (24). Estudios clínicos en los cuáles se ha administrado a pacientes IL-6 recombinante muestran que esta molécula incrementa los niveles de PCR y disminuye los niveles de albúmina sérica (30). La correlación significativa de la IL-6 con marcadores de respuesta inflamatoria como la PCR pudiera explicarse por la acción reguladora de la IL-6 sobre las proteínas de fase aguda producidas en el hígado, reflejando los niveles de PCR la actividad de la IL-6 en los pacientes con LNH (31). Los niveles de IL-6 correlacionaron significativamente con la AST, enzima que refleja la alta actividad metabólica hepática.



En relación a la repuesta al tratamiento y los niveles iniciales de IL-6, no se obtuvieron resultados significativos. Los trabajos de Fayad L. y col (15), Seymour JF. y col (13) y Chopra y col. (11) tampoco reportaron resultados significativos respecto a los niveles de IL-6 pretratamiento y la tasa de remisión completa.

La expresión de los niveles elevados de IL-6 fue indicativo de mal pronóstico, asociado a una disminución de la SG (análisis univariado) en el grupo total de los pacientes con LNH y no fue significativa para la SLE en el mismo grupo. No se obtuvieron resultados significativos para SG y SLE en los grupos de pacientes con LNH agresivos e indolentes, probablemente influenciado por la heterogeneidad y el tamaño de la población estudiada.

Nuestros resultados permitieron confirmar el valor pronóstico internacionalmente reconocido del IPI, y de los niveles elevados de LDH y B2M, los cuales se asociaron significativamente a una disminución de la SG en el grupo de pacientes con LNH agresivos (1-3,9). En relación a la SLE en el grupo de pacientes con LNH agresivos, el IPI fue la única variable con significancia estadística entre los grupos de bajo riesgo y alto riesgo. En el grupo de pacientes con LNH indolentes, el análisis univariado respecto a los niveles de LDH y VSG fue significativamente predictivo para la SG, pero no para la SLE. El tamaño de la muestra fue limitante en el análisis de las curvas de SLE.

En nuestro estudio analizamos los niveles séricos de IL-6 pretratamiento en pacientes con LNH. Los resultados obtenidos sugieren una significativa asociación entre los niveles séricos de IL-6 y factores pronósticos adversos, clínicos y biológicos. El IPI sigue siendo la principal herramienta de aplicación pronóstica en pacientes con LNH, no obstante pudiera ser complementando con la determinación de marcadores biológicos adicionales tales como la IL-6.

Agradecimiento

Agradecemos al Profesor Leovigildo García, profesor jubilado de la Cátedra de Matemática y Bioestadística de la Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, por la asesoría estadística.

Agradecemos a la Fundación BADAN por el financiamiento del estudio estadístico.

Referencias

1. Hennessy B, Narran E, Meter A. Non-Hodgkin Lymphomas: An update. *The Lancet Oncology*. 2004; 5: 341-352.
2. Evans LS, Hancock BW. Non-Hodgkin Lymphoma. *Lancet* 2003; 362 (9378): 139-46.

3. Fisher RI. Overview of Non Hodgkin's Lymphoma Biology: Staging and Treatment. *Semin Oncol*. 2003; 30: 3-9.
4. Clarke C, Glaser S, Dorfman R, Bracci P, Eberle E, y col. Expert Review of Non-Hodgkin's Lymphoma in a Population-Based Cancer Registry: Reliability of Diagnosis and Subtype Classifications. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2004; 13: 138-143.
5. Chatterjee N, Hartge P, Cerhan J, Cozen W, Davis S, y col. Risk of Non-Hodgkin's Lymphoma and Family History of Lymphatic, Hematologic and Other Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2004; 13:1415-1421.
6. La Vecchia C, Negri E, Franceschi S. Medical History and the Risk of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1992; 1: 533-536.
7. Maartense E, Kluin-Nelemans, Noordijk E. Non-Hodgkin's Lymphoma in the elderly. *Ann Hematol*. 2003;82: 661-670.
8. Vose JM, Chiu B, Cheson JD, Wright J. *Hematology* 2002 (1): 241-262.
9. Shipp MA, Harrington, Anderson J, Bonadonna G, Brittinger G, y col. A Predictive Model for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *The New England Journal of Medicine*. 1993; 329 (14): 987-94.
10. Hermans J, Krol ADG, Van Groningen K, Kluin, Kluin-Nelemans, y col. International Prognostic Index for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma Is Valid for All Malignancy Grades. *Blood*. 1995; 86 (4): 1460-1463.
11. Chopra C, Chitalkar, Maj Gen MP Jaiprakash. Cytokines: AS useful Prognostic Markers in Lymphoma Cases. *MJAFI*. 2004; 60: 45-49.
12. Skinnider B, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin Lymphoma. *Blood*. 2002; 99 (12): 4283-4297.
13. Seymour J, Talpaz M, Cabanillas F, Meir Wetzler, Kurrock R. Serum Interleukin-6 levels correlate with prognosis in Diffuse Large- Cell Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*. 1995; 13 (3): 575-582.
14. El Far M, Fouda M, Yahya R, El Baz H. Serum IL-10 and IL-6 levels at diagnosis as independent predictors of outcome in non-Hodgkin's lymphoma. *J. Physiol. Biochem*. 2004; 60: 253-258.
15. Fayad L, Cabanillas F, Talpaz M, McLaughlin P, Kurzrock R. High serum interleukin-6 levels correlate with a shorter failure-free survival in Indolent Lymphoma. *Leukemia and Lymphoma*. 1997; 30: 561-571.
16. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J y col. The World Health Organization Classification of Neoplasms of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting – Airlie House. *The Hematology Journal*. 2000 (1): 53-66.
17. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res*. 1971. 31: 1860-1.
18. Karnosky y col. *Clinical Oncology*. P Rubin. Ed. American Cancer Society 1983.
19. Fuente: Manual de quimioterapia antineoplásica, 3ra. Edición, 1995. Editor Gretta de Acquatella.
20. Aydin F, Yilmaz M, Ozdemir F, Kavgaci H, Yavuz MN. y col. Correlation of Serum IL-2, IL-6 and IL-10 levels with International Prognostic Index in Patients with aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *American Journal of Clinical Oncology*. 2002; 25: 570-572.

21. Nicolaidis C, Dimos S, Pavlidis N. Prognostic factors in aggressive Non-Hodgkin's Lymphomas. *The Oncologist*. 1998; 3: 189-197.
22. Preti HA, Cabanillas F, Talpaz M, Tucker SL, Seymour JF, Kurzrock R. Prognostic Value of Serum Interleukin-6 in Diffuse Large-cell Lymphoma. *Annals of Internal Medicine*. 1997; 127(3): 186-194.
23. Niitsu N, Okamoto M, Nakamine H, Yoshino T, Tamaura J-i, Nakamura S, Higashihara M, Hirano M. Simultaneous elevation of the serum concentrations of vascular endothelial growth factor and interleukin- 6 as independent predictors of prognosis in aggressive non- Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol*. 2002;68:91-100.
24. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*. 1990. 265: 621-636.
25. Black K, Garrett IR, Mundy GR. Chinese hamster ovarian cells transfected with the murine interleukin-6 gene cause hypercalcemia as well as cachexia, leukocytosis and trombocytosis in tumor bearing nude mice. *Endocrinology*. 1991; 128:2675-2659.
26. Strassman G, Fong M, Kenney JS, y col. Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. *J Clin Invest*. 1992, 89: 1681 – 1684.
27. Ni K, O'Neill. Proliferation of the BCL1 B cell lymphoma induced by IL-4 and IL-5 is dependent on IL-6 and GM-CSF. *Immunol Cell Biol*. 1992. 70: 315-322.
28. Yee CY, Biondi A, Wang XH, y col. A possible autocrine role for interleukin-6 in two lymphoma cell lines. *Blood*. 1989. 74: 798-804.
29. Shimizu S, Hirano T, Yoshioka R, y col. Interleukin -6 (B-cell stimulatory factor 2)-dependent growth of a lenner's lymphoma- derived T-cell line (KT-3). *Blood*. 1988, 72: 1826-1828.
30. Weber J, Yang JC, Topalian SL, y col. Phase I trial of subcutaneous interleukin-6 in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol*. 1993, 11: 499-506.
31. Maat M, Kluft C. Determinants of C- Reactive Protein Concentration in blood. *Ital Hearth J*. 2001, 2(3): 189-195.



Eficacia analgésica del clorhidrato de tramadol en el trabajo de parto

José Yoel Guzmán C.¹, María del Carmen Jorge¹, Blanca Sonia Guerrero Chacón², Próspero Alberto Rojas Martínez³, Alexander O. Mendoza Rivas⁴

Servicio de Obstetricia Maternidad Santa Ana IVSS, Caracas

RESUMEN

Se realizó un estudio prospectivo, comparativo, experimental y aleatorio en el período Septiembre 2005 a Junio 2006, en el Servicio de Obstetricia de la Maternidad Santa Ana del Instituto Venezolano de los Seguros Sociales. Se compara la eficacia analgésica de Clorhidrato de Tramadol (Tramal®) a dosis única de 100 mg intramuscular con el N-bromuro de hioscina (Buscapina®) a dosis única de 0,02 gr intramuscular, a pacientes durante la fase activa del trabajo de parto. Variables estudiadas: edad materna, edad gestacional, dilatación cervical al ingreso, intensidad media del dolor, presión arterial, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, efectos colaterales, APGAR de neonatos. La eficacia analgésica es estadísticamente mayor en el grupo de pacientes que se les administró Tramal® cuando se compara con el uso de Buscapina® durante la fase activa del trabajo de parto.

Palabras clave: Clorhidrato de tramadol, Tramal®, analgesia obstétrica, hioscina, Buscapina®, trabajo de parto.

Analgesic efficacy of tramadol clorhidrate in active phase of labor

SUMMARY

A random prospective comparative experimental study was carried out during September 2005 and June 2006 in the Ob-gyn Department of the Maternidad Santa Ana at the Instituto Venezolano de los Seguros Sociales. The analgesic efficiency of a 100 mg. intramuscular doses of Tramadol Clorhidrate (Tramal®) was compared to a 0.02 g. Intramuscular sole doses of hioscine N-BROMIDE (Buscapina®) in patients during the active phase of labor. Studied Variables: maternal age, gestational age, average acuteness of pain, blood pressure, heart rate, respiratory rate, side effects, Apgar in neonates. The analgesic efficiency is statistically higher in the patients administered with Tramal® when compared to the use of Buscapina® during the active phase of labor.

Keys words: Tramadol Clorhidrate (Tramal®), obstetric analgesic, hioscine N-BROMIDE (Buscapina®), active phase of labor.

1. Médico Cirujano, Especialista en Obstetricia y Ginecología. 2. Médico Cirujano, Especialista en Obstetricia y Ginecología. Perinatólogo. Adjunto de Obstetricia en HUC. 3. Médico Cirujano, Especialista en Obstetricia y Ginecología. Cursante de la Maestría en Ciencias Médicas Mención Obstetricia. UCV. 4. Médico Cirujano, Especialista en Obstetricia y Ginecología. Mastología HUC. Endocrinología Ginecológica HUC-UCV. Adjunto de Ginecología y Obstetricia Hospital " Jesús Yerena " de Lidice.

Solicitar correspondencia a: José Yoel Guzmán C: yoelguzman@hotmail.com

Introducción

La mayoría de las gestantes experimentan dolor durante la progresión del trabajo de parto de evolución normal. No hay evidencia de que el dolor del parto sea beneficioso para la madre o el feto, por el contrario el dolor, el miedo y las ansiedades desencadenan una serie de respuestas reflejas que pueden producir efectos nocivos sobre la madre, el feto, y el propio trabajo de parto, el alivio del dolor esta plenamente justificado.

El principal objetivo es proveer a la madre un adecuado alivio del dolor sin poner en riesgo el binomio madre-feto. La seguridad de la madre y su hijo será condición imprescindible de cualquier procedimiento de analgesia y anestesia obstétrica (1).

El uso de las medidas para eliminar el dolor inició una nueva era en la obstetricia, luego del primer parto conducido con anestesia en 1874 por James Simpson (2).

El control del dolor en la paciente obstétrica ha demostrado mejorar las condiciones fisiológicas de la madre y el feto, porque la analgesia sobre todo en el segundo período del trabajo de parto (fase activa) reduce la ansiedad de la paciente y con ello el nivel de catecolaminas en sangre, de esta manera mejora el flujo útero placentario.

La inducción de secreción de catecolaminas por las contracciones dolorosas puede prolongar el trabajo de parto porque afecta la contractilidad uterina, además las contracciones dolorosas pueden ocasionar hiperventilación materna y alcalosis respiratoria, lo que a su vez desvía la curva de disociación de oxihemoglobina hacia la izquierda, aumentando la afinidad materna por el oxígeno y disminuyendo así el aporte de oxígeno al feto.

En la actualidad se desconoce el mecanismo mediante el cual se desencadena el trabajo de parto, sin embargo este se ha dividido clásicamente en dos períodos; el primero comienza cuando las contracciones uterinas poseen la frecuencia, intensidad y duración suficientes para producir modificaciones del cuello uterino que permitan su borramiento y progresiva dilatación; el segundo período llamado expulsivo, se inicia cuando la dilatación es completa y finaliza con la expulsión del feto. El tercero y último también conocido como período placentario comienza inmediatamente después de que sale el recién nacido y culmina con la expulsión de la placenta y las membranas ovulares (3).

Los fenómenos que se suceden para que ocurra el trabajo de parto se dividen en, activos dados por la contracciones musculares tanto del útero como de la pared abdominal, y

pasivos que comprenden las modificaciones cervicales, formación del segmento uterino inferior, formación de la bolsa de las aguas, eliminación del tapón mucoso, ampliación de partes blandas y fenómenos plásticos de la cabeza fetal.

El dolor durante el trabajo de parto se ve acentuado por el temor hacia lo desconocido, la inseguridad y las malas experiencias propias.

El dolor del parto no se siente solo en la pelvis, sino también es referido a las áreas somáticas que comprometen los segmentos T10 a L1, con los órganos pelvianos en donde se inicia el dolor. Las áreas del dolor referido se extienden desde la región umbilical (T10) hasta la región inguinal y parte superior del muslo (L1), así como las partes laterales y porción inferior de la región dorsal, las cuales comparten los mismos segmentos (T10 a L1), por lo tanto cuando se administra anestesia epidural y se calma el dolor del trabajo de parto, el dolor referido a estas áreas se atenúa y se asocia con una amortiguación de los estímulos profundos.

El alivio del dolor durante el trabajo de parto presenta problemas especiales a considerar; el centro respiratorio del feto es muy vulnerable a los medicamentos opioides, sedantes y analgésicos. Los analgésicos y los anestésicos atraviesan la barrera placentaria.

En la analgesia obstétrica es importante que el analgésico utilizado ejerza poco o ningún efecto sobre las contracciones uterinas y la progresión del trabajo de parto (4).

La analgesia peridural es en la actualidad el método de elección en el primero y segundo período del trabajo de parto y se convirtió en una aliada del obstetra, para aliviar el dolor en las gestantes. Sin embargo esta modalidad terapéutica requiere personal capacitado, equipo especial de monitorización y de administración exclusiva por un especialista en anestesiología.

El clorhidrato de tramadol es un analgésico de acción central introducido en el Reino Unido y utilizado clínicamente en Alemania desde hace 17 años. Es una mezcla recémica de dos enantiómeros, Tramadol (+) y Tramadol (-) y posee la siguiente estructura química: (1RS;2RS)-2-(Dimetilamonio)Metil-1-(3-Metoxifenil)-Ciclohexanol clorhidrato.

El tramadol tiene baja afinidad por los receptores opioides paradójicamente su potencia analgésica es solo 10-15 veces menor que la morfina y es igual a la meperidina.

El tramadol actúa indirectamente sobre los receptores alfa 2, inhibiendo la captación de noradrenalina, que es justamente la forma como la desiprarrina potencia la acción analgésica de la morfina.



El tramadol actúa sobre la vía noradrenérgica central indirectamente al prevenir la recaptación de noradrenalina (5).

Algunos efectos colaterales típicos tales como: miosis, depresión respiratoria y cardiovascular, contispación, sudoración, prurito, náuseas y vómitos son muy raros o no son relevantes a dosis terapéuticas, por vía intramuscular tiene biodisponibilidad del 100% logrando un efecto analgésico pico entre una a dos horas, y se observa en orden de frecuencia: náuseas (17%), somnolencia (10%), hipotensión (8%), tmesis (7%), sudoración (4,6%), fatiga (3,3%), cefalea (2,9%), se queda en la boca (1,3%), otros efectos adversos es de menos del 1%. (6,8).

El tramadol®, es un analgésico efectivo con buen perfil de tolerabilidad. En particular, la evidencia de la falta de tolerancia y de dependencia y la baja incidencia de depresión respiratoria asociada con el tramadol, sugiere que puede ofrecer ventajas sobre otros medicamentos analgésicos opioides actualmente usados en el alivio del dolor moderado a severo.

La Hioscina (Escopolamina), al igual que la atropina son los fármacos antimuscarínicos mejor conocidos, ambos son alcaloides naturales, ésteres del ácido trópico y de la base nitrogenada terciaria y tiene afinidad por los receptores muscarínicos. (8). A las dosis clínicamente útiles, el antagonismo competitivo sobre los receptores muscarínicos es selectivo, ella compite con los agonistas por un sitio común de fijación sobre el receptor muscarínico. El sitio de fijación para los antagonistas competitivos es una hendidura que crea formas diversas espirales transmembrana del receptor. La hioscina tiene efectos centrales muy notables a dosis terapéuticas bajas debido a la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (7).

Método de evaluación del dolor

La evaluación del dolor es una etapa fundamental para un adecuado manejo del mismo (8,9), debido a que permite estimar de una forma más objetiva el dolor y su evaluación comprende varias fases: interrogatorio, escalas de valuación del dolor y examen físico. En nuestro estudio usaremos la escala visual análoga (EVA). Dicha escala ha sido ampliamente utilizada fuera del campo de la algología para evaluar signos y síntomas médicos difíciles de cuantificar, tales como la depresión y el sueño. En algología la escala visual análoga representa el método de autoevaluación unidimensional más empleado por su fiabilidad y sensibilidad. La EVA está representada por una línea recta de 100 mm (10 cm) de longitud. Dicha línea presenta dos extremos bien marcados, uno de ellos con la inscripción "Ausencia de Dolor" y el otro extremo "Dolor Máximo". Sobre esta línea el paciente debe marcar la posición que le parezca más similar a la intensidad del dolor sentido por este. Evaluaciones antes de instaurar un

tratamiento analgésico y después de cumplido el mismo permite evaluar y cuantificar el efecto terapéutico del tratamiento prescrito.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio comparativo, experimental, prospectivo, aleatorizado, en la sala de partos de la Maternidad Santa Ana durante los meses de Septiembre 2005 a Junio 2006, se seleccionó una muestra de 100 pacientes obstétricas, distribuyéndose de manera aleatoria en 2 grupos:

Grupo I: conformado por 50 pacientes primigestas con embarazo a término en trabajo de parto, quienes recibieron clorhidrato de Tramadol (Tramal®) en dosis única de 100 mg intramuscular al inicio de la fase activa del trabajo de parto.

Grupo II: conformado por 50 pacientes primigestas con embarazo a término, quienes recibieron 0,02 gr de N-butilbromuro de Hioscina (Buscapina®) en dosis única intramuscular, en la fase activa del trabajo de parto.

Se estableció un registro basal a los 15,30,60, 120 y 240 minutos para los siguientes parámetros: intensidad del dolor, presión arterial, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca fetal y efectos colaterales en la madre como depresión respiratoria, hipotensión arterial, somnolencia, náuseas, vómitos y prurito.

Se registró la dilatación cervical al ingreso y en el momento que la paciente lograba la dilatación completa.

La evaluación del dolor se realizó mediante la escala visual análoga del 1 al 10 previa explicación a la paciente antes de la aplicación del medicamento. Se hizo control horario de frecuencia cardíaca fetal. La valoración del recién nacido se basó en la escala de Apgar al minuto y 5 minutos de vida, realizando seguimiento de puerperio inmediato y recién nacidos en las primeras 24 horas.

El material farmacológico empleado fue el clorhidrato de tramadol (Tramal®), presentación en ampolla de 100 mg/2ml y el N-butilbromuro de Hioscina (Buscapina®), presentación ampolla de 0,02 gr/ml.

Los equipos de monitoreo que se utilizaron fueron: Dinamap, estetoscopio precordial, estetoscopio de Pinard y monitor de frecuencia cardíaca fetal.

Criterios de inclusión:

- Pacientes con embarazos simples en fase activa del trabajo de parto espontáneo.

- Pacientes primigestas.
- Edad gestacional entre 37 y 42 semanas.
- Presentación cefálica de vértice.
- Membranas ovulares rotas, con líquido amniótico claro.
- Edad materna entre 16 y 35 años.
- Consentimiento informado escrito de la paciente.

Criterios de Exclusión:

- Patologías maternas asociadas como: diabetes, hipertensión arterial, patología cardiovascular, enfermedades pulmonares, etc.
- Neuropatías por analgésicos.
- Insuficiencia útero- placentaria.
- Hipersensibilidad a los analgésicos.
- Alteración en el registro electrónico de la frecuencia cardíaca fetal.
- Desproporción feto-pélvica clínica o radiológica.
- Hipertensión arterial inducida por el embarazo.

Metodología estadística

En el grupo de variables descritas se calcularon frecuencias y porcentajes. Para las variables continuas se calculó la media y la desviación estándar.

Resultados

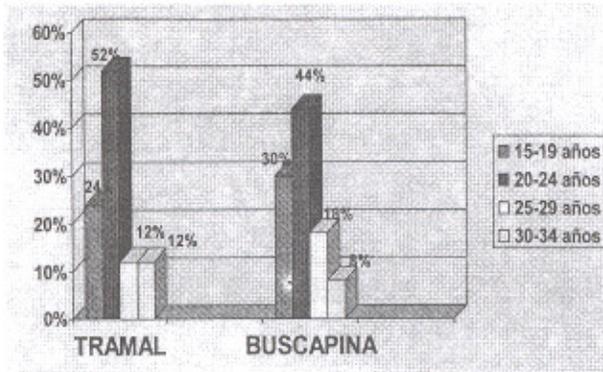


Figura 1. Las pacientes menores de 24 años estuvo representada por el 76% (38) que recibieron Tramal® y 74 % (37) que recibieron Buscapina®, el resto se ubican en orden decreciente. La media fue de 2,12 y 2,03 para Tramal® y Buscapina® respectivamente. En el grupo de 20-24 años; la desviación estándar fue de 0,92 y 0,91 para ambos grupos.

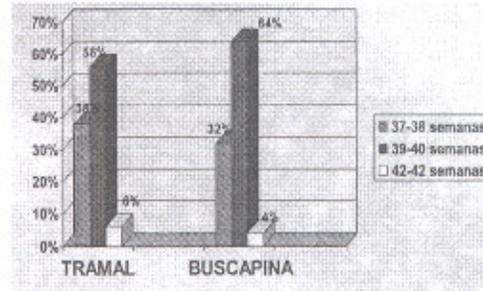


Figura 2. En la distribución de gestantes se observó que el 56% de pacientes a quien se administró Tramal® y 64% pacientes que se les administró Buscapina®, pertenecieron a la categoría de 39-40 semanas de gestación. Las medidas de tendencia central correspondió a una media de 1,69 para pacientes que recibieron Tramal® y de 1,72 para las que recibieron Buscapina®, lo que indica que el promedio de la incidencia de resultados se ubica en la categoría 2, la desviación estándar fue de 0,61 para Tramal® y 0,54 para Buscapina®.

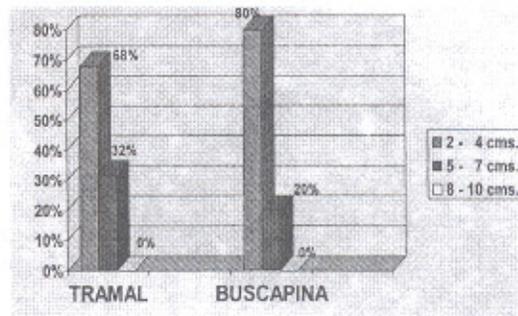


Figura 3. La menor dilatación de ingreso fue de 2-4 cms, para ambos grupos: Tramal® 68% y Buscapina® 80%. Los cálculos de las medidas de tendencia central correspondió a una media aritmética de 1,32 para Tramal® y 1,20 para Buscapina®, ubicándose el promedio en la dilatación de 2-4 cms, la desviación estándar muestra valores de 0,47 y 0,40 respectivamente para ambos grupos.

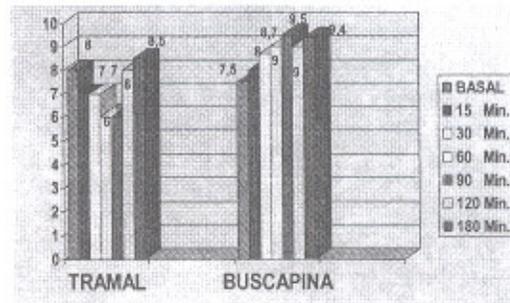


Figura 4. Se evidencia en la intensidad media del dolor que el efecto del Tramal®, si presentó diferencias significativas en relación con la Buscapina®, dado que en promedio cuando se comienza a administrar ambos analgésicos, el dolor disminuyó a partir de 15 minutos al suministrar Tramal®, mientras que con la Buscapina® ocurrió el efecto contrario, lo cual coincide con otras experiencias clínicas. Se constata que con Tramal® el efecto disminuyó a partir de los 90 minutos.

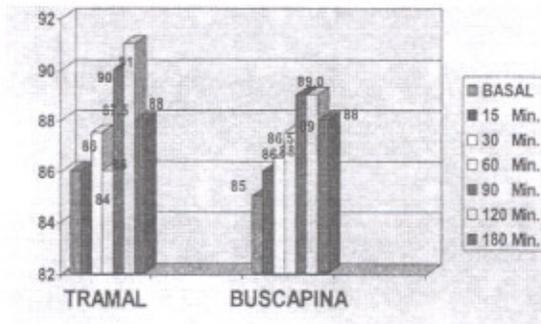


Figura 5. No se aprecia alteración significativa de la presión arterial media, tendiendo la misma a aumentar progresivamente a medida que transcurría el tiempo del estudio. A los 60 minutos 3 pacientes quienes recibieron Tramadol® presentaron hipotensión arterial con disminución de la presión arterial media de 86 mmHg; lo cual fue de poca trascendencia en el binomio materno-fetal.

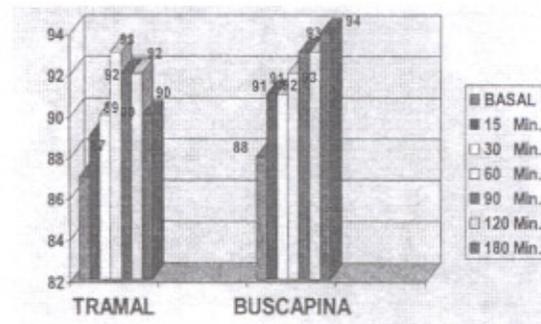


Figura 6. Se observa que no hay diferencias importantes en la frecuencia cardíaca materna con ambos medicamentos. Sin embargo se aprecia aumento de la frecuencia cardíaca con los 2 medicamentos, alcanzando el máximo valor (93 lat x min) a los 60 minutos para el Tramadol® y a los 180 minutos (94 lat x min) para la Buscapina®.

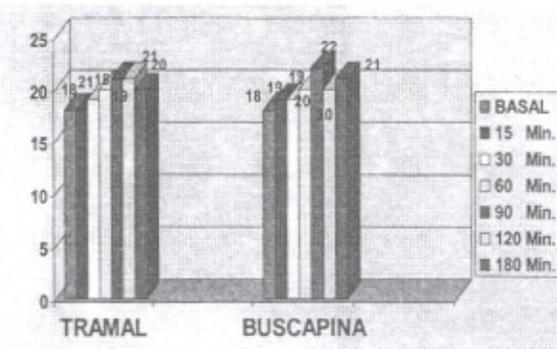


Figura 7. Se aprecia aumento de la Frecuencia respiratoria (FRM) materna con ambos medicamentos a medida que avanzaba el tiempo del estudio. La máxima FRM fue de 21 Resp x Min a los 90 minutos para el Tramadol® y a los 180 minutos con Buscapina®.

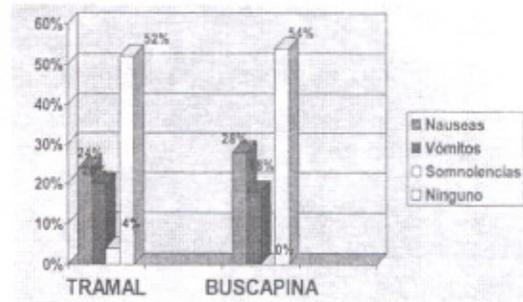


Figura 8. Se constata que la mayoría de las pacientes no presentaron efectos colaterales. 52% grupo con Tramadol® y 54% grupo con Buscapina®. Lo cual concuerda con la literatura.

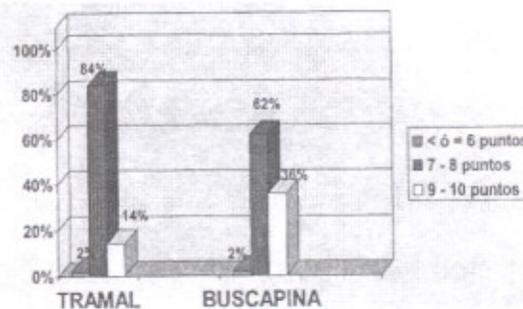


Figura 9. En cuanto al test de APGAR al 1er minuto no hubo neonatos con puntaje menor de 4. El 84% de los neonatos presentó puntaje de 7-8 pts con Tramadol® y el 62% de los neonatos con puntaje de 7-8 pts con Buscapina®. El 2% para ambos grupos tuvo APGAR menor o igual a 6 pts por circular de cordón en el grupo con Tramadol®, y período expulsivo prolongado con Buscapina®. Por lo que el promedio de la media es de 2,11 para Tramadol® y 2,14 para Buscapina®, lo que indica mayor incidencia para el grupo II. La desviación estándar correspondió a 0,43 y 0,47 respectivamente.

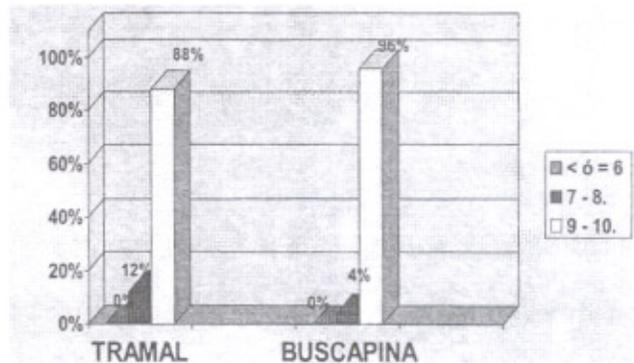


Figura 10. Se observa que el APGAR a los 5 minutos fue de 9-10 pts en el 88% para el Tramadol® y 96% para Buscapina®. Los neonatos que presentaron APGAR de 7-8 puntos fue de 12% con Tramadol® y 4% correspondían al grupo con Buscapina®. La desviación estándar fue de 0,33 y 0,20 para ambos grupos.

Discusión

En el estudio realizado se encontró que la edad materna, edad gestacional y la dilatación cervical no son parámetros importantes al querer evaluar eficacia analgésica del Tramadol® y de la Buscapina®, lo cual corrobora las experiencias (10,11).

El Tramadol fue efectivo ya que disminuyó rápida y efectivamente la intensidad del dolor en los primeros 15 a 90 minutos durante la fase activa del trabajo de parto, pero después de 90 minutos no se logró la eficacia analgésica esperada, lo cual coincide con otros autores (5). No se puede concluir si esta respuesta se debe a la aptitud de la pacientes o a una dosis insuficiente del medicamento después de los 90 minutos de aplicado; por otra parte con la administración de Buscapina®, no se logró disminuir la intensidad del dolor en la fase activa. Esto corrobora la observación que el dolor en la fase activa es progresivo y que ninguno de los dos medicamentos comparados logran revertir el mecanismo doloroso creciente.

No hubo diferencias estadísticamente significativas con el uso de Tramadol®, en cuanto a alteraciones hemodinámicas o ventilatorias, lo que concluyó también Bayeh (8). Las alteraciones cardiovasculares expresadas como aumento en la frecuencia cardíaca y disminución de la presión arterial debido a un mecanismo opioide simpaticomimético, se evidenció en 3 pacientes a quienes se les administró Tramadol®; las cuáles presentaron hipotensión arterial que se corrigió satisfactoriamente. En las pacientes que recibieron Buscapina®, estas dos variables aumentaron sin ninguna repercusión.

En cuanto a otros efectos adversos como depresión respiratoria, no se evidenció en nuestro estudio, náuseas y vómitos sin diferencia entre ambos grupos.

En relación al Test de Apgar, hubo excelente evolución tanto al 1' como al 5' por lo que podemos concluir que ninguno de los 2 analgésicos estudiados tiene repercusión en el feto.

Referencias

1. Cabero L, López F, y cols. Informe sobre la analgesia regional del parto. Documentos de la SEDAR: Sociedad Española de Gineco-Obstetricia y Anestesiología 2000.
2. Gutierrez O, Sotomayor E, Garrido J. Acupuntura en la analgesia del trabajo de parto. Hospital Gineco Obstétrico Docente Comandante Manuel Fajardo. Revista Cubana de Obst y Gin. 1995;21(1).
3. Aller J. Capítulo 8: Obst Moderna, 1997.p65.
4. Paech MJ, y cols. Complications of obstetric epidural analgesia and anaesthesia: A prospective análisis of 10.995 cases. Int J Obstet Anaesth. 1998 Jan; 7(1):5-11.
5. Eggers KA, Power I. Tramadol. British Journal of Anesthesia.1995;74:247-8.
6. Lee Cr, Mc Tavish D, y cols. Tramadol Revisión Preliminar de sus propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas y actividad terapéutica en los estados agudos y crónicos.
7. Goodman and Gilman. Opiodes: Bases Farmacológicas de la Terapéutica 8va edición 1996. p163.
8. Bayeh O y cols. Eficacia analgésica de Tramadol intramuscular durante la fase activa del trabajo de parto. Ven de Anest 1999;4:1:130-34.
9. Zapata C. et al. Estudio abierto comparativo dextropropoxifeno vs Tramadol en analgesia obstétrica. Rev de Especialidades de Ecuador. 1992;311:44-51.

Aislamiento de hongos anemófilos en un ambiente laboral hospitalario

Pabón de Santiago R.¹, Santiago A. R.², Naranjo F.³

RESUMEN

Los hongos anemófilos llamados saprofitos contaminantes o atmosféricos, contaminan el medio ambiente a través de propagulas que los dispersan en el aire. Cerca de 80 especies han sido descritos como agentes desencadenantes de enfermedades respiratorias alérgicas, otomicosis, keratomicosis, broncopatías crónicas, y asma episódica. Los hongos anemófilos se desarrollan en una gran cantidad de sustratos tanto en el ambiente como en el interior de edificios y sus propagulas pueden ser inhalados por el hombre constituyendo un riesgo para la salud, especialmente cuando las condiciones ambientales tales como humedad, temperatura, sistemas de aire acondicionado inadecuados y actividades laborales, favorecen su proliferación y reproducción. Con el objeto de conocer la incidencia de hongos anemófilos en un ambiente laboral del Hospital Vargas de Caracas, con un área de 30 m², se tomaron muestras de aire utilizando el método de impactación mediante un aparato "Hi Air Air Sampler System" y por deposición gravitacional horizontal, sobre placas de Agar Sabouraud Dextrosa con cloranfenicol expuestas durante 5 y 10 minutos respectivamente, posteriormente fueron incubadas a 25°C, examinadas a las 48 horas y hasta un máximo de 5 días para el aislamiento de las colonias fúngicas. Los hongos aislados, se clasificaron según criterios micológicos convencionales encontrándose siete géneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Monilia*, *Rhizopus* y *Fusarium*. Dentro de las especies de *Aspergillus* aisladas predominó *A. fumigatus* considerado como uno de los productores de patologías respiratorias. Paralelamente, se tomaron muestras nasales y orofaríngeas de cuatro de los once trabajadores del área estudiada, que presentaron rinoфарингитis alérgica, conjuntivitis alérgica, laringotraqueítis aguda, encontrándose en ellos, *A. fumigatus* y *Cladosporium* spp. asociándose al cuadro clínico fundamentalmente a un componente alérgico, respondiendo con antihistamínicos convencionales. El estudio sistemático de los ambientes laborales hospitalarios deben ser incluidos en todo trabajo cuando se intente determinar la calidad del aire en las diferentes áreas de un Hospital.

Palabras clave: Hongos anemófilos, ambiente laboral hospitalario, método de impactación, método de deposición gravitacional horizontal.

Isolating anemophilous fungi in a hospital working environment

SUMMARY

The anemophilous fungi called contaminated or atmospheric saprophytes, pollutes the environment through propagulas that disperse them in the air. About 80 species have been described as inchoating agents of allergic respiratory diseases, otomycosis, keratomycosis, chronic bronchiopathies, and episodic asthma. The anemophilous fungi are developed on a large quantity of grounds even in the environment as in the inside of buildings and its propagulas can be inhaled by man thus causing a health risk, specially when environmental conditions such as moisture, temperature, inadequated air conditioning systems and working activities encourage their proliferation and reproduction. With the purpose of knowing the incidence of anemophilous fungi in a working environment at the Hospital Vargas in Caracas, in an area of 30 square meters, air samples were taken using the impact method by means of a device called "Hi Air, Air Sampler System" and also by means of horizontal gravitational deposition over Sabouraud Dextrose Agar plates with chloramphenicol exposed during 5 and 10 minutes respectively. Later they were incubated at 25°C, examined at 48 hours and to a maximum of 5 days to isolate the fungi colonies. The isolated fungi were classified according to conventional mycological criteria, finding out seven genres: *Aspergillus*, *Penicillin*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Monilia*, *Rhizopus* and *Fusarium*. Among the isolated species of *Aspergillus*, *A. fumigatus* was dominant, being considered as one of respiratory pathological producers. At the same time, nasal and oropharynxial samples were taken of four the eleven workers in the studies area, who presented allergic rhinopharynxitis, allergic conjunctivitis, acute larynxotracheitis, finding in them *A. fumigates* and *Cladosporium* spp., joining to the clinic situation basically to an allergy factor, responding to conventional anti histamines. The systematic study of the hospital working environments must be included in all works when intending to determine the air quality into the different hospital areas.

Key words: Anemophilous fungi, hospital working environment, impact method, horizontal gravitational deposition method.

1. Laboratorio de Micología. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Vargas de Caracas.
2. Sección de Micología "Prof. Lorenzo de Montemayor". Departamento de Bioanálisis. Hospital Universitario de Caracas.
3. Servicio de Infectología. Hospital Vargas de Caracas.

Introducción

Se han conseguido identificar a más de 200.000 especies de hongos. Sin embargo, se conocen menos de 200 especies que pueden producir infecciones en el ser humano y el 90 por ciento de las micosis pueden ser atribuidas a sólo una docena (1). En el ambiente existe una cantidad de hongos de diferentes dimensiones que constituye lo que se conoce como hongos anemófilos. Tienen diferentes tamaños y al ser inhalados por el hombre pueden producir cuadros respiratorios de diversa gravedad, siendo el asma bronqueal el más importante (2).

Se conoce poco de la potencialidad de los alérgenos en los ambientes externos, sin embargo se han descrito como desencadenantes de cuadros de asma y rinitis principalmente, un número de aproximadamente 80 especies de hongos (3-6). Las condiciones ambientales tales como la humedad relativa, temperatura, precipitación pluvial, inversiones térmicas, contaminación y actividades humanas, influyen de manera determinante en la proliferación y propagación de las partículas fúngicas hacia los espacios interiores (7,8). Son afectados niños, adolescentes y adultos jóvenes (9). Saito en 1904, demostró los efectos respiratorios en los individuos, producidos por la inhalación de partículas fúngicas (10). Posteriormente en 1935 Feimberg confirmó los hallazgos, en la misma área de estudio, de otros investigadores en América Latina (11,12). En las últimas décadas se ha estudiado el impacto que los hongos anemófilos producen en el interior de casas y escuelas (2), igualmente se ha estudiado su transmisión en el interior de las áreas hospitalarias (13-15). En este trabajo se estudió un ambiente laboral hospitalario, del Hospital Vargas de Caracas con el objeto de determinar los hongos ambientales presentes y tratar de determinar su implicación en patologías respiratorias.

Materiales y métodos

Con el objeto de conocer la incidencia de hongos anemófilos en un ambiente laboral de las oficinas de Recursos Humanos del Hospital Vargas de Caracas, con un área de 30 m², se tomaron muestras de aire utilizando el método de impactación mediante un aparato "HiAir Air Sampler System (Figura 1) y por deposición gravitacional horizontal, sobre placas de Agar Sabouraud Dextrosa con cloranfenicol expuestas durante 5 y 10 minutos respectivamente. Posteriormente fueron incubadas a 25°C, examinadas a las 48 horas y hasta un máximo de 5 días para el aislamiento de las colonias fúngicas (Figura 1). Paralelamente, se tomaron muestras nasales y orofaríngeas de cuatro de los once trabajadores del área estudiada, que presentaron rinoфаринgitis alérgica, conjuntivitis alérgica, laringotraqueitis aguda.

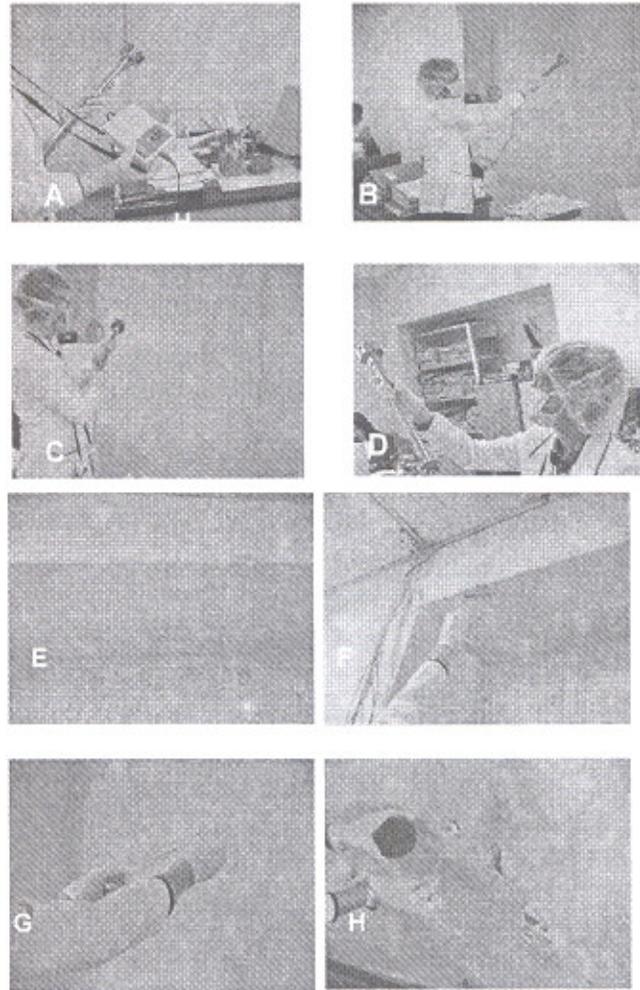


Figura 1. A.B.C.D. Toma de muestras de aire utilizando el método de impactación mediante un aparato "HiAir Air Sampler System. E.F.G.H. Toma directa de muestra de pared.

Resultados

Los hongos aislados, se clasificaron según criterios micológicos convencionales encontrándose siete géneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Monilia*, *Rhizopus* y *Fusarium*. Dentro de las especies de *Aspergillus* aisladas predominó *A. fumigatus* considerado como uno de los productores de patologías respiratorias.

En cuatro de las once muestras nasales y orofaríngeas tomadas a los once trabajadores del área estudiada, que presentaron rinoфаринgitis alérgica, conjuntivitis alérgica, laringotraqueitis aguda, se encontró: *A. fumigatus* y *Cladosporium* spp.

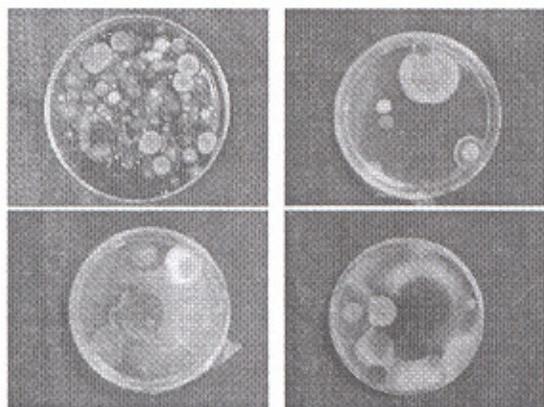


Figura 2. Ejemplo del crecimiento de colonias fúngicas a los 5 días de la Toma de la Muestra en diferentes áreas de estudio.

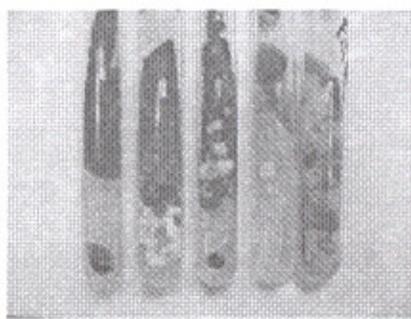


Figura 3. Crecimiento de hongos a partir de muestras clínicas.

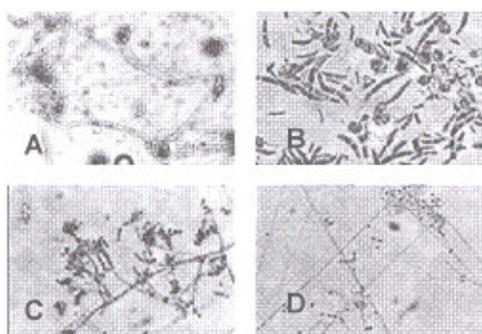


Figura 4. Microcultivos de hongos aislados en el estudio. A. *A. fumigatus*. B. *Fusarium* spp. C. *Cladosporium* spp. D. *Penicillium* spp.

Discusión

Los hongos anemófilos están siempre presentes en el aire, muchas veces son causante de diversas patologías pulmonares algunas de consideración para el humano (2). En este trabajo se aislaron diversos hongos entre los cuales se encontramos aquellos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Monilia*, *Rhizophus* y *Fusarium*. Dentro de las especies de *Aspergillus* aisladas predominó *A. fumigatus* considerado como uno de los productores de patologías respiratorias. De igual forma, de las muestras nasales y orofaríngeas de cuatro de los once trabajadores del área estudiada, los cuales presentaron rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, laringotraqueitis aguda, se aislaron *A. fumigatus* y *Cladosporium* spp. lograr demostrar su implicación en las patologías referidas. Es importante resaltar, en especial con el aislamiento de *A. fumigatus*, que el mismo fue observado en las muestras tomadas del aire y en algunos de los trabajadores del área estudiada, demostrándose que existe contacto entre el hongo y el individuo y que ambos conviven en un área contaminada con este y otros hongos aislados. Esta interacción es fundamental en el momento que se deba evaluar si las patologías respiratorias, en especial el asma bronquial. Es por ello que este tipo de estudio se hace cada vez más importante dentro del área hospitalaria. En nuestro caso se realizó la determinación de los hongos anemófilos, en un área donde no existen pacientes hospitalizados, pero los resultados obtenidos indican que si en este caso, solamente alguno de los trabajadores manifestaron patologías respiratorias, es más importante la investigación de estos hongos en áreas críticas como pudieran ser las unidades de terapias, quemados neutropénicos, entre otros. Consideramos de vital importancia la determinación de los géneros y especies en estas áreas críticas. El estudio sistemático de los ambientes laborales hospitalarios deben ser incluidos en todo trabajo cuando se intente determinar la calidad del aire en las diferentes áreas de un Hospital.

Agradecimiento

Los autores desean agradecer al Sr. Fouad Nahas Presidente de DIDACTA CA. por su colaboración para el logro de este trabajo.

Referencias

1. Rippon JW. Medical Mycology. The pathogenic Fungi and the pathogenic Actinomycetes. 3rd ed. Philadelphia. WB Saunders. 1988:1-9.
2. Guerrero TA, Sánchez DR, Martínez Chacón JF, García Yáñez Y, Chacón RA, Wong-Chio M, Vértiz- Chávez E, Tay Zabala J. Aislamiento de hongos en instalaciones deportivas de la UNAM. Rev Fac Med UNAM 2003; 46 (3):93-96.

3. Ibañez Henríquez V & Rojas Villegas G. Aerosporas fúngicas del área oriente de Santiago - Chile (1996-1997). *Boletín Micológico* 1999;14: 83-89.
4. Picco AM & Rodolfi M. Airborne fungi as biocontaminants at two Milan underground stations. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2000;45:43-47.
5. Antico A. Environmental factors and allergic airways diseases. *Aerobiología*. 2000;165:321-329.
6. Fluckiger B, Koller T & Monn C. Comparison of airborne spore concentrations and fungal allergen content. *Aerobiología*. 2000;16: 393-396.
7. López MR, Ruiz SD, Huerta JG, Esquenaze A, Alvarez T. Variación estacional de hongos productores de alergias en el sur de la Ciudad de México. *Allergol et Immunopathol* 1986;14:43-48.
8. Targonsky PV, Persky VW, Ramerkrisham V. Effect of environmental molds on risk of death from asthma during the pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95:955-961.
9. Perzanowski MS, Sporik R, Squillace SP, Gelber LE, Call R, Carter M, Platts-Mills TA. Association of sensitization to *Alternaria* allergens with asthma among school-age children. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:626-632.
10. Saito K. Untersuchungen uber die atmosphärischen Pilzsporen. *Mitteilung. J Col Set Tokio* 1904; 18:58. Citado por Richards M, Cardiff W. Atmosphere mold spores in and out of doors. *J. Allergy* 1954; 25:429-439.
11. Feimberg S, Little T. Mould allergy. Its importance in asthma and hay fever. *Wis Med J*. 1935;34: 254.
12. Feimberg S, Little T. Seasonal hay fever and asthma due to molds. *JAMA* 1936; 107: 1861.
13. Fridkin S, Jarvis W. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9:499-511.
14. Mazer D, Alvarado C, Hassmir C, Zilz M. Relation of the inanimate hospital environment to endemic nosocomial infection. *N Engl J Med* 1982; 307:1562-1566.
15. Overberger P, Wadowsky R, Schaper M. Evaluation of airborne particles and fungi during hospital renovation. *J Am Ind Hig Assoc* 1995; 56:706-712.

Caracterización de la expresión y aislamiento de proteínas de choque térmico (HSP) en *Trypanosoma cruzi*

Torrealba Saibel, Ferraz Sabrina, Pérez José Luis, Mosca Walter y Campos Yelitza

Laboratorio de Fisiopatología, Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela

RESUMEN

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad del Chagas, la cual afecta a unas 18 millones de personas, siendo para muchos países de Centro y Sur América uno de los principales problemas de salud pública. En Venezuela, algunos estudios reportan un 11.2% de seroprevalencia frente a *T. cruzi*, principalmente en localidades rurales. Hasta la fecha, la quimioterapia convencional es efectiva solo en la fase aguda de la enfermedad, además origina efectos secundarios indeseados en los pacientes, este problema asociado a la ausencia de tratamientos de inmunoprofilaxis, hace prioritario el estudio y el aislamiento de nuevas moléculas o antígenos de *T. cruzi*, capaces de inducir una respuesta inmune protectora, que permita ofrecer una alternativa a la población susceptible. En este sentido, se ha descrito que las proteínas de choque térmico (HSP) juegan un papel importante en el desarrollo de la respuesta inmune celular y humoral y están involucradas en la inducción de inmunidad contra agentes infecciosos. Es por ello, que esta investigación está orientada a evaluar distintas condiciones experimentales sobre el aumento en la expresión de HSP de *T. cruzi*, que puedan ser utilizadas para un aislamiento más eficiente de las mismas, con la finalidad de evaluar posteriormente su potencial uso como herramienta en la inmunoterapia. En función de esto, se tomaron cultivos de epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*, en fase estacionaria de crecimiento, se les sometió a diferentes condiciones de estrés (nutrientes, temperatura y temperatura-nutrientes) durante distintos tiempos de incubación y se evaluó el perfil de proteínas obtenido a través de electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE, evidenciándose diferencias cualitativas y cuantitativas de una condición a otra. Posteriormente, para demostrar la presencia de la proteína de interés, se realizó inmunoblot de las distintas condiciones experimentales, y se enfrentaron contra anticuerpos anti-HSP70, obteniéndose 2 bandas que varían en intensidad según la condición de estrés. La condición de estrés de nutrientes, aplicado durante 4 horas, fue la condición donde se observó mayor expresión de HSP70, por ello, se escogió esta condición para realizar una purificación parcial de HSP70 por ultracentrifugación, estableciéndose así el protocolo de expresión y purificación necesario para las evaluaciones futuras que se realizarán en el Laboratorio de Fisiopatología.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, proteínas de choque térmico HSP.

(HSP) Hot shock proteins isolation and expression in *Trypanozoma cruzi*

SUMMARY

Trypanosoma Cruzii is the ethiological agent of Chagas disease that affects around 18 million persons, being one of the public health main problems in some south and central American countries. In Venezuela some reports and researches show 11.2% of seroprevalence for TC specially at communities in the country. Until now the standard chemotherapy is effective only in the acute stage of the disease and produces unexpected secondary effects to the patients, this situation besides a lack of immunoprofilaxis treatments, make necessary the research and isolation of new molecules or TC antigens capable to produce immune protective answers in order to give an option to the susceptible population Hot shock proteins (HSP) are very important for the development of a humecoral and cellular immune answer, and are related to the immunity against infecting agents, this is why this research is designed to evaluate the different experimental conditions about the increasing of HSP expression in TC in order to be used for a better isolation of the same, with the aim of evaluating their power as a tool in immunotherapy. According to this goal some TC epimastigotes cultures were taken in growing stage and were affected with different stress condition (nutrients-temperature, temperature-nutrients) during the procedure and the proteins profile obtained was evaluated by electrophoresis with polyacrilamid SDS-PAGE finding quantitative and qualitative differences from one condition to another, in order to demonstrate the protein existence, immunoblot of the different experimental conditions were faced against anti-HSP70 antybodies obtaininfg two stripes of different intensities according to the stress condition. The nutrient stress condition applied during 4 hours was the highest expression of HSP-70, for this reason this condition was selected to make a partial purification of HSP-70 by ultracentrifugation, giving the expression and purification protocol needed for next evaluations at the fisiopathology laboratory.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, HSP Hot shock proteins.

Introducción

La enfermedad de Chagas representa un problema de salud pública para América latina, afectando entre 16 – 18 millones de personas principalmente en áreas rurales (1); en Venezuela, algunos estudios reportan un 11.2% de seroprevalencia frente a *T. cruzi*, principalmente en localidades rurales, donde el 8.5% de los infectados fueron niños menores de 10 años, sugiriendo transmisión activa durante las últimas 2 décadas (2). Además, hay que tomar en cuenta lo poco eficiente de la quimioterapia convencional y el grado de morbilidad que produce el no tener una alternativa de inmunoprofilaxis contra la enfermedad de Chagas, lo que hace prioritario el estudio y aislamiento de nuevas moléculas que puedan ser usadas para tal fin y que aporte una alternativa a la población susceptible. Entre las moléculas que están siendo investigadas en la actualidad en este campo de estudio, encontramos las proteínas de choque térmico (HSP).

Las proteínas de choque térmico o Heat Shock Proteins (HSP), se han descrito en todos los organismos vivos y son altamente conservadas de una especie a otra, además cumplen una función importante en el mantenimiento de la homeostasis celular al funcionar como chaperonas moleculares ayudando al plegamiento de péptidos nacientes y previniendo la agregación de proteínas en el citoplasma celular (3). Así, las HSP constituyen hasta 5% de las proteínas intracelulares totales sin embargo, bajo condiciones de estrés, tales como exposición a las altas temperaturas, a toxinas, a condiciones oxidativas o a la privación de glucosa, sus niveles pueden elevarse hasta 15% o más, pudiendo encontrar la forma constitutiva (HSC) y la forma inducible (HSP), esta última es la encargada de prevenir la agregación de proteínas importantes para la célula, cuando se encuentra bajo alguna condición que represente un estrés para ella (4). Además de sus funciones como chaperonas moleculares, se ha descrito que las HSP juegan un papel importante en el desarrollo de la respuesta inmune celular y humoral. En este sentido, se ha encontrado que las HSPs purificadas de un determinado tipo celular, por ejemplo de células cancerosas, están asociadas con una variedad de péptidos, que constituyen un repertorio propio de las células de donde se aislaron (5). Actualmente, se está usando la inmunización con los complejos HSP-peptidos derivados endógenamente o reconstituidos "in vitro" para desencadenar una potente respuesta contra los péptidos asociados a HSP y por ende contra las células de donde se originaron. Esta estrategia se está utilizando en el tratamiento de tumores, virus y otras enfermedades infecciosas, obteniéndose buenos resultados (6).

Con respecto a *T. cruzi*, se ha analizado el efecto de las proteínas de choque térmico del parásito en la maduración de células dendríticas precursoras de ratón; los resultados obtenidos demostraron que la HSP70 sola, unida al antígeno KMP11, así como también fragmentos de HSP70, son capaces de ma-

durar las células dendríticas murinas. La célula dendrítica madura aumenta la expresión de IL-12, de citocinas como TNF- α , de moléculas coestimuladoras y marcadores de activación, demostrando un aumento claro en la capacidad aloestimuladora. Así estos resultados sugieren que la HSP70 de *T. cruzi*, puede ser un vehículo muy útil para desarrollar inmunoprofilaxis e inmunoterapia basadas en células dendríticas, contra el agente infeccioso (7).

Es evidente, que las HSP representan un tema que puede aportar alternativas a la enfermedad de Chagas, y no sólo ellas como moléculas dominantes en diversos organismos, sino la importancia de los péptidos que ellas acoplan y protegen, de los cuales algunos pueden tener potencial inmunológico, tal como lo sugieren algunos trabajos (8), es por ello, que esta investigación está orientada a evaluar distintas condiciones experimentales sobre el aumento en la expresión de HSP de *T. cruzi*, que puedan ser utilizadas para un aislamiento más eficiente de las mismas (solas y acopladas a péptidos del parásito), con la finalidad de evaluar posteriormente su potencial uso como herramienta en la inmunoterapia.

Metodología

Cultivo de parásitos se realizó a partir de epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*, con un inóculo inicial de 2×10^6 parásitos/ml en un volumen final de 100ml en medio LIT enriquecido con suero Newborn al 5%, sangre desfibrinada de conejo 0,2% y gentamicina 50ig/ml colocado en 4 frascos para cultivo celular de 400ml (Falcon) los cuales se mantuvieron a temperatura ambiente. Se hicieron recuentos diarios hasta llegar a fase estacionaria de crecimiento, donde se procedió a colocar cada cultivo bajo las condiciones experimentales establecidas.

Estrés de nutrientes consistió en colocar los parásitos en medio mínimo de nutrientes (RPMI + gentamicina). El estrés de temperatura consistió en colocar el cultivo de parásitos en la estufa a 37°C. Estrés de nutrientes – temperatura, ambas condiciones combinadas; cada una a distintos tiempos de incubación (2, 4, y 24 horas).

Procesamiento de los cultivos posterior cumplidas las condiciones experimentales establecidas, se colocó el cultivo en tubos cónicos plásticos estériles centrifugándolo a 1500 g por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó dos veces con buffer PBS pH 7.4, centrifugando en cada caso bajo las mismas condiciones. Luego, se resuspendió el sedimento en 1ml de buffer PBS pH 7.4 y se agregó un cocktail de inhibidor de proteasas 10x (Protease inhibitor cocktail, SIGMA) con una dilución 1/10. Posteriormente los parásitos se sonicaron (sonicador SONIFIER 250, Branson), dando 7 pulsos de 10 watts con intervalos de 5 segundos cada uno, con la muestra colocada en hielo; una vez lizados los cultivos, se centrifugaron 10 minutos a 1000 g y se alicuotó



200µl del sobrenadante, en tubos eppendorf nuevos y finalmente se guardaron a -20°C hasta su uso.

Cuantificación de proteínas cuantificación de las proteínas totales de los lisados de *T. cruzi*, utilizando el Micro Lowry, (modificación del Lowry 1951). Se leyó a una longitud de onda de 750 nm en un espectrofotómetro Beckman Du 640B.

Evaluación del perfil de proteínas de los lisados de *T. cruzi* se evaluó el perfil de proteínas de los lisados a través de electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, en condiciones disociantes y desnaturalizantes por el método SDS – PAGE. Se colocó 10µg de cada muestra en pozos independientes en un volumen total de 25µl completado con buffer de muestra 1X. Se usó 2µl del marcador de PM para cada gel (Broat Range Protein Molecular Weight Markers, PROMEGA). Para iniciar la corrida se colocó la fuente de poder a 80v constante, hasta observar que las muestras se alinearan al final del gel de apilamiento, luego se aumentó el voltaje a 160v constantes, hasta el final de la corrida. Una vez finalizada se realizó a cada gel, la tinción de azul brillante de Coomassie. Los pesos moleculares de las bandas reveladas se calcularon a través del Software “Quantity one” de BIO-RAD.

Electrotransferencia e inmunoblot se realizaron corridas electroforéticas con geles preparativos para cada muestra (poliacrilamida 10%), se usó un marcador de PM preteñido (BenchMark™ Prestained Protein Ladder, INVITROGEN). Una vez culminada la corrida, se montó el sistema de transferencia a nitrocelulosa durante 1 hora usando 70V, 130 mA, 9W. Al final de la transferencia se tiñó con rojo ponceu cada una para corroborar la transferencia de proteínas. Posteriormente se realizó inmunoblot (modificación del método de Southern 1975), a cada muestra transferida en nitrocelulosa, usando como anticuerpos primarios anti – HSP70 (producida por el laboratorio del Dr. Tomás Hermoso) (dilución 1/50), pool de sueros negativos y positivos para la enfermedad de Chagas (1/1000); anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina (Goat anti-human IgG (H+L) GIBCO – BRL, Anti-conejo, Anti-Rabbit IgG phosphatase alkaline BIO-RAD) (dilución 1/1000), y sustrato para fosfatasa alcalina (Sustrato 1-Step™ NBT/ BCIN, PIERCE). Se usó como control positivo para HSP70: HSP70 de extracto de corazón homólogo con la secuencia HSP70 de *Leishmania sp.*

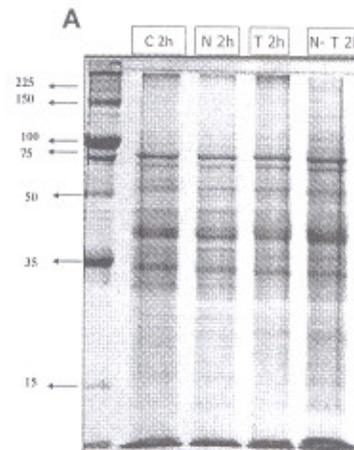
Purificación parcial de HSP70 se realizó a partir de cultivos masivos de epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*, en fase estacionaria de crecimiento, siguiendo las mismas condiciones descritas para la inducción de las HSP en estrés de nutrientes de 4 horas. Aproximadamente 1×10^9 parásitos se resuspendieron en 10ml de tampón de lisis A (50mM tris/HCl pH 8, 5 mM CaCl₂) + inhibidor de proteasas. Posteriormente se homogeneizó en un sonicador (SONIFIER 250, Branson), dando 7 pulsos de 10 watts con intervalos de 5 segundos cada

uno, manteniendo la muestra en hielo. Se ultracentrifugó 100.000 xg 1 hora a 4°C, luego se separó la fracción soluble S1, donde se ha descrito que se encuentra la HSP70 (16).

A esta fracción soluble (S1) se le realizó todo el procedimiento de electrotransferencia e inmunoblot descrito anteriormente utilizando como anticuerpo primario anti-HSP70, revelando así la presencia en mayor cantidad de la proteína de interés para esta condición.

Resultados

Evaluación del perfil de proteínas de los lisados de *T. cruzi* al evaluar los cambios en el perfil de proteínas de los lisados de *T. cruzi* bajo las distintas condiciones de estrés (temperatura, nutrientes y nutrientes-temperatura) a los distintos tiempos de incubación (2, 4 y 24 horas), por el método de electroforesis SDS – PAGE, observamos que estos varían cualitativa y cuantitativamente, dependiendo de la condición experimental aplicada.



B Condiciones/ Intensidades

| Peso molecular | Control | Nutrientes | Temperatura | Nutrientes – temperatura |
|----------------|---------|------------|-------------|--------------------------|
| 79,02 | 136,91 | 113,18 | 124,94 | 147,62 |
| 68,75 | 121,34 | 102,25 | 114,03 | 134,76 |
| 53,75 | 119,69 | 96,02 | 108,49 | 123,75 |
| 45,66 | 114,07 | 102,21 | 103,85 | 118,95 |
| 40,89 | 149,35 | 131,76 | 139,69 | 161,70 |
| 36,62 | 135,64 | 109,85 | | 139,35 |
| 34,11 | 149,04 | 122,82 | 119,61 | 134,35 |
| 30,26 | 115,34 | 92,35 | 104,19 | 98,02 |

Figura 1. Perfil proteico del lisado de *T. cruzi* bajo condiciones de estrés de 2 horas (A) Electroforesis SDS – PAGE 10% en condiciones disociantes del lisado de *T. cruzi*, cultivados bajo condiciones de estrés de nutrientes, temperatura, nutrientes- temperatura y control (sin estrés), durante un tiempo de 2 horas. Tabla 1. (B). Peso molecular e intensidades de las bandas mas evidentes separadas en la electroforesis. Analizadas por el programa Quantity one.

Así observamos que en la condición de estrés de nutrientes y de temperatura, la intensidad de las bandas disminuyen, esto al ser comparadas con el control, lo que sugiere que ha comenzado a producirse cambios en el pool de proteínas del parásito, bajo estas condiciones. Por el contrario en la condición de nutrientes-temperatura, observamos una intensidad de las, particularmente aquellas que se encuentran en un rango de pesos moleculares de 73 a 30 KDa, por debajo de esta rango se mantienen bajas con respecto al control (Figura 1, Tabla 1).

Cuando se mantiene la condición de estrés durante 4 horas, igualmente observamos que las intensidades de las bandas son menores que las observadas en el control, exceptuando en las condiciones de temperatura y nutrientes-temperatura, en donde se observa un mayor grado de intensidad en las bandas localizadas entre 50 y 40 KDa (Figura 2, Tabla 2).

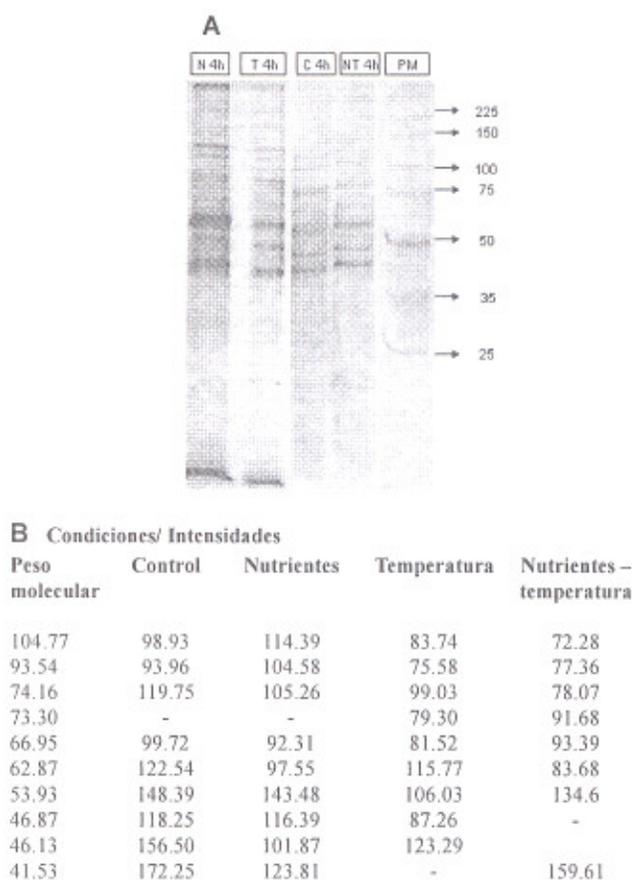


Figura 2. Perfil proteico del lisado de *T. cruzi* bajo condiciones de estrés de 4 horas (A) Electroforesis SDS – PAGE 10% en condiciones disociantes del lisado de *T. cruzi*, cultivados bajo condiciones de estrés de nutrientes, temperatura, nutrientes- temperatura y control (sin estrés), durante un tiempo de 2 horas. Tabla 2.- (B). Peso molecular e intensidades de las bandas mas evidentes separadas en la electroforesis. Analizadas por el programa Quantity One.

Después de 24 horas de transcurrido el estrés, la condición de temperatura afecta de tal manera al parásito, que aumenta la intensidad de las bandas analizadas entre los 92 hasta 39 KDa, y en nutrientes-temperatura las variaciones ocurren en determinadas fracciones, así tenemos aumento entre 70 y 60 KDa y disminución en bandas de 66, 61, 50 y 40 KDa (Figura 3, Tabla 3). Estos resultados sugieren que, dependiendo de las condiciones del entorno del parásito, este va a dirigir su maquinaria a la síntesis y/o degradación de un grupo de proteínas que le permitan a adaptarse al nuevo entorno y así garantizar su supervivencia. Algunas de las proteínas de nueva síntesis, pueden ser HSP, que como se ha descrito actúan en la protección de moléculas importantes para el parásito, desempeñando su rol en situaciones de estrés como es el caso.

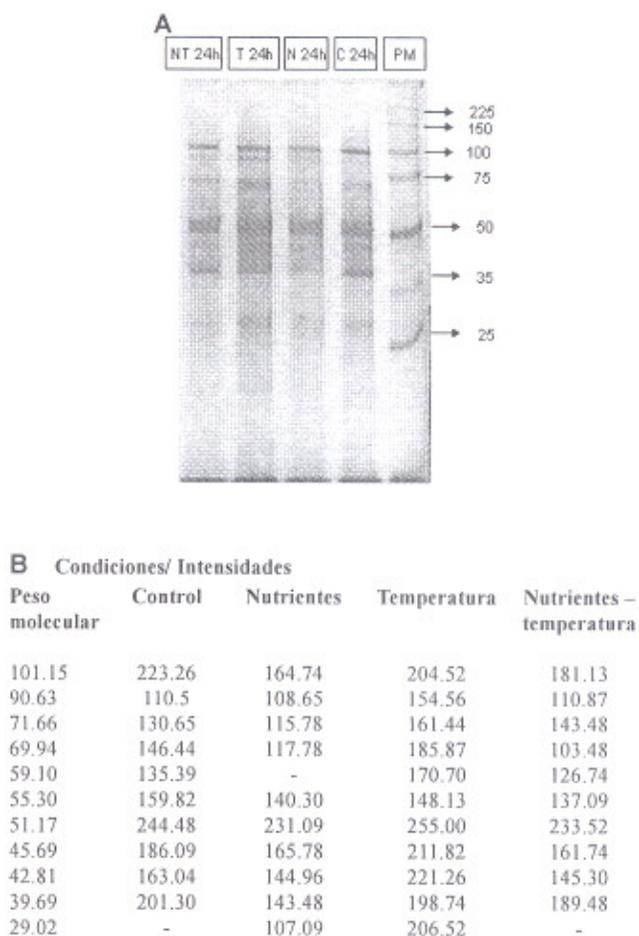


Figura 3. Perfil proteico del lisado de *T. cruzi* bajo condiciones de estrés de 24 horas (A) Electroforesis SDS – PAGE 10% en condiciones disociantes del lisado de *T. cruzi*, cultivados bajo condiciones de estrés de nutrientes, temperatura, nutrientes- temperatura y control (sin estrés), durante un tiempo de 2 horas. Tabla 3.- (B). Peso molecular e intensidades de las bandas mas evidentes separadas en la electroforesis. Analizadas por el programa Quantity one.

Determinación de HSP70 en los lisados de *T. cruzi* se enfrentaron los lisados de *T. cruzi*, obtenidos bajo las distintas condiciones experimentales, contra anticuerpos anti-HSP70, con la finalidad de detectar la presencia de dicha proteína y a su vez, determinar la condición experimental donde se expresa en mayor proporción; además se decidió enfrentar las muestras, a pool de sueros de pacientes positivos para la enfermedad Chagas, debido a que se ha descrito que en estos pacientes se han encontrado anticuerpos capaces de reconocer la HSP70 del parásito (9) y queremos evaluar si cambian el patrón de reconocimiento bajo las distintas condiciones de estrés. Así, se orientó este ensayo a evaluar si había reconocimiento dentro del rango de pesos moleculares que corresponde con la proteína de interés (80 – 60 KDa) y determinar si este varía según la condición analizada.

Los resultados obtenidos indican, que la HSP70 esta presente en todos los lisados de *T. cruzi*, obtenidos bajo las distintas condiciones experimentales, pero al hacer el análisis de las bandas de reconocimiento se encontró, que la intensidad de estas varía dependiendo de la condición de estrés, lo que es indicativo de que la expresión de HSP70, depende del estrés aplicado y el tiempo empleado.

Podemos observar que ya a las 2 horas de incubación bajo las distintas condiciones de estrés, existe un aumento de HSP70, condición que se mantiene a lo largo del tiempo, (4 y 24 horas); además de reconocer bandas entre 80 y 60 KDa, rango de pesos descritos para la familia de HSP70, también hay reconocimiento en regiones de menor peso molecular (50 – 30 KDa), ocurriendo este hecho sólo en las situaciones en que el parásito esta siendo estresado; así para el tiempo de 2 horas estas bandas de menor peso se observaron en todas las condiciones de estrés, a 4 horas en nutrientes y nutrientes-temperatura; y para 24 horas sólo en la condición de nutrientes (Figuras 4, 5, 6 A). Estos pequeños cambios son compatibles con los observados en el perfil electroforético, donde las bandas de proteínas dentro del rango entre 50 y 30 KDa son unas de las más intensas.

Cuando se observó el perfil de reconocimiento del pool de sueros positivos, enfrentado a los lisados de *T. cruzi*, es evidente que hay variación de las proteínas reconocidas bajo las distintas condiciones de estrés (Figuras 4, 5 y 6 A). Es de señalar que dentro de las proteínas reconocidas por el pool positivo, hay algunas que se encuentran en la zona de peso molecular de la HSP70, inclusive se presentan como bandas de gran intensidad, lo que puede indicar que los sueros de pacientes positivos reconocen las HSP70 que se encuentran en los lisados de *T. Cruzii*, y varían dependiendo de la condición de estrés utilizada. Sin embargo es necesario confirmar este reconocimiento con el anticuerpo específico, lo cual esta planteado en trabajos futuros. Otro punto importante que mencionar, es que según los datos obtenidos, la condición de estrés de nutrientes aplicado por un tiempo de 4 horas, es donde se

encontró mayor expresión de HSP70, por lo cual fue la escogida para purificar la proteína de interés, estableciendo de esta manera un protocolo a seguir para futuros estudios que requieran inducción de HSP.

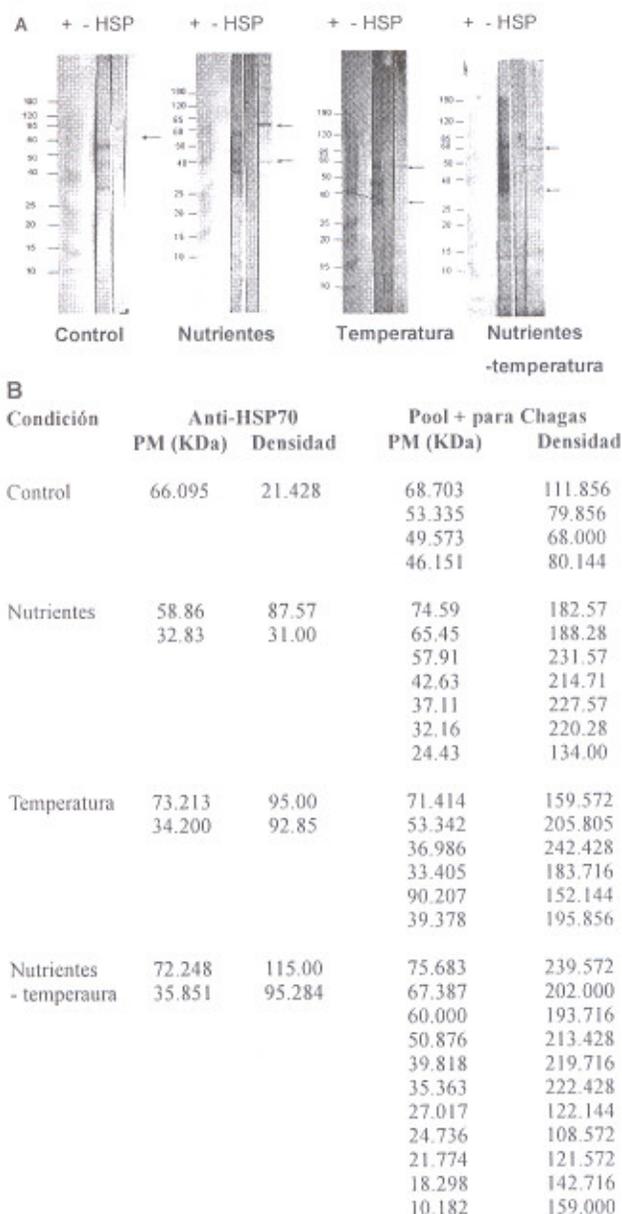
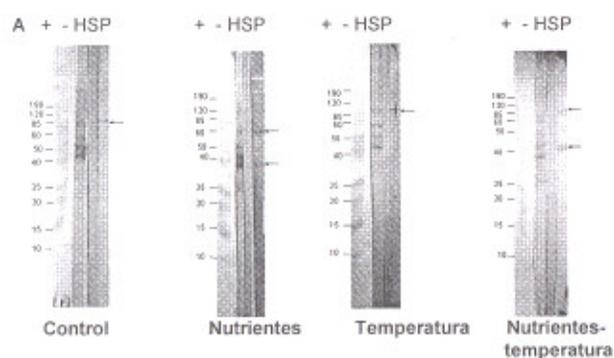


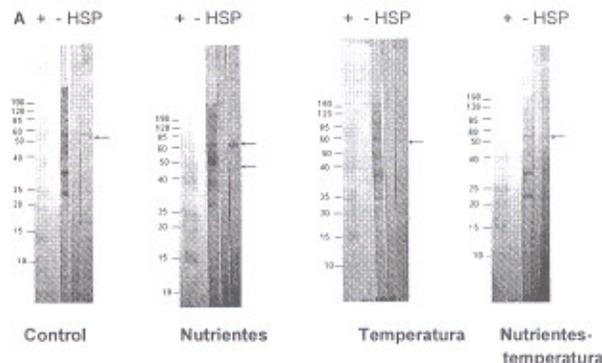
Figura 4. (A) Inmunoblot de las condiciones de estrés de 2 horas. Se observa los inmunoblot de las muestras sometidas a estrés de una duración de 2 horas y el del control (sin estrés). Se usó un pool de suero de pacientes con serología positiva para Chagas (+), un pool de suero negativo para el Chagas (-) y un anticuerpo contra HSP70 (HSP), en ese orden (de izquierda a derecha) respectivamente. Tabla 4.- (B) Pesos moleculares y densidad de las bandas reconocidas por los anticuerpos anti-HSP70 y Pool de sueros positivos para Chagas respectivamente.



B

| Condición | Anti-HSP70 | | Pool + para Chagas | |
|--------------------------|------------|----------|--------------------|----------|
| | PM (KDa) | Densidad | PM (KDa) | Densidad |
| Control | 94.406 | 158.000 | 497.122 | 131.000 |
| | | | 230.301 | 130.428 |
| | | | 187.980 | 136.144 |
| | | | 156.751 | 140.284 |
| | | | 132.115 | 127.144 |
| | | | 106.436 | 136.856 |
| | | | 90.254 | 160.572 |
| | | | 54.573 | 149.284 |
| | | | 47.729 | 175.144 |
| | | | 40.751 | 192.000 |
| Nutrientes | 71.060 | 119.716 | 80.073 | 132.000 |
| | | | 48.932 | 154.000 |
| | | | 59.250 | 150.284 |
| | | | 52.911 | 185.000 |
| | | | 48.581 | 205.428 |
| Temperatura | 64.650 | 135.428 | 91.230 | 134.856 |
| | | | 58.315 | 147.000 |
| | | | 52.153 | 137.144 |
| | | | 42.843 | 161.572 |
| | | | 29391 | 137.716 |
| Nutrientes - temperatura | 86.977 | 92.572 | 373.990 | 168.856 |
| | | | 44.366 | 58.716 |
| | | | 204.298 | 142.284 |
| | | | 79.874 | 115.856 |
| | | | 48.431 | 125.856 |
| | | | 40.320 | 160.144 |
| | | | 29.489 | 119.716 |

Figura 5. (A) Inmunoblot de las condiciones de estrés de 4 horas. Se observa los inmunoblot de las muestras sometidas a estrés de una duración de 2 horas y el del control (sin estrés). Se usó un pool de suero de pacientes con serología positiva para Chagas (+), un pool de suero negativo para el Chagas (-) y un anticuerpo contra HSP70 (HSP), en ese orden (de izquierda a derecha) respectivamente. Tabla 5.- (B) Pesos moleculares y densidad de las bandas reconocidas por los anticuerpos anti-HSP70 y Pool de sueros positivos para Chagas respectivamente.



B

| Condición | Anti-HSP70 | | Pool + para Chagas | |
|--------------------------|------------|----------|--------------------|----------|
| | PM (KDa) | Densidad | PM (KDa) | Densidad |
| Control | 54.021 | 87.284 | 216.090 | 75.144 |
| | | | 126.803 | 79.284 |
| | | | 88.320 | 81.428 |
| | | | 65.022 | 108.144 |
| | | | 53.427 | 122.572 |
| | | | 39.555 | 152.856 |
| | | | 31.271 | 112.000 |
| | | | 27.649 | 137.572 |
| | | | 85.000 | 98.428 |
| | | | 60.618 | 79.284 |
| Nutrientes | 85.000 | 98.428 | 187.449 | 178.856 |
| | | | 168.239 | 182.000 |
| | | | 148.970 | 170.856 |
| | | | 110.088 | 171.284 |
| | | | 90.677 | 203.428 |
| | | | 76.723 | 171.000 |
| | | | 71.414 | 178.144 |
| | | | 65.124 | 179.000 |
| | | | 58.527 | 169.572 |
| | | | 50.416 | 171.428 |
| Temperatura | 80.206 | 77.176 | 47.561 | 161.716 |
| | | | 45.415 | 156.716 |
| | | | 43.199 | 163.284 |
| | | | 211.256 | 96.284 |
| | | | 186.671 | 114.856 |
| | | | 143.199 | 108.572 |
| | | | 80.206 | 116.000 |
| | | | 56.102 | 107.716 |
| | | | 42.510 | 107.716 |
| | | | 24.283 | 95.284 |
| Nutrientes - temperatura | 72.150 | 98.000 | 196.836 | 113.716 |
| | | | 148.351 | 119.856 |
| | | | 115.722 | 136.572 |
| | | | 73.643 | 163.572 |
| | | | 50.920 | 155.144 |
| | | | 34.005 | 211.856 |
| | | | 25.215 | 224.000 |

Figura 6. (A) Inmunoblot de las condiciones de estrés de 24 horas. Se observa los inmunoblot de las muestras sometidas a estrés de una duración de 2 horas y el del control (sin estrés). Se usó un pool de suero de pacientes con serología positiva para Chagas (+), un pool de suero negativo para el Chagas (-) y un anticuerpo contra HSP70 (HSP), en ese orden (de izquierda a derecha) respectivamente. Tabla 6.- (B) Pesos moleculares y densidad de las bandas reconocidas por los anticuerpos anti-HSP70 y Pool de sueros positivos para chagas respectivamente.

Purificación parcial de HSP70 para el aislamiento de la fracción correspondiente con la proteína de choque térmico de 70 KDa, se escogió la condición de 4 horas de escasez de nutrientes, la densitometría demostró que el pico de la banda reconocida por los anticuerpos anti-HSP70 fue mayor que en el resto de las condiciones, una vez establecida la condición experimental, se procedió a la purificación parcial de la HSP70, tal y como se describió en materiales y métodos.



Figura 7. Immunoblot de la fracción soluble S1 obtenida del lizado de *Trypanosoma cruzi* ultracentrifugado bajo la condición de estrés de nutrientes en un tiempo de 4 horas que se enfrentó contra anti-HSP70; se puede apreciar el perfil de bandas que corresponden a epítopes compartidos con HSP70 que tienen distintos pesos moleculares, comparado con el immunoblot de los lizados de *T. cruzi*, sin purificar bajo las mismas condiciones experimentales.

Una vez obtenido el sobrenadante 1, se evaluó mediante el método de immunoblot con los anticuerpos anti-HSP70, los resultados obtenidos evidenciaron bandas de reconocimiento intensa lo que indicó que la proteína estaba presente en concentraciones elevadas (Figura 7).

Discusión

Tomando en cuenta la importancia que ha adquirido la enfermedad de Chagas, tanto en América Latina como en Venezuela, por ser un problema de salud pública que afecta principalmente a individuos de zonas rurales y de bajo estrato socioeconómico, se han venido estudiando diversas moléculas de *T. cruzi*, entre las cuales encontramos las HSP70, así, se describió esta proteína como antígeno dominante en el parásito (9), y como molécula adyuvante al inducir estimulación de células dendríticas al ser aplicada ligada a un péptido (7). Según el planteamiento de estos autores, la HSP70 de *T. cruzi*, posee las características necesarias para ser usadas como moléculas para inmunoterapia y/o inmunoprolifaxis. Este trabajo se orienta a la evaluación de distintas condiciones de estrés,

con la finalidad de aumentar la expresión de HSP y determinar la condición más adecuada, para un aislamiento más eficiente de dichas proteínas.

Los resultados obtenidos sugieren que las variaciones en el entorno del parásito hacen que este modifique de alguna manera su perfil proteico ya sea por aumento o disminución de cierto grupo de proteínas, y se sugiere que dentro de las que se sintetizan de novo se encuentran las HSP70. Además, al evaluar el perfil de reconocimiento de los lizados de *T. cruzi*, con anticuerpos anti-HSP70, se evidenció reconocimiento en la zona de peso molecular esperada (80 – 70 KDa), y una banda de menor peso molecular aproximadamente 30 KDa. En este sentido se ha reportado por análisis proteómico del parásito la presencia de péptidos ubicados en un rango de pesos moleculares de 25 a 30 KDa en electroforesis de 2 dimensiones, que fueron identificados como HSP70, por análisis de secuencia peptídica (Parodi y col. 2004); lo cual sugiere que estos péptidos pueden ser de nueva síntesis o de recambio. También encontramos que el pool de sueros positivos reconoce bandas en la zona de peso molecular de la HSP70, lo cual ha sido reportado previamente, en trabajos que describen la HSP70 de *T. cruzi*, como antígeno dominante durante la infección (Marañón 2001).

Referencias

1. WHO Technical Report Series. Control of Chagas' diseases. 2002.
2. Añez N, Crisarte G, Rojas A, Díaz N, Añez R, Carrasco H, et al. La Cara Oculta de la enfermedad de Chagas en Venezuela. Boletín de Malariología y Salud Ambiental. Volumen XLIII. Número 2003:2: 45-57.
3. Rodríguez G, Caro A. Apuntes Científicos Uniandinos. Universidad de Cali, Colombia. 2002.
4. Craig E, Weissman J and Horwich A. Heat Shock Proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. Cell. 1994;78, 365-372.
5. Srivastava P. Roles of Heat-Shock Proteins in Innate and Adaptive Immunity. Nature Reviews Immunology 2002;2, 185-194.
6. Wang HH, Mao CY, Teng LS, Cao J. Recent advances in heat shock protein-based cancer vaccines. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. Feb; 2006;5(1):22-7.
7. Planelles L, Thomas C, Alonso C y Lopez M. DNA Immunization with *Trypanosoma cruzi* HSP70 Fused to the KMP11 Protein Elicits a Cytotoxic and Humoral Immune Response against the Antigen and Leads to Protection. Infection and Immunity. 2001;p. 6558–6563 Vol. 69, No. 10.
8. Srivastava P. Therapeutic cancer vaccines. Curr Opin Immunol. Apr; 2006;18(2):201-5.
9. Marañón C, Thomas M, Patarroyo M and Lopez M. Identificación de epítopes T citotóxicos restringidos a la molécula de HLA-A2 en la proteína HSP70 de *T. cruzi*. Ars Pharmaceutica. 2001;42:1; 67-80.
10. Lindquist S and Craig E. The heat shock proteins. Annu Rev Genet 1998;22, 631-677.

11. Morimoto R. Regulation of heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 1998;12, 3788-3796.
12. Kaufmann S and Schoel B. Heat shock proteins as antigens in immunity against infection and self. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.* 1994:495- 531.
13. Sebastian EB, Graefe Martina Wiesgigl, Iris Gaworski, Andrea Macdonald, and Joachim Clos. Inhibition of HSP90 in *Trypanosoma cruzi* Induces a Stress Response but No Stage Differentiation. *Eukariotic cell.* 2002;936-943.
14. Requena JM, Soto M, Guzman F, Mackelt A, Noya O, Patarroyo ME et al. Mapping of antigenic determinants of the *T. cruzi* hsp70 in chagasic and healthy individuals. *Mol Immunol* 1993;30(12): 1115-1121.
15. Hiroshi B, Tatsuya Sakurai, Noboru Inoue, Chihiro Sugimoto, and Ikuo Igarashi. Cloning and Expression of Mitochondrial Heat Shock Protein 70 of *Trypanosoma congolense* and Potential Use as a Diagnostic Antigen. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.*2003;Vol 10 N° 5: 926-993.
- 16.- Matsutake T & Srivastava PK. CD91 is involved in MHC class II presentation of gp96-chaperoned peptides. *Cell Stress Chaperones* 2000;5, 378.
17. Castellino F. *et al.* Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways. *J Exp Med.* 2000;191, 1957-1964.
18. Basu, S, Binder RJ, Ramalingam T & Srivastava PK. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 2001;14, 303-313.



Antropometría materna y porcentaje de grasa corporal como métodos para evaluación nutricional durante el embarazo

Próspero Alberto Rojas Martínez ¹, José Yoel Guzmán Carrión ², María del Carmen Jorge Álvarez ², Blanca Sonia Guerrero Chacón ³, Marta Hurtado Pulyoza ⁴, Anna Sarracino Metròpoli ⁵, José A. López Mora ⁶

Servicio de Obstetricia, Maternidad "Santa Ana", IVSS, Caracas

RESUMEN

La Impedancia Bioeléctrica (IBE) es un método de evaluación nutricional que permite determinar el porcentaje de grasa corporal inocuamente. El objetivo de este trabajo es determinar si la IBE es un método válido para identificar pacientes embarazadas con riesgo ponderal, comparado con la antropometría materna convencional (IMC o índice de masa corporal). 156 puérperas sanas, con embarazos simples a término y partos normales, a quienes se les determinó peso, talla e IMC; y a sus neonatos peso, talla e índice ponderal (IP). Se correlacionaron y analizaron estadísticamente todas las variables entre sí. El porcentaje de grasa corporal resultó hasta seis veces más sensible en la detección de desnutrición neonatal (IP menor de 2,26 y peso al nacer menor de 3.000g) comparativamente con el IMC. El porcentaje de grasa corporal medido por IBE por su mayor sensibilidad, representa un mejor método de evaluación nutricional, para detectar gestantes con riesgo ponderal.

Palabras clave: Evaluación nutricional, antropometría, impedancia bioeléctrica, grasa corporal, embarazo.

Maternal anthropometry and percentage of body fat as methods for nutritional evaluation during pregnancy

SUMMARY

Bioelectrical impedance (BIA) is a nutritional evaluation method that allows to determine body fat percentage in a non invasive, non aggressive way. The aim of this paper was to establish if BIA is a valid method to identify pregnant women with weight risks, compared to maternal conventional anthropometrics (BMI or body mass index). We enrolled 156 healthy pregnant women with complete pregnancies, and normal deliveries. Were examined height, weight and body mass Index and their newborns concerning weight, height and weight index. All data was analyzed statistically, all variables between themselves. Body fat percentage was six times more sensitive to detect neonatal sub nutritional values (weight index 2,26 and birth weight less than 3.000 Gr.) when compared to body mass index. Body fat percentage measured by BIA, because of its greater sensibility resulted a better nutritional evaluation method for pregnant women with weight risk.

Keys words: Nutritional evaluation, anthropometrics, bioelectrical impedance, body fat, pregnant.

1. Médico Cirujano, Especialista en Obstetricia y Ginecología, Cursante de la Maestría en Ciencias Médicas – Mención: "Obstetricia" – UCV. 2. Médico Cirujano, Especialista en Obstetricia y Ginecología. 3. Médico Cirujano, Especialista en Obstetricia y Ginecología, Perinatólogo. 4. Licenciada en Nutrición Clínica en Endocrinología. 5. Médico Cirujano, Especialista en Obstetricia y Ginecología, Adjunto Docente - Postgrado de Obstetricia y Ginecología - Maternidad Santa Ana – IVSS. 6. Médico Cirujano, Especialista en Obstetricia y Ginecología, Profesor Agregado y Jefe de Cátedra – Clínica Obstétrica A – Escuela de Medicina "Dr. Luis Razetti" – UCV.

Solicitar copia a: Próspero Alberto Rojas Martínez: parm66@cantv.net

Introducción

El embarazo es un proceso fisiológico que determina un aumento de los requerimientos nutricionales de la madre y establece la necesidad de un mayor y mejor aporte dietético (1). Este incremento en las necesidades nutricionales, ha de cubrir tanto el crecimiento y desarrollo del feto, como los cambios que experimentan la estructura y el metabolismo de la madre (2).

El crecimiento fetal, normalmente depende de la unidad materno-placentaria-fetal, y de ella el factor materno es el más frecuentemente asociado con el crecimiento fetal; por tanto el estado nutricional de la mujer, es un elemento de gran interés clínico. Por tanto, son de suma importancia, el conocimiento del peso materno preconcepcional, la ganancia de peso durante el mismo, y los componentes de la ganancia de peso materna y fetal, específicamente las reservas grasa (3).

La grasa es considerada un componente fundamental por varias razones: 1) representa una importante fuente y reserva de energía, de hecho, los adipositos contienen 80% de lípidos por unidad de peso, aportando los lípidos el doble de energía (9Kcal/g) que los carbohidratos o las proteínas, 2) es componente esencial de la membrana celular y del tejido adiposo, 3) matriz química de hormonas y vitaminas, 4) protección de órganos internos y regulación térmica.

Durante el embarazo aumentan las reservas de tejido adiposo, gracias al cual se asegura un aporte energético constante al feto en crecimiento, estableciéndose que en situaciones normales de nutrición, las embarazadas acumulan al menos un 10% de su peso en forma de grasa. Asimismo, aumentan fisiológicamente los niveles de triglicéridos y colesterol (4).

Sohlstrom y Forsum (5), midiendo por resonancia magnética el volumen y distribución del tejido adiposo durante el embarazo y la lactancia en embarazadas normales, demostraron que el tejido adiposo se incrementa un promedio de 3 a 4 kilos, acumulándose el 68% en el tronco, 16 % en los muslos y el resto en otras partes del cuerpo.

Existen evidencias que señalan que después de cierto límite, la grasa de la madre no es usada para seguir aumentando el peso y la talla del recién nacido (4).

Epidemiológicamente está bien documentada la relación peso-talla de la madre antes del embarazo, como un factor determinante del crecimiento fetal, incluso de mayor relevancia que la ganancia de peso durante el embarazo. Así, los hijos de las mujeres delgadas son más pequeños que los de las mujeres con sobrepeso, estableciéndose un factor de riesgo (6).

Se hace muy importante el establecer una estrategia

metodológica para la evaluación nutricional durante el embarazo, que tenga como objetivo el identificar embarazadas con riesgo ponderal, de manera de poder realizar una intervención nutricional adecuada.

Además de el estudio de consumo y cálculo del porcentaje de adecuación, la evaluación nutricional durante el embarazo se puede realizar a través de "marcadores nutricionales", entre los cuales tenemos 1) medidas antropométricas (peso/talla, pliegues cutáneos, circunferencia braquial), 2) Impedancia Bioeléctrica, y 3) determinaciones proteínicas: albúmina, hemoglobina y recuento linfocitario (7).

El método antropométrico incluye el cálculo del Peso Teórico Ideal (PTI) para una talla determinada, para lo cual existen algunas fórmulas (8).

Estudios realizados por Viegas y colaboradores (9) demostraron que el IMC es el método que mejor correlaciona el estado nutricional materno y fetal. Se obtiene a través de la fórmula $IMC = \text{peso (kg.)} / \text{talla}^2 \text{ (mts)}$, considerándose como valores normales entre 19 y 24. Para obtener el PTI se emplea la fórmula $PTI \text{ (kg.)} = 20 \times \text{Talla}^2 \text{ (mts)}$ (8).

Para cualquiera de las fórmulas que se emplee, se considera: 1) riesgo de desnutrición cuando el peso actual es 10% inferior al PTI y 2) riesgo de obesidad: cuando el peso actual es 20% superior al PTI (8).

Ahora bien, para evaluar el estado nutricional de una embarazada por antropometría, se debe ajustar el peso de acuerdo a la edad gestacional de dos formas: 1) calculando el PTI según su talla y agregar el aumento de peso que corresponde para la edad gestacional que tenga en ese momento, ó 2) a efectos de esta investigación, si el peso real de la embarazada es 10% inferior al así determinado, se catalogará como desnutrida, y si el peso real es 20% superior se catalogará como obesa (8).

En la Consulta Prenatal del Servicio de Gineco-Obstetricia 2 del Hospital "Antonio María Pineda", se emplea una tabla de peso ideal, validada en términos de correlación con el estado nutricional del recién nacido (8,10), con el ajuste por edad gestacional (Tabla 1), la cual toma como PTI un IMC de 20 (kg/m^2), y se considera como ganancia propia del embarazo 1,6 kg./mes los últimos dos trimestres.

Utilizando los mismos parámetros de evaluación del PTI para los recién nacidos (desnutrición un peso menor del 10% y obesidad un peso mayor del 20%), se elaboró la tabla de Peso Ideal del Recién Nacido, fundamentándose en un Índice Ponderal Ideal (IP) = 2,5 calculado por la fórmula $IP = \text{peso (g)}/\text{talla (cm.)} \times 100$ (8) (Tabla 2).



Tabla 1

| TABLAS DE PESO IDEAL PARA LA TALLA | | | | | |
|------------------------------------|----------------------|-------------------|-------------|-------------------|---------------|
| TALLA (cm) | INDICE MASA CORPORAL | | | EMBARAZADAS (**) | |
| | BAJO < 10 % | NORMAL P.T.I. (*) | ALTO > 20 % | Semanas Gestación | Peso Ajustado |
| | Desnutrida | Kg | Obesa | | PTI+0,0 |
| 146 | 38.4 | 42.6 | 51.2 | 10 | |
| 148 | 39.4 | 43.8 | 52.6 | 12 | 0,8 |
| 150 | 40.5 | 45.0 | 54.0 | 14 | 1,6 |
| 152 | 41.6 | 46.2 | 55.4 | 16 | 2,4 |
| 154 | 42.7 | 47.4 | 56.9 | 18 | 3,2 |
| 156 | 43.8 | 48.7 | 58.4 | 20 | 4,0 |
| 158 | 44.9 | 49.9 | 59.9 | 22 | 4,8 |
| 160 | 46.1 | 51.2 | 61.4 | 24 | 5,6 |
| 162 | 47.2 | 52.5 | 63.0 | 26 | 6,4 |
| 164 | 48.4 | 53.8 | 64.6 | 28 | 7,2 |
| 166 | 49.6 | 55.1 | 66.1 | 30 | 8,0 |
| 168 | 50.8 | 56.4 | 67.7 | 32 | 8,8 |
| 170 | 52.0 | 57.8 | 69.4 | 34 | 9,6 |
| 172 | 53.3 | 59.2 | 71.0 | 36 | 10,4 |
| 174 | 54,5 | 60,6 | 72,7 | 38 | 11,2 |
| 176 | 55,8 | 62,0 | 74,4 | 40 | 12,0 |
| 178 | 57,1 | 63,4 | 76,1 | 41 | 12,4 |

Tabla 2

| PESO IDEAL DEL RECIÉN NACIDO CON RELACIÓN A LA TALLA | | | |
|--|-------------------------------|------------------|-------------------------|
| Talla (cm) | <10 % (IP 2,25) (Desnutridos) | PTI (*) (gramos) | > 20% (IP 3,0) (Obesos) |
| 47 | 2.336 | 2.596 | 3.115 |
| 48 | 2.488 | 2.764 | 3.312 |
| 49 | 2.647 | 2.941 | 3.529 |
| 50 | 2.812 | 3.125 | 3.750 |
| 51 | 2.985 | 3.316 | 3.979 |
| 52 | 3.164 | 3.515 | 4.218 |
| 53 | 3.350 | 3.722 | 4.466 |
| 54 | 3.543 | 3.937 | 4.724 |
| 55 | 3.743 | 4.159 | 4.991 |

Otro método de evaluación nutricional validado es la Impedancia Bioeléctrica (IBE), a través del cual podemos determinar el porcentaje de grasa corporal, otros componentes libres de grasa y agua corporal total. La técnica se basa fundamentalmente en la respuesta que los tejidos biológicos presentan, en función de sus propiedades físico-químicas, al paso de una corriente eléctrica alterna de baja intensidad. La IBE ofrece información relativa a dos componentes principales: (a) un componente resistivo, correspondiente a los líquidos intra y extracelular, y (b) un componente capacitivo, correspondiente a la pared celular (11). Es un método ideal para grupos poblacionales, ya que es fácil de realizar, práctico, reproducible e inocuo para la paciente embarazada y para el feto (8).

El porcentaje de grasa corporal puede oscilar entre un 18 y un 28% en mujeres con peso normal; sin embargo, durante el embarazo, este porcentaje puede aumentar entre un 8 y un 12% (8) (Tabla 3).

Tabla 3. % Grasa corporal por IBE.

| Edad | Varones | Hembras | Embarazo |
|----------|---------|---------|----------|
| <30 años | 16-24% | 18-26% | 28-36% |
| >30 años | 18-26% | 20-28% | 30-38% |

Esta investigación tiene como justificación:

1. La necesidad de disponer de un método de evaluación nutricional sensible y específico, que permita identificar a las embarazadas de riesgo ponderal, de manera precoz y continua; que sea muy fácil de realizar, práctico, reproducible e inocuo para la madre y para el feto, de manera que sea ideal para grupos poblacionales.
2. La disminución tan significativa que se ha venido observando en nuestro país, en el promedio de peso del niño al nacer; generado probablemente, por factores socioeconómicos, que inciden en el estado nutricional de la madre.
3. La escasa literatura, en el uso de la impedancia bioeléctrica, como método de evaluación nutricional durante el embarazo.
4. El desconocimiento parcial y mal manejo nutricional de las pacientes embarazadas que acuden a nuestras Maternidades, por parte de los médicos que laboramos en ellas.

Material y métodos

Se realizó un estudio prospectivo, correlativo, no experimental de una población constituida por 156 pacientes púerperas de los Servicios de Hospitalización de la Maternidad "Santa Ana" IVSS - Caracas, así como de sus neonatos; en el lapso comprendido entre abril y junio del 2006.

Criterios de inclusión

- Pacientes púerperas sanas (post parto vaginal) sin patología médica de base;
- Recién nacidos sanos, producto de embarazos entre 37 y 42 semanas por FUR y corroborados por ecosonografía obstétrica previa y Capurro;
- Consentimiento verbal de las pacientes.

Criterios de exclusión:

- Enfermedades maternas asociadas: hipertensión arterial crónica, hipertensión inducida por el embarazo, diabetes, patologías tiroideas, collagenopatías, cardiopatías;

- Consumo de drogas ilícitas;
- Antecedentes personales de hábitos tabáquicos acentuados;
- Diagnóstico de retardo del crecimiento intrauterino;
- Diagnóstico de eritroblastosis fetal;
- Recién nacidos con alguna patología de base;
- Recién nacidos producto de embarazos menores de 37 semanas y/o no coincidentes con Capurro;
- El no consentimiento de la paciente para su inclusión en el estudio.

De toda la población estudiada y que cumplió con los criterios de inclusión en el presente estudio, se obtuvieron datos tales como edad materna, edad gestacional del embarazo actual calculado por FUR (corroborado por ecosonografía obstétrica) y hábitos psicobiológicos. Igualmente se trabajó con el Método de Graffar (Tabla 4), modificado por el Dr. Méndez Castellano para evaluar nivel socioeconómico.

Tabla 4

METODO DE GRAFFAR

MODIFICADO POR MENDEZ CASTELLANO

| PTJE | PROFESIÓN DEL JEFE DE LA FAMILIA | NIVEL DE INSTRUCCIÓN DE LA MADRE | FUENTE DE INGRESOS | CONDICIONES DE ALOJAMIENTO |
|------|--|---|--|--|
| 1 | <ul style="list-style-type: none"> • UNIVERSITARIO • ALTO COMERCIANTE • OFICIAL DE LAS FUERZAS ARMADAS • CARGOS GERENCIALES ALTA DIRECCION | <ul style="list-style-type: none"> • UNIVERSITARIA O EQUIVALENTE | <ul style="list-style-type: none"> • FORTUNA HEREDADA ADQUIRIDA | <ul style="list-style-type: none"> • OPTIMAS CONDICIONES SANITARIAS, AMBIENTE DE LUJO |
| 2 | <ul style="list-style-type: none"> • TÉCNICO | <ul style="list-style-type: none"> • SECUNDARIA COMPLETA • ESCUELA TECNICA | <ul style="list-style-type: none"> • HONORARIOS O GANANCIAS | <ul style="list-style-type: none"> • OPTIMAS CONDICIONES SANITARIAS, AMBIENTE SIN LUJO, ESPACIOSO |
| 3 | <ul style="list-style-type: none"> • EMPLEADOS • PEQUEÑOS COMERCIANTES | <ul style="list-style-type: none"> • SECUNDARIA INCOMPLETA • TÉCNICO INFERIOR | <ul style="list-style-type: none"> • SUELDO MENSUAL | <ul style="list-style-type: none"> • BUENAS CONDICIONES SANITARIA, ESPACIO REDUCIDO |
| 4 | <ul style="list-style-type: none"> • OBREROS ESPECIALIZADOS | <ul style="list-style-type: none"> • ED. PRIMARIA O ALFABETICA | <ul style="list-style-type: none"> • SALARIO SEMANAL DIARIO | <ul style="list-style-type: none"> • DEFICIENCIAS EN ALGUNAS CONDICIONES SANITARIAS |
| 5 | <ul style="list-style-type: none"> • OBREROS NO ESPECIALIZADOS | <ul style="list-style-type: none"> • ANALFABETA | <ul style="list-style-type: none"> • DONACIONES PUBLICAS O PRIVADAS | <ul style="list-style-type: none"> • RANCHO |

Se infirió la normalidad del embarazo por la revisión de las referencias y/o tarjeta de control prenatal, de la historia clínica de hospitalización y del examen físico puerperal.

La normalidad del recién nacido fue determinada a través del examen físico, conjuntamente con la evaluación de la edad gestacional por el Método de Capurro.

Tanto madres como neonatos fueron medidos y pesados en las primeras 24 horas de asistidos los partos, siendo realizadas todas las medidas por el mismo observador.

Las madres fueron talladas y pesadas y se les determinó simultáneamente el % de grasa corporal por la balanza digital "Body Fat Scale Tanita Mod, Tanita Corp., Tokio, Japón".

Los neonatos se pesaron en una balanza "Detecto, modelo Baby-Scale", calibrada con pesas de hierro de 10 y 50 g, siendo medidos con cinta métrica.

El Índice de Masa Corporal (IMC) se calculó a través de la fórmula: $IMC = \text{peso (kg)}/\text{talla}^2(\text{m})$, estableciéndose como valores normales entre 21 y 29, considerándose como desnutridas con valores menores de 21, y obesas con valores mayores de 29.

El Índice Ponderal (IP) se calculó por la fórmula: $IP = \text{peso (g)} \times 100/\text{talla}^3 (\text{cm.})$, trabajándose con la tabla de peso ideal del recién nacido, según se establece como IP ideal el valor de 2,5 y cuando este valor ideal se desvía en menos de 10% se habla de desnutrición y cuando lo hace más de 20% se habla de obesidad, dando un valor normal para el IP entre 2,26 y 2,99.

Los datos fueron tabulados, y el análisis estadístico se llevó a cabo mediante medidas de tendencia central: media más desviación estándar (DS) y rango; frecuencias absolutas y porcentajes, comparados a través de la t de Student para una p menor de 0,05.

Resultados

Analicemos primero las características generales de la muestra estudiada y la correlación de estas con el IMC y el porcentaje de grasa corporal (Tabla 5).

Tabla 5

| | Promedio | Desv. Estándar | Rango | Coeficiente de Correlación "r" | |
|---------------------------------|----------|----------------|-------------|--------------------------------|----------|
| | | | | IMC | % Grasa |
| Edad | 24,97 | 6,11 | 14-43 | 0,24(s) | 0,28 |
| Graffar | 13 | 2,17 | 8-7 | 0,03 | -0,11 |
| Edad Gestacional | 275,42 | 6,69 | 260-294 | 0,01 | 0,06 |
| Antropometría Materna | | | | | |
| Talla | 1,57 | 0,05 | 1,42-1,71 | 0,04 | -0,01 |
| Peso | 64,58 | 10,13 | 43,3-90,5 | 0,91(s) | 0,61 (s) |
| IMC | 26,03 | 3,64 | 17,79-36,91 | 1,00 | 0,68 (s) |
| % Grasa | 37,55 | 8,81 | 21-56 | 0,68(s) | 1,00 |
| Antropometría del Recién Nacido | | | | | |
| Talla RN | 50,74 | 1,93 | 45-56 | 0,18(s) | 0,12 |
| Peso RN | 3.266,60 | 383,36 | 2300-4520 | 0,22(s) | 0,12 |
| IP | 2,50 | 0,25 | 2,03-3,56 | 0,06 | -0,0012 |

(s) = significativo

La edad, peso y porcentaje de grasa corporal, así como la talla y el peso del RN, están correlacionados con el índice de masa corporal (cada una en distinto grado), siendo la correlación más destacable la del peso materno. Con el porcentaje de grasa corporal, las variables correlacionadas son el peso y el IMC, ambas en la misma proporción. El peso materno es entonces la variable que más se correlaciona con



las medidas utilizadas para medir nutrición materna. Se debe notar, que el porcentaje de grasa no se calcula a través de una fórmula en la que intervenga la talla y el peso, sino que se mide directamente.

El efecto de correlación observado entre los valores del RN y el IMC materno, a pesar de ser significativo en probabilidad, no es muy fuerte ($r < 0,6$), por lo que no debe ser tomado como importante en el análisis de las dos variables.

Al distribuir a las madres según su estado nutricional por IMC (Tabla 6), se observó que entre las pacientes desnutridas y las normales, son significativas las diferencias entre el peso materno, IMC, porcentaje de grasa corporal materno y la talla del recién nacido; en tanto que entre las pacientes normales y las obesas, resultó significativa la diferencia pero con el peso del recién nacido y no con su talla. Esta diferencia, pone de manifiesto nuevamente la relación que existe entre el IMC y dichas variables.

Tabla 6

| | Desnutridas (1) | Normales (2) | P (1 vs 2) | Obesas (3) | P (2 vs 3) |
|----------|-----------------|--------------|------------|------------|------------|
| N° | 5 | 45 | | 106 | |
| Peso | 49,90 | 55,58 | 0,007 (s) | 69,08 | 0,000(s) |
| Talla | 1,60 | 1,57 | 0,119 | 1,57 | 0,913 |
| IMC | 19,30 | 22,45 | 0,000 (s) | 27,86 | 0,000(s) |
| % Grasa | 28 | 36,47 | 0,000 (s) | 43,88 | 0,000 (s) |
| Graffar | 14 | 13 | 0,383 | 13 | 0,536 |
| Peso RN | 3016,00 | 3182,00 | 0,369 | 3314,95 | 0,048 (s) |
| Talla RN | 48,40 | 50,51 | 0,0234 (s) | 50,95 | 0,193 |
| IP | 2,67 | 2,47 | 0,122 | 2,56 | 0,376 |

(s) = significativo

Si agrupamos nuevamente a las madres, pero según valores arbitrarios de porcentaje de grasa corporal (Tabla 7), se observa que son significativas las diferencias del peso materno y el IMC, entre las pacientes desnutridas y normales, así como también entre las normales y obesas. El peso del RN, sólo se diferenció entre las pacientes desnutridas y normales. Las tallas no presentaron diferencias significativas.

Tabla 7

| | <31% (1) | 31 a 39% (2) | p (1 vs 2) | >39% (3) | p (2 vs 3) |
|----------|----------|--------------|------------|----------|-------------|
| N° (%) | 32 | 70 | | 54 | |
| Graffar | 13 | 13 | 0,210 | 13 | 0,914897689 |
| Peso | 56,4 | 63,41 | 0,000 (s) | 70,94 | 0,000 (s) |
| Talla | 1,58 | 1,57 | 0,152 | 1,58 | 0,307763563 |
| IMC | 22,5 | 25,76 | 0,000 (s) | 28,46 | 0,000 (s) |
| Peso RN | 3.145,94 | 3.320,71 | 0,035 (s) | 3.267,96 | 0,444621571 |
| Talla RN | 50,34 | 50,86 | 0,210 | 50,83 | 0,946256198 |
| IP | 2,47 | 2,52 | 0,294 | 2,49 | 0,445999911 |

En general, esta clasificación, muestra tres grupos más homogéneos que con la clasificación por IMC, porque las variables están menos correlacionadas con el porcentaje de grasa corporal.

En cuanto a la evaluación del método diagnóstico (Tabla 8);

respecto a detectar la desnutrición neonatal por IP ($PI < 2,6$), el porcentaje de grasa corporal tiene una sensibilidad cuatro veces mayor al IMC. La especificidad del IMC es mayor, pero si tomamos en cuenta las implicaciones de no descartar a pacientes sanas, se puede desestimar una diferencia por demás pequeña.

Tabla 8

| | IP RN < 2,26 | | Peso RN < 3000 | |
|---------------------------|--------------|--------|----------------|--------|
| | IMC | %Grasa | IMC | %Grasa |
| Sensibilidad | 4 | 24 | 8 | 31 |
| Especificidad | 97 | 80 | 98 | 83 |
| Valor Predictivo Positivo | 20 | 19 | 60 | 35 |
| Valor Predictivo Negativo | 84 | 84 | 78 | 80 |

La mejor capacidad del porcentaje de grasa corporal para detectar los valores positivos de desnutrición neonatal, se repite al evaluar esta por peso (peso RN < 3000g). La sensibilidad del porcentaje de grasa corporal es en este caso superior seis veces con respecto al IMC, y la diferencia de especificidad igual de pequeña que por porcentaje de grasa corporal.

Discusión

La composición corporal materna se modifica a través de los cambios adaptativos durante el curso del embarazo. La masa grasa, la masa libre de grasa y el agua corporal total, aumentan en diferentes proporciones y sus efectos sobre el embarazo y el producto de la concepción son un campo de gran interés en la medicina perinatal (12).

Con relación a la clasificación del estado nutricional materno, evaluado por IMC y antropometría del recién nacido, no se observó un aumento significativo entre el peso promedio de los neonatos de madres desnutridas y normales; a diferencia de sus tallas promedio, en donde la diferencia resultó significativa. Es por esta razón que el promedio del índice ponderal fue mayor en las madres desnutridas que en el resto; distinto a lo que se esperaba, que era un menor índice ponderal para los neonatos producto de madres desnutridas y mayor para las madres normales y obesas. Con esto evidenciamos uno de los inconvenientes de este indicador, donde la mayoría de las comparaciones se establecen en base a fórmulas, las cuales dependen de las variables que en ellas se emplean, pudiendo dar resultados no adecuados como ocurrió en esta investigación.

Por el contrario, al correlacionar la clasificación del estado nutricional materno por porcentaje de grasa corporal (medido por impedancia bioeléctrica) con la antropometría del recién nacido, encontramos que el peso promedio de los neonatos fue notablemente menor en las madres desnutridas, comparativamente con el peso promedio de los neonatos de

las madres normales y obesas; sin embargo, el peso promedio de los neonatos de madres obesas fue incluso hasta discretamente menor que el de las madres normales. En cambio, las tallas promedio de los neonatos no reflejaron una diferencia estadísticamente confiable entre los grupos maternos. Estos resultados se correlacionan con lo descrito hasta ahora en la literatura, donde se señala que después de cierto límite, la grasa corporal de la madre no es usada para seguir aumentando el peso y la talla del recién nacido; así como también el hecho de que no se ha demostrado que las embarazadas normales que acumulan más grasa tengan recién nacidos de mayor peso (4).

La evaluación estadística de ambos métodos, demostró en forma similar al estudio realizado por Viegas (13), una sensibilidad casi cuatro veces mayor por IP y seis veces mayor por peso al nacer, del porcentaje de grasa corporal comparado con el IMC. Aunque la especificidad del IMC resultó mayor, la diferencia no resultó estadísticamente significativa.

El homogéneo nivel socioeconómico promedio de las madres en esta investigación (Método Graffar Clasificación IV: clase obrera) no resultó significativamente diferente entre los grupos de estado nutricional, tanto por IMC como por porcentaje de grasa corporal.

Se hace importante disponer de métodos de evaluación nutricional cada vez más precisos, que permitan determinar de una forma fácil, inocua y masiva, las pacientes con riesgo ponderal gestacional, ya que ello permitirá tomar los correctivos a tiempo.

Existen otros métodos de alta precisión para evaluar composición corporal, como hidrodensitometría, pletismografía, medición de potasio corporal total, DEXA, RMN, entre otros, que resultan en nuestro medio costosos e imprácticos (14); sin embargo, la IBE por su accesibilidad y practicidad, resulta el método de elección. Aún más, la IBE al determinar los cambios en la evolución del porcentaje de agua corporal total, constituye un poderoso predictor de deterioro por preeclampsia (precedido por edema) (15).

La antropometría materna convencional, es un buen método para evaluación nutricional durante el embarazo; de hecho, es el método más masificado; sin embargo, y como quedó demostrado en esta investigación, tiene ciertas limitaciones de sensibilidad. Por tanto, es importante su complementación con métodos que discriminen los compartimientos corporales (16).

Referencias

1. Anzola AR, Viegas D. Evaluación Nutricional de la Embarazada. *Boletín Médico de Postgrado*. 1999;15(2):67-81.
2. Frances M. Embarazo y Lactancia. En: Ziegler E, Filer L.F, editores. *Conocimientos actuales sobre nutrición*. Séptima Edición. Washington: Organización Panamericana de la Salud – Publicación Científica N° 565; 1997. p.410-22.
3. Gross T. Crecimiento Fetal Normal. En: Gleicher N, editor. *Medicina Clínica en Obstetricia*. 2da reimpresión. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1992. p383-96
4. Viegas D, Castañeda E. Proporción de grasa corporal. En: Viegas D, editor. *Evaluación Nutricional de la Embarazada*. 1ra ed. Barquisimeto: Ediciones Fundaeducó; 1999. p11-17.
5. Sohlstrom A, Forsum E. Changes in adipose tissue volume and distribution during reproduction in Swedish women as assessed by magnetic resonance imaging. *Am J Clin Nutr* 1995; 61:287.
6. Institute of Medicine/Subcommittee on Nutritional Status and Weight Gain During Pregnancy (1990). *Nutrition during pregnancy*. National Academy Press, Washington, DC.
7. Contreras J, Essenfeld E. Valor de la evaluación nutricional de la embarazada y posibles implicaciones. *Rev Obstet Ginecol Venez* 1988; 48: 55-61.
8. Viegas D, Zapata A. Evaluación Nutricional: Antropometría. En: Viegas D, editor. *Evaluación Nutricional de la Embarazada*. 1ra ed. Barquisimeto: Ediciones Fundaeducó; 1999. p1-10.
9. Viegas D. Relación entre antropometría materna y del recién nacido en el embarazo a término. Comparación de tres curvas de peso y talla. Trabajo Libre, XIII Jornada Nacional de Obstetricia y Ginecología. Barquisimeto. 1997 Resúmenes pag 291.
10. Reales L, Viegas D. Peso y talla de recién nacidos normales en Barquisimeto: Comparación de 2 grupos sociales. *Boletín Médico de Postgrado* 1996; 12:44.
11. Lapuente J. La importancia de la composición corporal en Anti-Aging Bases Físicas Bioimpedancia. *Revista de la Federación Ibero-latinoamericana de Sociedades de Medicina Anti-vejecimiento y Longevidad*. 2.005 Nov; 7:66.
12. Larciprete G, Valensise H, Vasopollo B, Altamare F, Sorge R, Casalino B, et al. Body composition during normal pregnancy: referente ranges. *Acta Diabetol*. 2.003 Oct; 40 Suppl 1:S225-32.
13. Viegas D. Porcentaje de grasa corporal como evaluación nutricional durante el embarazo. En Viegas D, editor. *Evaluación Nutricional de la Embarazada*. 1ª ed. Barquisimeto: Ediciones Fundaeducó; 1999
14. McCarthy E, Strauss B, Walker S, Permezel M. Determination of maternal body composition in pregnancy and its relevance to perinatal outcomes. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 2004 Oct; 59 (10):731-742
15. Yasuda R, Takeuchi K, Funakoshi T, Mauro T. Bioelectrical impedance analysis in the clinical management of preeclamptic women with edema. *J Perinat Med*. 2.003; 31(4):275-80.
16. Levario M, Reza SA, Tufino E, Robles M, Sanin LH, Amato D. Relationship between pregestacional body mass index and body composition in the immediate puerperium. *Ginecol Obstet Mex*. 2000 Apr; 68:149-53.



Valores normales de las fosfatasas alcalinas en embarazadas a las 24 y 28 semanas de gestación

Guillermina Salazar de Dugarte, Pedro Fancite Antique, Francis Pineda de Molina

RESUMEN

Las fosfatasas alcalinas son enzimas no específicas, se producen en osteoblastos, mucosa intestinal, riñón hígado y placenta. Se han evaluado recientemente como predictoras de parto pretérmino, insuficiencia placentaria y bajo peso al nacer. El objetivo es obtener los valores normales de las fosfatasas alcalinas séricas en embarazadas a las 24 y 28 semanas de gestación, para utilizarla como cifras referenciales de riesgo. Estudio prospectivo longitudinal, no experimental, en 80 embarazadas atendidas entre enero 2005 y noviembre 2005, se determinó la fosfatasa alcalina sérica con la técnica colorimétrica. Servicio de Perinatología, Hospital Dr. Adolfo Prince Lara, Puerto Cabello Estado Carabobo. El valor de las fosfatasas alcalinas (referidos a la media) a las 24 semanas fue 100 U/L y 141 U/L a las 28 semanas de gestación, y con rangos de 68 U/L en el percentil 10 y 142 U/L en el percentil 90 a las 24 semanas, y rangos de 90 U/L en el percentil 10 y 283 U/L en el percentil 90 a las 28 semanas de gestación. Se dispone de cifras referenciales de fosfatasas alcalinas como un parámetro que puede ser utilizado como pronóstico en el embarazo de riesgo de parto pretérmino e insuficiencia placentaria.

Palabras clave: Fosfatasas alcalinas, fosfatasas alcalinas y embarazo, fosfatasas alcalinas y parto pretérmino, diagnóstico prenatal.

Normal values of phosphatases in patients between 24 and 28 weeks of pregnancy

SUMMARY

The Alkaline phosphatases are non specific enzymes, they are produced in the osteoblasts, small bowel intestine mucose, kidney, liver and placenta. Recently were evaluated as preterm delivery predictors, placental insuphiciency and low weight newborns. To obtain the normal values of Alkaline Phosphatase, between 24-28 weeks of pregnancy in the Perinatology Service at the "Dr. Adolfo Prince Lara" Hospital, Puerto Cabello, Carabobo. Longitude prospective study, not experimental, in 80 pregnant patients attended between January to November 2005. Alkaline phosphatase was determinated by colorimetry technic. Perinatology Service, "Dr. Adolfo Prince Lara" Hospital, Puerto Cabello, Carabobo. The alkaline phosphatase values oscilated in relation to the media between 100 U/L at 24 weeks and 141 U/L at 28 weeks, and in the percentile distribution with ranges of 68 U/L in the percentile 10 and 142 U/L in the percentil90 at the 24 weeks. At 28 weeks the range were 90 U/L in the percentile10 and 283 U/L in the 90 percentile. To dispone alkaline phosphatase values as a parameter to be used as pronostique in the high risk pregnancy and placental insuphiciency.

Key words: Alkaline phosphatase, alkaline phosphatase in pregnancy, alkaline phosphatase and preterm delivery, prenatal diagnosis.

Servicio de Perinatología, Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Dr. Adolfo Prince Lara, Puerto Cabello, Departamento Clínico Integral de la Costa, Universidad de Carabobo, Estado Carabobo.

Trabajo presentado en el Congreso Venezolano de Obstetricia y Ginecología, celebrado en Caracas de 14 al 18 de marzo de 2006. Subvencionado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH).

Solicitar copia a: Guillermina Salazar de Dugarte: Correo electrónico: Guille8288@hotmail.com.

Introducción

Las fosfatasa alcalinas (FA) son enzimas no específicas que hidrolizan muchos tipos de ésteres monofosfatos, presentes en todos los tejidos que liberan fosfato inorgánico a partir de diversos ortofosfatos orgánicos. El sustrato natural de las FA es actualmente desconocido, se dan altas concentraciones en osteoblastos, mucosa intestinal, células de conductos renales, hígado y placenta.

En ausencia de enfermedad hepática, el aumento de las FA totales en plasma obedece a actividad osteoblastica aumentada, lo más frecuente es metástasis ósea, osteomalacia o Enfermedad de Páge (1). En el embarazo la principal fuente de producción es la placenta, de la que pasa al suero materno cuyos niveles aumentan a medida que lo hace el embarazo, y descienden hacia el segundo trimestre del mismo (1,2).

Estudios recientes revelan que estas enzimas se encuentran elevadas hacia el segundo trimestre en las pacientes con trabajo de parto pretérmino (TPP), y en las pacientes que han terminado su embarazo antes de las 37 semanas de gestación (1,3), se piensa que debido a las contracciones uterinas leves pero constantes, se produce interrupción de la barrera placentaria, permitiendo de esta manera el paso de estas enzimas en mayor cuantía al suero materno, y es por esto que las mismas se encuentran elevadas en este momento del embarazo (4).

Las FA ha sido una de las enzimas más estudiadas en líquido amniótico para la evaluación de la salud fetal (5,6). En 1957 Valentine y Beck (7), y Pritchard (8) demostraron que las FA aumentan a medida que lo hace el embarazo y regresa a niveles normales después del parto tal vez debido a la actividad placentaria, lo cual podría tener valor diagnóstico en aquellos casos con insuficiencia placentaria. En nuestro país, Faneite (9-11) se interesó en el estudio de estas enzimas en la embarazada y su producto. En 1981 Toro Merlo y Uzcategui (12) evaluaron la actividad de las FA en pacientes con hipertensión inducida por el embarazo.

Investigaciones recientes han estado dirigidas a la evaluación de los niveles de FA en suero de embarazadas con riesgo de parto pretérmino (PP), bajo peso al nacimiento, han encontrado relación con los valores elevados de FA en suero materno e incremento de PP (13-19).

El propósito de este trabajo fue obtener los valores normales de FA en embarazadas a las 24 y 28 semanas de gestación.

Material y método

La población estudiada estuvo constituida por pacientes consultantes al Departamento de Obstetricia Ginecología y Perinatología del Hospital "Dr. Adolfo Prince Lara" de Puerto Cabello, en el lapso comprendido entre enero 2005 a noviembre 2005.

Es una investigación clínica aplicada en el área biomédica, obstétrica, teniendo carácter prospectivo, longitudinal, no experimental

La muestra la constituyó 80 pacientes, atendidas en el Servicio de Perinatología y que cumplieron con los siguientes requisitos: residentes en Puerto Cabello y sus área de influencia: Morón y parte del Estado Falcón, edad gestacional conocida estimada por la fecha de la última menstruación y confirmada por los datos obtenidos en una exploración ecográfica, realizada antes de las 20 semanas de gestación, gestación única, sin patología y cuyo parto se presentó a término.

A las pacientes seleccionadas se les tomó una muestra de sangre, a las 24 y 28 semanas de gestación, para determinar los niveles normales de FA, se escogió este momento del embarazo para la realización de la prueba debido a que es en este período donde hay mayor producción de estas enzimas. Estas muestras se procesaron en el laboratorio del hospital según la técnica colorimétrica Buffer DEA, (Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie) DGKC Monoester ortofosfórico fosfohidrolasa (alcalina optimizada) (EC 3.1.3.1) método estandarizado optimizado de acuerdo a las recomendaciones de la Asociación Química Clínica Alemana (20).

Las variables se presentaron en cuadros de propósito especial. La participación de las pacientes en la investigación se llevó a cabo previa información de los objetivos y procedimientos del estudio, y luego del consentimiento por escrito de las mismas.

Para la obtención de los valores normales de las FA, se calculó la media, luego se expresó la tendencia central en desviación estándar (DS) y la distribución percentilar, para las 24 y 28 semanas de gestación, empleando el paquete estadístico contenido en Excel XP de Microsoft Office.

Resultados

En el Tabla 1 se observa los valores de FA, su tendencia central, desviación estándar (DS) y su dispersión; además muestra la distribución percentilar.



Tabla 1. Fosfatasa alcalinas. Valores de tendencia central y distribución percentilar.

| Edad gestacional (semanas) | Fosfatasa alcalinas | | | | |
|----------------------------|---------------------|------------|-------------|------------|------------|
| | -2DS (P10) | -1DS (P25) | U/L X (P50) | +1DS (P75) | +2DS (P90) |
| 24 | 10 (68) | 5(75) | 100 (102) | 145 (118) | 190 (142) |
| 28 | 3 (90) | 72 (99) | 141 (140) | 210 (162) | 279(283) |

U/L: Unidades por litro. DS: desviación estándar. X: media. P percentil.

El valor de la media a las 24 semanas fue 100 U/L y 141 U/L a las 28 semanas de gestación; a las 24 semanas la 2DS fue 190 U/L, y a -2DS 10U/L; a las 28 semanas las 2DS fue 279 U/L, y a -2DS 3 U/L. Se muestra los valores de FA en su distribución percentilar, con rangos comprendidos entre 68 U/L en el percentil 10, y 142 U/L en el percentil 90 a las 24 semanas, y rangos de 90 U/L en el percentil 10, y 283 U/L en el percentil 90 a las 28 semanas de gestación.

Discusión

La obtención de los valores normales de FA en suero materno a las 24 y 28 semanas de gestación, es un estudio dirigido a las embarazadas sin patología, con miras a posteriori a la evaluación del embarazo de alto riesgo, con el objeto de tener a mano estos valores que nos sirvan de referencia, y de esta manera evitar situaciones desfavorables al embarazo, que puedan producir un incremento en la morbi-mortalidad perinatal y así se estaría implementando la prevención del PP e insuficiencia placentaria (21).

Al obtener los resultados se observa que los valores de FA aumentan de las 24 a las 28 semanas, estos niveles de FA, en sus valores de tendencia central y en la distribución percentilar no son comparables a los obtenidos en otros estudios donde realizaron la evaluación de las FA como predictores de PP, ya que utilizan técnicas distintas.

Moawad y colaboradores (18), en su estudio de predicción de PP obtuvo una media de FA de 45 ± 13 U/L, a las 24 semanas de gestación, utilizando para su determinación la técnica Sigma diagnostic alkaline phosphatase reagent la cual hace la medición por un método cinético (Sigma diagnostic, St Louis, MO). Así mismo, Goldenberg y col (14), usando la misma técnica en un estudio similar, sus resultados fueron 39 U/L a las 19 semanas y 130 U/L al término en pacientes con embarazo de evolución normal.

Por otra parte, Meyer y colaboradores (13), determinaron los valores de FA a las 15 y 20 semanas de gestación con el anticuerpo monoclonal H17E2, por un procedimiento de

inmunoensayo, los autores ajustaron los valores obtenidos de FA al peso materno empleando la fórmula: $\log. \text{Lineal } 10^{(0.2658-0.00188 * \text{peso materno})}$, para obtener los múltiplos de la media y así disponer de un punto de corte para hacer la comparación con los valores de FA de las pacientes cuyos partos terminaron antes de las 37 semanas, obteniendo un punto de corte de 2 múltiplos de la media, tomando como valor normal <2 múltiplos de la media.

Schlebusch y colaboradores (22), empleando la técnica Alkaline Phosphatase liquicolor buffer DEA, DGKC Monoester monofosfórico fosfohidrolasa, de acuerdo a la temperatura empleada, establece los siguientes valores de referencia: a 25° C 40-190 U/L, a 30° C 49-232 U/L, y a 37° C 64-306 U/L en mujeres no embarazadas.

El PP es un patología ampliamente estudiada ya que contribuye con la morbi-mortalidad perinatal (21, 23-35), con una incidencia entre 7% y 12% en los Estados Unidos (36), y 9% en 11 países Latinoamericanos, incluyendo Venezuela (37,38). con una mortalidad en nuestro país de 34,31% (39), por lo que su estudio continua siendo de gran interés.

La obtención de los valores normales de FA, a las 24 y 28 semanas de gestación, en suero materno en nuestro servicio, con la técnica colorimétrica Buffer DEA, DGKC Monoester ortofosfórico fosfohidrolasa, nos será de gran utilidad ya que no se cuenta con tablas al respecto. En nuestro país no existen publicaciones referidas al tema. Estos valores servirán de referencia para comparar los valores obtenidos en pacientes con riesgo de PP e insuficiencia placentaria, de manera de evaluar estas enzimas como predictoras de PP e insuficiencia placentaria, investigación que se está desarrollando actualmente en el Servicio de Perinatología, y de esta manera poder contar con una probable herramienta, que pueda ser utilizada en el momento de evaluar un embarazo de alto riesgo.

Referencias

1. Peters KD, Kochanek KD, Murphy SL. Deaths: final data for 1996. Natl Vital Stat Rep 1998;47:1-100.
2. Guariglia D, Zigelboim I. Líquido amniótico. En: Zigelboim I, Guariglia D. Clínica Obstetrica. Caracas: Editorial Disinlimed; C.A. 2001.p.121-125.
3. Department of Health (UK). NHS maternity statistics, England: 1989-90 to 1994-95. London: Stationery Office, 1997. Disponible en: www.doh.gov.uk/public/sb9728.htm (accessed 23 August 2001)
4. Koster EL, Dashe JS, McIntire DD, Ramus RM. Association of maternal serum alfa -fetoprotein with persistent placenta previa. J Matern Fetal Med. 2004;16:3-7.
5. Jubiz A. Desarrollo fetal: Líquido amniótico. En: Botero J, Jubiz A, Henao G (Editores) Obstetrica y Ginecología. 5° Edición. Medellín, Colombia: Editorial Universidad de Antioquia; 1994.p.40-48.

6. Magnelli A, Pagés G. Métodos invasivos de diagnóstico prenatal. En: Aller J., Pages G. *Obstetricia Moderna*. Tercera Edición. Caracas: Editorial Mc Graw- Hill. Interamericana de Venezuela; S.A., 1999.p.68-81.
7. Valentine WN, Beck W. Phosphatases alkalines in the pregnancy. *Lab Clin Med*. 1957;38:39-42.
8. Pritchard JA. Fosfatadas alcalinas en el embarazo. *Lab Clin Med*. 1957;50:432-435.
9. Faneite P. La fosfatasa alcalina en el neonato de embarazo a término: parámetros de madurez. *Rev Obstet Ginecol Venez* 1978;38:211-214.
10. Faneite P. La fosfatasa alcalina en el neonato pequeño para la edad gestacional: parámetro de madurez. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 1978;38:215-217.
11. Faneite P. La fosfatasa alcalina en el neonato prematuro. Parámetro de madurez. *Rev Obstet Ginecol*. 1978;38:218-220.
12. Toro Merlo J, Uzcatogui O. Determinación histoquímica de fosfatasa alcalina leucocitaria en hipertensión inducida por el embarazo. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 1981;41(4)22-25.
13. Meyer RF, Thompson SJ, Addy CL, Garrison CZ, Bert RG. Maternal serum placental alkaline phosphatase level and risk for preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol*. 1995; 172: 810-816.
14. Goldenberg RL, Tamura T, Dubard M, Johnston KE, Cooper RL, Neggers Y. Plasma alkaline phosphatase and pregnancy outcome. *J Matern Fetal Med*. 1997; 6: 140-145.
15. Simpson JL, Palomaki JE, Mercer B, Haddow JE, Andersen R, Sibai B. Association between adverse perinatal outcome and serially obtained second and third trimester maternal serum alfa fetoprotein measurement. *Am J Obstet Gynecol*. 1996; 173: 1742-1748.
16. Waller DK, Lustig LS, Cunningham GC, Fuechtbaum LB, Hook EB. The association between maternal serum alpha-fetoprotein and preterm birth, small for gestational age infants, preeclampsia and placental complications. *Obstet Gynecol*. 1996; 88: 816-822.
17. Goldenberg RL, Iams JD, Mercer BM, Meis PJ, Das A, Miodovnik M y col. The preterm prediction study: toward a multiple - marker test for spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2001; 185 (3): 643- 651.
18. Moawad A, Goldenberg RL, Mercer B, Meis P, Iams JD, Das A, Caritis S. The preterm prediction study: the value of serum alkaline phosphatase, alfafetoprotein, plasma corticotrophin-releasing hormone, and other serum markers for the prediction of spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2002; 186: 990-996.
19. Goldenberg RL, Iams JD, Mercer BM, Meis P, Moawad A, Das A. What we have learned about the predictors of preterm birth. *Semin Perinatol*. 2003;(3):185-193.
20. Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem*. 1970;8:658-662.
21. Cabero Roura L, Cabrillo Rodriguez E, Saling E. Prevención del parto prematuro. En: Cabero Roura. editor. *Parto prematuro*. Madrid España: Editorial Médica Panamericana; S.A. 2004.p.101-112.
22. Schlebusch H. Alkaline phosphatase, reference values. *Dtsch Med Wschr*. 1974;99:765-779.
23. Crane JM, Van den Hof M, Armson BA, Liston R. Transvaginal ultrasound in the prediction of preterm delivery: Singleton and twin gestation. *Osbtet Gynecol*. 1997;90(3):357-363.
24. Owen J, Yost N, Berghella V, Thom E, Swain M, Dildy GA. Mid-trimester endovaginal sonography in women at high risk for spontaneous preterm birth. *JAMA*. 2001;286(11):1340-1348.
25. Goldenberg RL, Iams JD, Mercer BM, Meis PJ, Moawad AH, Copper RL. The preterm prediction study: the value of new vs standar risk factor in predicting early and all spontaneous preterm birth. *NICHD MFMV Network. Am J Public Healt*. 1998; 88(2):233-238.
26. Crane JM, Armson BA, Dodds L, Feinberg RF, Kennedy W, Kirkland SA. Risk scoring, fetal fibronectin, and bacterial vaginosis to predict preterm delivery. *Obstet Gynecol*. 1999;93(4):517-522.
27. Goldenberg RL, Mercer BM, Iams JD, Moawad AH, Meis PJ, Das A. The preterm prediction study: patterns of cervicovaginal fetal fibronectin as predictors of spontaneous preterm delivery. *National Institute of Child Health and Human Development Maternal - Fetal Medicine Units Nework. Am J Obstet Gynecol*. 1997; 177(1):8-12.
28. Wennerholm VB, Holm B, Mattsby-Baltzer I, Nielsen T, Platz-Christensen J, Sundell G. Fetal fibronectin, endotoxin, bacterial vaginosis and cervical length as predictors of preterm birth and neonatal morbidity in twin pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol*. 1997;104(12):1398-1404.
29. Ramsey PS, Andrews WW. Biochemical predictors of preterm labor: fetal fibronectin and salivary estriol. *Clin Perinatol*. 2003;30(4)701-733.
30. Davis RD, Goldenberg RL, Boots L, Hoffman HJ, Cooper R, Cutter GR y col. Elevated levels of midtrimester maternal serum alpha-fetoprotein are associated whit preterm delivery but not with fetal growth retardation. *Am J Obstet Gynecol*. 1992; 167(3):596-601.
31. Williams MA, Hickok DE, Zingheim RW, Mittendorf R, Kimelman J, Mahony BS. Low birth weigth and preterm delivery in relation to early gestation vaginal bleeding and elevated maternal serum alpha-fetoprotein. *Obstet Gynecol*. 1992; 80(5):745-749.
32. Morssink LP, Kornman LH, Beckuis JR, De Wolf BT, Mantingh A. Abnormal levels of maternal serum human chorionic gonadotropin and alpha-fetoprotein in the second trimester: relation to fetal weight and preterm delivery. *Prenat Diagn*. 1995;15(11):1041-1046.
33. Ramsey P, Andrews W. Factores pronósticos bioquímicos del parto pretérmino: fibronectina fetal y estriol salival. *Clin Perinatol*. 2003;(4):691-723.
34. Uzcatogui O, Figarella D, Bentolila S, Toro J, Fleitas F. Uso del Fenoterol en la amenaza de parto prematuro. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 1987;47(2):72-75.
35. Faneite P, Rivera C, González M, Linares M, Faneite Y. Prematurez: problema actual. *Hospital "Dr. Adolfo Prince Lara"*. 1995-1999. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 2001;61(3):157-161.
36. Castracane D. Endocrinología del trabajo de parto pretérmino. *Clin Obstét Ginecol*. 2000; 4: 667-675.
37. Faneite P, Alvarez N, Repillosa M. Factores epidemiológicos del parto prematuro. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 1995;55(2):71-76.
38. Lumeley J. The epidemiology of preterm birth. *Clin Obstet Gynecol*. 1993;7:477-498.
39. Faneite P, Rivera C, González M, Linares M, Gómez R, Alvarez L, Faneite Y. Recién nacido de bajo peso. Evaluación. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 2002;62(1):5-10.



Requisitos uniformes para preparar los manuscritos enviados a revistas biomédicas

La quinta edición (1997) de los requisitos uniformes se ha preparado con la finalidad de reorganizar y modificar la redacción de la cuarta edición a efecto de aumentar la claridad y abordar inquietudes con respecto a derechos, protección de la vida privada de los sujetos de investigación, descripción de los métodos aplicados y otros asuntos. Los requisitos uniformes para preparar los manuscritos enviados a revistas biomédicas pueden reproducirse para fines educativos y sin afán de lucro, con prescindencia de los derechos del autor; el Comité alienta la distribución de este material.

A las revistas que accedan a guiarse por los requisitos uniformes (actualmente más de 500 revistas lo hacen) se les pide que en sus instrucciones para los autores citen el documento correspondiente a 1997.

Es importante hacer hincapié en lo que los requisitos significan y en lo que no. En primer lugar, los requisitos uniformes son instrucciones sobre la forma de preparar los manuscritos dirigidas a los autores; no se trata sobre indicaciones sobre estilo editorial destinadas a la redacción de las revistas. (Sin embargo, muchas revistas han incorporado en su estilo editorial ciertos elementos de los requisitos.)

En segundo lugar si los autores preparan un manuscrito según el estilo especificado en estos requisitos, los directores de las revistas participantes no devolverán el manuscrito para que se hagan cambios de estilo antes de considerarlo para publicación. No obstante, en el proceso de publicación los manuscritos podrán ser modificados por las redacciones de las revistas para adaptarlos a las particularidades de su propio estilo editorial.

En tercer lugar los autores que envíen manuscritos a una revista se abstendrán de prepararlos de acuerdo con el estilo editorial de ésta y se concretarán a cumplir con los requisitos uniformes.

Pese a todo, los autores tendrán que seguir así mismo las instrucciones particulares de la revista en cuestión por lo que se refiere a los temas apropiados para ésta y el tipo de manuscrito que se les pueden enviar: por ejemplo, artículos originales, revisiones o informes de casos. Además es probable que en dichas instrucciones figuren otros requisitos exclusivos de la publicación, tales como el número de copias del manuscrito, los idiomas en que este puede ser redactado, la extensión de los artículos y las abreviaturas aprobadas.

Se espera que las revistas participantes declaren en sus instrucciones a los autores que sus normas están de acuerdo con los requisitos uniformes para preparar los manuscritos enviados a revistas biomédicas y citen una versión publicada de estos.

Cuestiones que deben considerarse antes de presentar un manuscrito para publicación

Publicación redundante o duplicada

Por publicación redundante o duplicada se entiende la publicación de un artículo que se traslapa considerablemente con otro ya publicado.

Los lectores de publicaciones periódicas primarias merecen que se les dé la confianza de que lo que están leyendo es original, a menos que haya una clara indicación de que el artículo se ha vuelto a publicar por elección del autor y el director. Esta posición tiene como fundamento las leyes internacionales de derechos de autor, la conducta ética y el uso eficaz en función de los costos de los recursos.

La mayor parte de las revistas científicas no desean recibir manuscritos acerca de un trabajo que ya se ha dado a conocer en gran medida en un artículo publicado o que forma parte de otro manuscrito que se ha propuesto o ha sido aceptado para publicación en otra parte, ya sea en forma impresa o en soporte electrónico. Esta norma no impide que la revista considere un artículo rechazado por otra revista o un informe completo que sigue a la publicación de un informe preliminar, como puede ser un resumen o póster presentados a la consideración de colegas en una reunión profesional. Tampoco impide que las revistas consideren un artículo que se ha presentado en una reunión científica pero que no se ha publicado íntegramente ni se está considerando para publicación en las actas de una reunión o en una publicación semejante. Las informaciones periodísticas acerca de reuniones programadas no se consideran en general como infracciones de esta regla, pero no habrán de ampliarse mediante datos suplementarios o copias de los cuadros y las ilustraciones.

Cuando se envíe un artículo para publicación, el autor debe siempre adjuntar una relación completa de toda presentación del documento a otras revistas y de cualquier informe anterior que pudieran considerarse publicación redundante o duplicada del mismo trabajo o de uno muy semejantes. El autor debe poner sobre aviso al director de la revista si el trabajo aborda temas sobre los cuales se hayan publicado informes anteriores. Si tal es el caso, esos trabajos se mencionarán con la debida referencia bibliográfica en el artículo nuevo. Junto con el manuscrito propuesto se incluirán copias de dichos materiales para ayudar al director a decidir la manera de manejar este asunto.

Si la publicación redundante o duplicada se intenta o se produce sin que medie la notificación descrita, los autores deberán atenerse a las medidas editoriales que se tomen en su contra. Como mínimo, cabe esperar el pronto rechazo del manuscrito presentado. Si el director no estaba al tanto de las infracciones y el artículo acaba por aparecer en su revista, entonces probablemente se publique en ésta un aviso de publicación

redundante o duplicada, que puede o no acompañarse de una explicación del autor y no necesitará de su aprobación.

La divulgación preliminar, generalmente por conducto de los medios de comunicación de masas, de la información científica descrita en un artículo ya aceptado pero aún sin publicar representa una infracción de las normas de muchas revistas. En contadas ocasiones, y solo mediante acuerdo con el director, puede aceptarse la diseminación preliminar de datos; por ejemplo, cuando se presenta una emergencia de salud pública.

Publicación secundaria aceptable

La publicación secundaria en el mismo idioma o en otro distinto, especialmente en otros países, se considera justificable y puede incluso ser beneficiosa, siempre y cuando se cumplan las siguientes condiciones.

1. Los autores tendrán que recabar la aprobación de los directores de las dos revistas involucradas; el director de la publicación secundaria tendrá en su poder una fotocopia, separata o manuscrito de la versión primaria.
2. Se respetará la precedencia de la publicación primaria dejando transcurrir por lo menos una semana antes de la publicación secundaria (a menos que específicamente se negocie otra cosa con ambos directores).
3. El artículo para publicación secundaria se destinará a un grupo diferente de lectores; podría bastar con una versión abreviada.
4. La versión secundaria reflejará fielmente los datos y las interpretaciones de la primaria.
5. Mediante una nota colocada al pie de la primera página de la versión secundaria, se informará a los lectores, a los colegas de los autores y a los organismos de documentación que el artículo ya se ha publicado con anterioridad en forma total o parcial, indicando la referencia primaria. Este podría ser un texto apropiado para dicha nota: "El presente artículo está basado en un estudio que se dio a conocer primero en (título de la revista y referencia completa)".
6. El permiso para la publicación secundaria de este tipo se otorgará gratuitamente.

Protección de los derechos del paciente a que se respete su vida privada

El derecho de los pacientes a que se respete su vida privada no debe ser infringido sin antes obtener su consentimiento fundamentado. Las descripciones por escrito, las fotografías y los árboles genealógicos que se publiquen no deberán contener información por la cual se pueda identificar a los pacientes, a menos que dichos datos resulten esenciales para fines científicos y que el paciente (o su padre o tutor) otorgue por escrito su autorización para la publicación después de haber sido debidamente informado. Para obtener el consentimiento para esta finalidad, es preciso mostrarle al paciente el manuscrito que se va a publicar.

Los detalles que pueden revelar la identidad del paciente deben omitirse si no son esenciales, pero los datos del paciente nunca se alterarán ni se falsificarán solamente por tratar de lograr el anonimato. Es difícil lograr el anonimato completo y frente a cualquier duda será preciso obtener el consentimiento fundamentado. Por ejemplo, cubrir la región de los ojos en las fotografías de los pacientes es una protección insuficiente del anonimato.

La exigencia del consentimiento con conocimientos de causa deben figurar en las instrucciones para los autores de la revista. Siempre que se obtenga dicha anuencia, éste deberá contar en el artículo publicado.

Requisitos para la presentación de manuscritos a una revista

Resumen de los requisitos técnicos

Todas las partes del manuscrito estarán a doble espacio.

Cada sección o componente comenzará en página nueva.

Revise la secuencia: página del título, resumen y palabras clave, texto agradecimientos, referencias, cuadros (cada uno en página aparte), pies o epígrafes de las ilustraciones.

Las ilustraciones se presentarán en forma de impresiones fotográficas sin tomar, y no deberán exceder de 203 x 254 mm.

Incluya la autorización para reproducir material publicado con anterioridad o para usar ilustraciones en las que se pueda identificar a los sujetos humanos.

Adjunte la transferencia de los derechos de autor y otros formularios.

Presente el número exigido de copias impresas del artículo.

Guarde copias de todo lo que envíe.

Preparación del manuscrito

El texto de los artículos de observación y experimentales se divide generalmente, aunque no por fuerza, en secciones que llevan estos encabezamientos: introducción métodos, resultados y discusión. En los artículos largos puede ser necesario agregar subtítulos dentro de estas secciones, sobre todo en las de resultados y discusión, a fin de hacer más claro el contenido. Es probable que otro tipo de artículos -como los informes de casos, las revisiones y los editoriales- exijan otra estructura. Para mayor orientación, los autores deberán consultar la revista en la que pretenden publicar.

Mecanografiase el manuscrito en papel bond blanco de 216 x 279 mm o de la medida estándar ISO A4 (212 x 297 mm), con márgenes de por lo menos 25mm. Escribise o imprimase solamente sobre una cara del papel. Utilicese doble espacio a lo largo de todo el manuscrito, incluido la página del título, el resumen, el texto los agradecimientos, las referencias, cada uno de los cuadros y los pies o epígrafes de las ilustraciones. Numérense las páginas en forma consecutiva, empezando por las

del título. Sobre el ángulo superior o inferior derecho de cada página anótese el número que le corresponde.

Manuscritos en disquete

Cuando un artículo se halla cercano a la aceptación definitiva, algunas revistas piden que los autores faciliten una copia en forma electrónica (en disquete); pueden aceptar una variedad de formato de procesadoras del texto o ficheros de texto (ASCII).

Cuando presenten disquetes, los autores deberán:

1. cerciorarse de incluir la versión impresa del artículo que va en el disquete;
2. poner en el disquete únicamente la versión más reciente del manuscrito;
3. denominar claramente el fichero ;
4. rotular el disquete con indicación del formato y el nombre del fichero;
5. facilitar información sobre el equipo de computación y el software utilizados.

Los autores deberán consultar las instrucciones que la revista proporciona a los autores para determinar cuáles son los formatos que se aceptan, las convenciones que se aplican para denominar los ficheros, el número de copias que deben presentarse y otros detalles.

Página del Título

La primera página contendrá: 1) el título del artículo, que será conciso pero informativo; 2) nombre de pila preferido y apellidos de cada autor, acompañados de sus grados académicos más importantes y su afiliación institucional; 3) nombre del departamento o departamentos y la institución o instituciones a las que se debe atribuir el trabajo; 4) declaraciones de descargo de responsabilidad, si las hay; 5) nombre y dirección del autor que se ocupará de la correspondencia relativa al manuscrito; 6) nombre y dirección del autor a quien se dirigirán las solicitudes de separatas, o nota informativa de que los autores no las proporcionarán; 7) procedencia del apoyo recibido en forma de subvenciones, equipo, medicamentos o todo ello; y 8) título abreviado (titulillo) que no pase de 40 pulsaciones (contando caracteres y espacios), el cual se colocará, debidamente identificado como tal, en la última línea de la página inicial.

Autoría

Todas las personas designadas como autores habrán de cumplir con ciertos requisitos para tener derecho a la autoría. Cada autor debe haber participado en el trabajo en grado suficiente para asumir responsabilidad pública por su contenido.

Para concederle a alguien el crédito de autor, hay que basarse únicamente en su contribución esencial por lo que se refiere a los siguientes aspectos: 1) la concepción y el diseño o bien el análisis y la interpretación de los datos; 2) la redacción del artículo o la revisión crítica de una parte importante de su contenido intelectual; y 3) la aprobación final de la versión que será publicada. Las tres condiciones tendrán que

cumplirse siempre. La participación que consiste meramente en conseguir financiamiento o recoger datos no justifica el crédito de autor. Tampoco basta con ejercer la supervisión general del grupo de investigación. Toda parte del artículo que sea decisiva con respecto a las conclusiones principales deberá ser responsabilidad de por lo menos uno de los autores.

Los directores de revistas podrán solicitar a los autores que describan la contribución de cada uno; esa información puede ser publicada.

Cada vez es más común que los ensayos multicéntricos se atribuyan a un autor corporativo. Todos los miembros del grupo que sean designados como autores, ya sea en la línea destinada al nombre de los autores a continuación del título o en una nota a pie de página, deberán cumplir plenamente con los requisitos de autoría recién señalados. Los miembros del grupo que no cumplan con dichos criterios serán mencionados, con su autorización, en la sección de agradecimientos o en un apéndice (véase "Agradecimientos").

El orden en que figuran los autores debe reflejar una decisión conjunta de éstos. Como los autores se suelen enumerar de distintas maneras, el significado del orden en que aparecen no puede deducirse con exactitud a menos que ellos mismos lo enuncien explícitamente. Para tal efecto, tal vez deseen agregar, en una nota a pie de página, la explicación sobre el orden de enumeración. Al decidir acerca de dicho orden, los autores tendrán presente que muchas revistas imponen un límite al número de autores que figuran en el índice de materias y que, cuando hay más de 25 autores, la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos incluye en MEDLINE tan solo los nombres de los 24 primeros más el del último.

Resumen y palabras clave

La segunda página incluirá un resumen (que no sobrepasará las 150 palabras de extensión si es un resumen ordinario o las 250 si es uno estructurado). En él indicará los propósitos del estudio o investigación; los procedimientos básicos (selección de los sujetos o los animales de laboratorio incluidos en el estudio; métodos de observación y análisis); los hallazgos más importantes (proporcionense datos específicos y, de ser posibles, su significación estadística), y las conclusiones principales. Hágase hincapié en los aspectos nuevos e importantes del estudio o las observaciones.

A continuación del resumen agréguese, debidamente rotuladas, de 3 a 10 palabras o frases cortas clave que ayuden a los indizadores a clasificar el artículo, las cuales se publicarán junto con el resumen. Utilicese para este propósito los términos de la lista "Medical Subject Headings" (MeSH) [Encabezamientos de temas médicos] del Index Medicus; en el caso de términos de reciente aparición que todavía no figuren en dicha lista, podrán usarse las expresiones corrientes.



Introducción

Expresa el propósito del artículo y resume el fundamento lógico del estudio u observación. Menciones las referencias estrictamente pertinentes y no incluya datos ni conclusiones del trabajo que está dando a conocer.

Métodos

Describa claramente la forma como se seleccionaron los sujetos observados o que participaron en los experimentos (pacientes o animales de laboratorio, incluidos los testigos).

Identifique la edad, el sexo y otras características importantes de los sujetos. La definición y la pertinencia de la raza o el grupo étnico son ambiguos. Los autores deberán ser particularmente cuidadosos con respecto a usar estas categorías.

Identifique los métodos, los aparatos (nombre y dirección del fabricante entre paréntesis) y los procedimientos con detalles suficientes para que otros investigadores puedan reproducir los resultados. Proporcione referencias de los métodos acreditados, incluidos los de índole estadística (véase más adelante); dé referencias y explique brevemente los métodos ya publicados pero que no son bien conocidos; describa los métodos nuevos o que han sido sustancialmente modificados, manifestando las razones por las cuales se usaron y evaluando sus limitaciones. Identifique exactamente todos los medicamentos y productos químicos utilizados, sin olvidar nombres genéricos, dosis y vías de administración.

Los informes de ensayos clínicos aleatorizados deberán presentar información sobre todos los elementos importantes del estudio, como son el protocolo (población de estudio, intervenciones o exposiciones, resultados y el fundamento lógico del análisis estadístico), asignación de intervenciones (métodos de aleatorización, ocultamiento de la asignación a los grupos de tratamiento) y método de enmascaramiento (método ciego).

Los autores que presenten manuscritos de revisión incluirán una sección en la que se describan los métodos utilizados para localizar, seleccionar, extraer y sintetizar los datos. Estos métodos se mencionarán también en forma sinóptica en el resumen.

Ética. Cuando informe sobre experimentos en seres humanos, señale si los procedimientos seguidos estuvieron de acuerdo con las normas éticas del comité (institucional o regional) que supervisa la experimentación en seres humanos o con la Declaración de Helsinki de 1975, modificada en 1983. No utilice el nombre de los pacientes, sus iniciales ni los códigos hospitalarios, especialmente en el material ilustrativo. Cuando dé a conocer experimentos con animales, mencione si se cumplieron las normas de la institución, las de un consejo nacional de investigación o cualquier ley nacional acerca del cuidado y el uso de animales de laboratorio.

Estadística. Describa los métodos estadísticos con

detalles suficientes para que el lector versado en el tema y que tenga acceso a los datos originales pueda verificar los resultados presentados. Siempre que sea posible, cuantifique los resultados y preséntelos con indicadores apropiados de error o incertidumbre de la medición (por ej., intervalos de confianza). No dependa exclusivamente de las pruebas de comprobación de hipótesis estadísticas, tales como el uso de los valores P, que no transmiten información cuantitativa importante. Analice la elegibilidad de los sujetos de experimentación. Proporcione los detalles del proceso de aleatorización. Describa los medios utilizados para enmascarar las observaciones (método ciego), indicando los resultados que dieron. Informe sobre las complicaciones del tratamiento. Especifique el número de observaciones. Mencione las pérdidas de sujetos de observación (por ej., las personas que abandonan un ensayo clínico). Siempre que sea posible, las referencias sobre el diseño del estudio y los métodos estadísticos utilizados serán de trabajos vigentes (indicando el número de las páginas), y no de los artículos originales donde se describieron por vez primera. Especifique cualquier programa de computación de uso general que se haya empleado.

Las descripciones generales de los métodos utilizados deben aparecer en la sección de métodos. Cuando resume los datos en la sección de resultados, especifique los métodos estadísticos que se emplearon para analizarlos. Limite el número de cuadros y figuras al mínimo necesario para explicar el tema central del artículo y para evaluar los datos en que se apoya. Use gráficas en vez de cuadros subdivididos en muchas partes; no duplique los datos en las gráficas y los cuadros. Evite el uso no técnico de términos de la estadística, tales como «al azar» (que entraña el empleo de un método de aleatorización), «normal», «significativo», «correlaciones» y «muestra». Defina los términos, las abreviaturas y la mayor parte de los símbolos estadísticos.

Resultados

En el texto, los cuadros y las ilustraciones, presente los resultados siguiendo una secuencia lógica. No repita en el texto todos los datos de los cuadros ni de las ilustraciones; destaque o resume tan solo las observaciones importantes.

Discusión

Haga hincapié en los aspectos nuevos e importantes del estudio y en las conclusiones que se derivan de ellos. No repita con pormenores los datos u otra información ya presentados en las secciones de introducción y de resultados. Explique en la sección de discusión el significado de los hallazgos y sus limitaciones, incluidas sus implicaciones para la investigación futura. Relacione las observaciones con otros estudios pertinentes.

Establezca el nexo entre las conclusiones y los objetivos del estudio, pero absténgase de hacer afirmaciones generales y extraer conclusiones que no estén completamente respaldadas por los datos. En particular, los autores evitarán hacer afir-

maciones sobre los beneficios y los costos económicos, a menos que su manuscrito incluya datos y análisis económicos. No reclame ningún tipo de precedencia ni mencione trabajos que no estén terminados. Proponga nuevas hipótesis cuando haya justificación para ello, pero identificándolas claramente como tales. Cuando sea apropiado, puede incluir recomendaciones.

Agradecimientos

En un lugar adecuado del artículo (como nota al pie de la primera página o como apéndice del texto; véanse los requisitos de la revista) uno o varios enunciados especificarán lo siguiente: 1) las colaboraciones que deben ser reconocidas pero que no justifican la autoría, tales como el apoyo general del jefe del departamento; 2) el reconocimiento por la ayuda técnica recibida; 3) el agradecimiento por el apoyo financiero y material, especificando la índole del mismo; y 4) las relaciones que puedan suscitar un conflicto de intereses (véase «Conflicto de intereses»).

Las personas que colaboraron intelectualmente en el artículo pero cuya participación no justifica la autoría pueden ser citadas por su nombre, añadiendo su función o tipo de colaboración; por ejemplo, «asesoramiento científico», «examen crítico de la propuesta para el estudio», «recolección de los datos» o «participación en el ensayo clínico». Estas personas tendrán que conceder su permiso para ser nombradas. Los autores se responsabilizarán de obtener la autorización por escrito de las personas mencionadas por su nombre en los agradecimientos, pues los lectores pueden inferir que estas respaldan los datos y las conclusiones.

El reconocimiento por la ayuda técnica recibida figurará en un párrafo separado de los testimonios de gratitud por otras contribuciones.

Referencias

Numere las referencias consecutivamente siguiendo el orden en que se mencionan por primera vez en el texto. En este, en los cuadros y en los pies o epígrafes de las ilustraciones, las referencias se identificarán mediante números arábigos entre paréntesis. Las referencias citadas solamente en cuadros o ilustraciones se numerarán siguiendo una secuencia que se establecerá por la primera mención que se haga en el texto de ese cuadro o esa figura en particular.

Emplee el estilo de los ejemplos que aparecen más adelante, los cuales están basados en el formato que la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos usa en el *Index Medicus*. Abrevie los títulos de las revistas de conformidad con el estilo utilizado en dicha publicación. Consulte la *List of Journals Indexed in Index Medicus* [Lista de revistas indizadas en *Index Medicus*], que se publica anualmente como parte del número de enero y como separata. La lista se puede obtener asimismo en el sitio que la biblioteca mantiene en la World Wide Web (<http://www.nlm.nih.gov>).

Absténgase de utilizar los resúmenes como refe-



rencias. Las referencias a artículos que han sido aceptados pero que todavía no se publican se designarán como «en prensa» o «de próxima aparición»; los autores obtendrán por escrito el permiso para citar dichos artículos y también la verificación de que han sido aceptados para publicación. La información proveniente de manuscritos presentados para publicación pero aún no aceptados se citará en el texto como «observaciones inéditas», con el permiso correspondiente de la fuente.

No cite una «comunicación personal» a menos que aporte información esencial que no pueda obtenerse de una fuente pública; en ese caso, el nombre de la persona y la fecha de la comunicación aparecerán entre paréntesis en el texto. En el caso de artículos científicos, los autores deberán obtener el permiso de la fuente y su confirmación de la exactitud de la comunicación personal, ambos por escrito.

Los autores verificarán las referencias cotejándolas contra los documentos originales.

El estilo de los requisitos uniformes (estilo de Vancouver) se basa en gran medida en una norma de estilo ANSI adaptada por la Biblioteca Nacional de Medicina (NLM) para sus bases de datos. En los ejemplos que siguen se han agregado notas cuando el estilo de Vancouver difiere del estilo que actualmente utiliza la NLM.

Artículos de revista

1. Artículo de revista ordinario

Enumere los primeros seis autores y añada la expresión «et al.»

(Nota: La NLM incluye ahora hasta 25 autores; si hay más de 25, enumera los primeros 24, continuación el último autor y luego agrega «et al.»)

Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996 Jun 1;124(11):980-3.

Opcionalmente, si se utiliza la paginación continua a lo largo de un volumen (como hacen muchas revistas médicas), se pueden omitir el mes y el número.

(Nota: Para respetar la uniformidad, en todos los ejemplos que se presentan en los requisitos uniformes se aplica esta opción. La NLM, sin embargo, no usa dicha opción.)

Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996;124:980-3.

Más de seis autores:

Parkin DM, Clayton D, Black Rj, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood leukaemia in Europe after Chernobyl: 5 year follow-up. *Br J Cancer* 1996;73:1006-12.

2. Organización como autor

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996;164:282-4.

3. No se indica el nombre del autor

Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J* 1994;84:15.

4. Artículo en idioma extranjero¹

(Nota: La NLM traduce el título al inglés, lo encierra entre corchetes y le agrega la abreviatura correspondiente al idioma original).

Ryder TE, Haukeland EA, Solhaug JH. Bilateral infrapatellar seneruptur hos tidligere frisk kvinne. *Tidsskr Nor Laegeforen* 1996; 116:41-2.

5. Suplemento de un volumen

Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect* 1994;102 Suppl 1:275-82.

6. Suplemento de un número

Payne DK, Sullivan MD, Massie Mj. Women's psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol* 1996;23(1 Suppl 2): 89-97.

7. Parte de un volumen

Ozben T, Nacitarhan S, Tuncer N. Plasma and urine sialic acid in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem* 1995;32(Pt 3):303-6.

8. Parte de un número

Poole GH, Mills SM. One hundred consecutive cases of flap lacerations of the leg in ageing patients. *N Z Med J* 1994;107(986 Pt 1):377-8.

9. Número sin volumen

Turan I, Wredmark T, Fellander-Tsai L. Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. *Clin Orthop* 1995;(320): 110-4.

10. Sin número ni volumen

Browell DA, Lennard TW. Immunologic status of the cancer patient and the effects of blood transfusion on antitumor responses. *Curr Opin Gen Surg* 1993:325-33.

11. Paginación en números romanos

Fisher GA, Sikić BI. Drug resistance in clinical oncology and hematology. Introduction. *Hematol Oncol Clin North Am* 1995 Apr;9(2):xi-xii.

12. Indicación del tipo de artículo, según correspondencia

Enzensber er W, Fischer PA. Metronome in Parkinson,s disease [carta]. *Lancet* 1996;347:1337.

Clement J, De Bock R. Hematological complications of hantavirus nephropathy (HVN) [resumen]. *Kidney Int* 1992;42:1285.

13. Artículo que contiene una retractación

Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML, Seyfried TN. Ceruloplasmin gene defect associated with epilepsy in EL mice [retractación de Garey CE,

Schwarzman AL, Rise ML, Seyfried TN. En: *Nat Genet* 1994;6:426-31]. *Nat Genet* 1995;11: 104.

14. Artículo retirado por retractación

Liou GI, Wang M, Matragoon S. Precocious IRBP gene expression during mouse development [retirado por retractación en *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:3127]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:1083-8.

15. Artículo sobre el que se ha publicado una fe de erratas

Hamlin JA, Kahn AM. Herniography in symptomatic patients following inguinal hernia repair [se publica una fe de erratas en *West J Med* 1995;162:278]. *West j Med* 1995; 162:28-31.

Libros y otras monografías

(Nota: Con anterioridad, el estilo de Vancouver indicaba, incorrectamente, que entre la editorial y la fecha debía ir una coma en vez de punto y coma, como debe ser).

16. Individuos como autores

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership. skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

17. Directores ("editores"), compiladores como autores

Norinan IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

18. Organización como autor y editorial

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington: The Institute; 1992.

19. Capítulo de libro

(Nota: Con anterioridad, el estilo de Vancouver prescribía el uso de dos puntos en vez de la letra p antes de las páginas.)

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. En: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

20. Actas de conferencias

Kimura j, Shibasaki H, editors. Recent advances in clinical neurophysiology. Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology; 1995 Oct 15-19; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

21. Artículo presentado en una conferencia

Bengtsson S, Tolheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. En: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff0, editors. MEDINFO 92. Proceed-

¹ Evidentemente, «extranjero» se entiende aquí en relación con el idioma inglés, pues los ejemplos de referencias bibliográficas se han trasladado directamente del original, sin adaptarlos. [N. del t.]



ings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

22. *Informe científico o técnico*

Publicado por la institución financiadora o patrocinadora:

Smith P, Golladay K. Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report. Dallas (TX): Dept. of Health and Human Services (US), Office of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report No.: HHSIGOE169200860.

Publicado por la institución ejecutora:

Field MjJ, Tranquada RE, Feasley JC, editors. Health services research: work force and educational issues. Washington: National Academy Press; 1995. Contract No.: AHCPR282942008. Sponsored by the Agency for Health Care Policy and Research.

23. *Tesis doctoral*

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [tesis doctoral]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

24. *Patente*

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors; Novoste Corporation, titular. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 jun 25.

Otros trabajos publicados

25. *Artículo de periódico*

Lee C. Hospitalizations tied to ozone pollution: study estimates 50,000 admissions annually. The Washington Post 1996 Jun 21; Sect. A:3 (col. 5).

26. *Material audiovisual*

HIV+/AIDS: the facts and the future [videocasette]. St. Louis (MO): Mosby-Year Book; 1995.

27. *Documentos legales*

Ley pública:
Preventive Health Amendments of 1993, Pub. L. No. 103-183, 107 Stat. 2226 (Dec. 14, 1993).

Proyecto de ley sin sancionar:

Medical Records Confidentiality Act of 1995, S. 1360, 104th Cong., 1st Sess. (1995).

Código de normas federales:

Informed Consent, 42 C.F.R. Sect. 441.257 (1995).

Audiencia:

Increased Drug Abuse: the Impact on the Nation's Emergency Rooms: Hearings Before the Subcomm. on Human Resources and Intergovernmental Relations of the House Comm. on Government Operations, 103rd Cong., 1st Sess. (May 26, 1993).

28. *Mapa*

North Carolina. Tuberculosis rates per 100,000 population, 1990 [mapa demográfico]. Raleigh: North Carolina Dept. of Environment, Health, and

Natural Resources, Div. of Epidemiology; 1991.

29. *Libro de la Biblia*

The Holy Bible. King James version. Grand Rapids (MI): Zondervan Publishing House; 1995. Ruth 3:1-18.

30. *Diccionarios y obras de consulta semejantes*

Stedman's medical dictionary. 26th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995. Apraxia; p.119-20.

31. *Obras clásicas*

The Winter's Tale: act 5, scene 1, lines 13-16. The complete works of William Shakespeare. London: Rex; 1973.

Trabajos inéditos

32. *En prensa*

(Nota: La NLM prefiere referirse a estos trabajos como «en preparación» [forthcoming] porque no todos se publicarán impresos.)

Leshner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med. En prensa 1996.

Material en soporte electrónico

33. *Artículo de revista en formato electrónico*

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [publicación periódica en línea] 1995 jan-mar [citada 1996 jun 5];1(1):[24 pantallas]. Se consigue en: URL: <http://www.cdc.gov/nicidod/EID/eid.htm>

34. *Monografía en formato electrónico*

CDI, clinical dermatology illustrated [monografía en CD-ROM]. Reeves JRT, Maibach H. CMEA Multimedia Group, producers. 2nd ed. Version 2.0. San Diego: CMEA; 1995.

35. *Fichero de computadora*

Hemodynamics 111: the ups and downs of hemodynamics [programa de computadora]. Version 2.2. Orlando (FL): Computerized Educational Systems; 1993.

Cuadros

Mecanografie o imprima cada cuadro a doble espacio y en hoja aparte. No presente los cuadros en forma de impresiones fotográficas. Numérelos consecutivamente siguiendo el orden en que se citan por primera vez en el texto, y asigne un título breve a cada uno. Cada columna llevará un encabezamiento corto o abreviado. Las explicaciones irán como notas al pie y no en el encabezamiento. En las notas al pie se explicarán todas las abreviaturas no usuales empleadas en cada cuadro. Como llamadas para las notas al pie, utilícese los símbolos siguientes en la secuencia que se indica: *, †, ‡, §, ¶, **, ††, ‡‡.

Identifique las medidas estadísticas de variación, tales como la desviación estándar y el error estándar de la media.

No trace líneas horizontales ni verticales en el interior de los cuadros.

Cerciórese de que cada cuadro aparezca citado en el texto.

Si incluye datos publicados o inéditos provenientes de otra fuente, obtenga la autorización necesaria para reproducirlos y conceda el reconocimiento cabal que corresponde.

Incluir un número excesivo de cuadros en relación con la extensión del texto puede ocasionar dificultades al confeccionar las páginas. Examine varios números recientes de la revista a la que planea presentar el artículo y calcule cuántos cuadros pueden incluirse por cada millar de palabras de texto.

Al aceptar un artículo, el director podrá recomendar que los cuadros suplementarios que contienen datos de respaldo importantes, pero que son muy extensos para publicarlos, queden depositados en un servicio de archivo, como el Servicio Nacional de Publicaciones Auxiliares en los Estados Unidos, o que sean proporcionados por los autores a quien lo solicite. En tal caso, se agregará en el texto la nota informativa necesaria. Dichos cuadros se presentarán junto con el artículo para su consideración.

Ilustraciones (figuras)

Envíe los juegos completos de figuras en el número requerido por la revista. Las figuras estarán dibujadas y fotografiadas en forma profesional; no se aceptarán los letreros trazados a mano o con máquina de escribir. En lugar de los dibujos, radiografías y otros materiales de ilustración originales, envíe impresiones fotográficas en blanco y negro, bien contrastadas, en papel satinado y que midan 127 x 173 mm, sin exceder de 203 x 254 mm. Las letras, números y símbolos serán claros y uniformes en todas las ilustraciones; tendrán, además, un tamaño suficiente para que sigan siendo legibles incluso después de la reducción necesaria para publicarlos. Los títulos y las explicaciones detalladas se incluirán en los pies o epígrafes, no sobre las propias ilustraciones.

Al reverso de cada figura pegue una etiqueta de papel que lleve anotados el número de la figura, el nombre del autor y cuál es la parte superior de la misma. No escriba directamente sobre el dorso de las figuras ni las sujete con broches para papel, pues quedan marcadas. Las figuras no se doblarán ni se montarán sobre cartón.

Las fotomicrografías incluirán en sí mismas un indicador de la escala. Los símbolos, flechas y letras usados en éstas deberán contrastar claramente con el fondo.

Si se usan fotografías de personas, estas no deberán ser identificables; de lo contrario, habrá que anexar un permiso por escrito para poder utilizarlas (véase la sección «Protección del derecho de los pacientes a que se respete su vida privada»).

Las figuras se numerarán en forma consecutiva de acuerdo con su primera mención en el texto. Si la figura ya fue publicada, se reconocerá la fuente.



te original y se presentará la autorización por escrito que el titular de los derechos de autor concede para reproducirla. Este permiso es necesario, independientemente de quien sea el autor o la editorial; la única salvedad son los documentos considerados como de dominio público.

En el caso de las ilustraciones en color, averigüe si la revista necesita negativos, transparencias en positivo o impresiones fotográficas. La inclusión de un diagrama en el que se indique la parte de la fotografía que debe reproducirse puede resultar útil a la redacción. Algunas revistas publican ilustraciones en color únicamente si el autor paga el costo extra.

Pies o epígrafes de las ilustraciones

Los pies o epígrafes de las ilustraciones se mecanografiarán o imprimirán a doble espacio, comenzando en hoja aparte e identificándolos con los números arábigos correspondientes. Cuando se utilicen símbolos, flechas, números o letras para referirse a ciertas partes de las ilustraciones, será preciso identificar y aclarar el significado de cada uno en el pie o epígrafe. En las fotomicrografías habrá que explicar la escala y especificar el método de tinción.

Unidades de medida

Las medidas de longitud, talla, peso y volumen se expresarán en unidades del sistema métrico decimal (metro, kilogramo, litro, etc.) o sus múltiples y submúltiplos.

Las temperaturas se consignarán en grados Celsius. Los valores de presión arterial se indicarán en milímetros de mercurio.

Todos los valores hemáticos y de química clínica se presentarán en unidades del sistema métrico decimal y de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI). La redacción de la revista podrá solicitar que, antes de publicar el artículo, los autores agreguen unidades alternativas o distintas de las del SI.

Abreviaturas y símbolos

Utilice únicamente abreviaturas corrientes. Evite las abreviaturas en el título y el resumen. Cuando se emplee por primera vez una abreviatura en el texto, irá precedida del término completo, salvo si se trata de una unidad de medida común.

Envío del manuscrito a la revista

Envíe por correo el número requerido de copias del manuscrito en un sobre de papel resistente; si es necesario, proteja las copias y las figuras metiéndolas entre dos hojas de cartón para evitar que las fotografías se doblen. Meta las fotografías y transparencias en su propio sobre de papel resistente.

Los manuscritos irán acompañados de una carta de envío firmada por todos los coautores. Es preciso incluir en ella lo siguiente: 1) información acerca de la publicación previa o duplicada, o

sobre la presentación de cualquier parte del trabajo a otra revista, según lo expresado líneas arriba; 2) una manifestación de las relaciones financieras o de otro tipo que pudieran dar lugar a un conflicto de intereses (*véase* más adelante); 3) una declaración de que el manuscrito ha sido leído y aprobado por todos los autores, que se ha cumplido con los requisitos de la autoría expuestos anteriormente en el presente documento y que cada autor está convencido de que el manuscrito representa un trabajo honrado; y 4) el nombre, la dirección y el número telefónico del autor correspondiente, quien se encargará de comunicarse con los demás autores en lo concerniente a las revisiones y a la aprobación final de las pruebas de imprenta. La carta incluirá cualquier información suplementaria que pueda resultar útil para el director, tal como el tipo de artículo que el manuscrito representa para esa revista en particular y si el autor (o los autores) estaría dispuesto a sufragar el costo de reproducir las ilustraciones en color.

El manuscrito se acompañará de copias de los permisos concedidos para reproducir material ya publicado, para usar ilustraciones o revelar información sobre individuos que puedan ser identificados, o para agradecer a ciertas personas su colaboración.