



Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

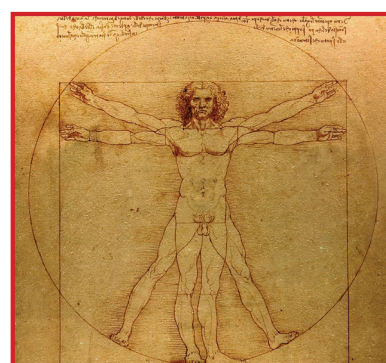
Volumen 13, 14, 15

Años 2010 - 2011 - 2012

Organo Oficial de la SVBE

CONTENIDO

Editorial	1
Perfil de las isoenzimas de LDH en Linfoma no Hodgkin: Correlación con marcadores tumorales. Priva Zabner de Oziel, Rosa Somoza, Valentina Wallis, Claudia Galicia, Jean Desenne, Ana Monzón de Orozco, Marina Gonzalez, Gretta Acquatella, Marisela Morales, Yasmin Ordoñez, Maria Alejandra Torres, Antonieta Natale, Aixa Müller	3
Caracterización molecular de aislados de <i>Acanthamoeba spp.</i> Victoria Luongo C., Alejandra Ugarte-Pelayo S., Mónica Galindo, María Alejandra Vethencourt.....	27
Factores de riesgo asociados a Síndrome Metabólico en pacientes atendidos en Familia Laboratorios Clínicos, Valencia, Estado Carabobo, Venezuela, periodo Diciembre 2011 - Marzo 2012 Beatriz Coelho y Ninoska González.....	34
Frecuencia de sensibilización a alimentos y aero-alergenos en pacientes recibidos en el laboratorio de Corpodiagnostica C.A durante el periodo 2010-2011. Cristina Najm, Natacha Camacho, Jhonarly Guzmán, Nirsén García, Noel Silva.....	43
Polimorfismo de los genes C677T de la enzima metil-n-tetrahidrofolato reductasa, A2756G de la enzima metionina sintasa y A66G de la enzima Metionina sintasa reductasa y su relación con la Homocisteína en pacientes con enfermedades cardiovasculares M ^a Fátima Garcés, Hilda Stekman, Gustavo Martínez, Leonela Dokmaji, Adriana Rivas, Noel Silva, Mercedes Cerviño, Celsy Hernández, Francisco Hernández	49
Evaluación de la flora fúngica del ambiente del archivo general del Estado Sucre. Venezuela. Josefa Diaz.....	55
Diálogo de saberes sobre el bioanálisis en Venezuela. Nathalia E. Cardona Ch. y Dagmarys C. Ortega Q.....	58



Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

Volumen 13, 14 y 15
Años 2010 - 2011 - 2012



Revista arbitrada e indizada dedicada a publicar los trabajos de los profesionales del Bioanálisis en investigación básica y aplicada.

Dirección: Av. Ppal c/c Alfredo Jahn y Alvarez Michaud.
Casa Colegio de Bioanalistas. Nro. 13-01. Urb. Los Chorros. Zona Postal 1070. Caracas - Venezuela.

ISSN: 1315-1746

Depósito Legal: pp 199202DF899

Indizada

LLACS

BIREME

MIEMBRO ASEREME

Publicación Semestral de la SVBE

2010-2012

Consejo Directivo

Editora

Dra. Ana Monzón de Orozco

Gerencia Editorial

Dra. María Fatima Garcés

MSc. Mercedes Cerviño

Gerencia Administrativa

Esp. Noel Silva

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

Junta Directiva

Presidenta

Dra. Ana Monzón de Orozco

Dirección General

Dirección Científica

Esp Shasbleidy Diaz

Dirección Administrativa

Esp. Noel Silva

Dirección de Proyectos y Divulgación Científica

Esp Valmore Rodriguez

Comisión para otorgar unidades crédito

Lic. Josefina Guariguata

Esp. Shasbleidy Diaz

Comité de Redacción

Dra. Priva Zabner de Oziel

Esp. Noel Silva

Esp. Shasbleidy Diaz

Esp. Valmore Rodríguez

MSc. Mercedes Cerviño

Dra. María Fátima Garcés



Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

CONTENIDO

Vol. 13, 14, 15

2010 - 2011 - 2012

Editorial	2
Perfil de las isoenzimas de LDH en Linfoma no Hodgkin: Correlación con marcadores tumorales. Priva Zabner de Oziel, Rosa Somoza, Valentina Wallis, Claudia Galicia, Jean Desenne, Ana Monzón de Orozco, Marina Gonzalez, Gretta Acquatella, Marisela Morales, Yasmin Ordoñez, Maria Alejandra Torres, Antonieta Natale, Aixa Müller	3
Caracterización molecular de aislados de <i>Acanthamoeba spp.</i> Victoria Luongo C., Alejandra Ugarte-Pelayo S., Mónica Galindo, María Alejandra Vethencourt.....	27
Factores de riesgo asociados a Síndrome Metabólico en pacientes atendidos en Familia Laboratorios Clínicos, Valencia, Estado Carabobo, Venezuela, periodo Diciembre 2011 - Marzo 2012 Beatriz Coelho y Ninoska González.....	34
Frecuencia de sensibilización a alimentos y aero-alergenos en pacientes recibidos en el laboratorio de Corpodiagnostica C.A durante el periodo 2010-2011. Cristina Najm, Natacha Camacho, Jhonarly Guzmán, Nirsén García, Noel Silva.....	43
Polimorfismo de los genes C677T de la enzima metil-n-tetrahidrofolato reductasa, A2756G de la enzima metionina sintasa y A66G de la enzima Metionina sintasa reductasa y su relación con la Homocisteína en pacientes con enfermedades cardiovasculares M ^a Fátima Garcés, Hilda Stekman, Gustavo Martínez, Leonela Dokmaji, Adriana Rivas, Noel Silva, Mercedes Cerviño, Celsy Hernández, Francisco Hernández	49
Evaluación de la flora fúngica del ambiente del archivo general del Estado Sucre. Venezuela. Josefa Diaz.....	55
Diálogo de saberes sobre el bioanálisis en Venezuela. Nathalia E. Cardona Ch. y Dagmarys C. Ortega Q.....	58



Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

CONTENTS

Vol. 13, 14, 15

2010 - 2011 - 2012

Editorial	2
Profiles of LDH isoenzymes in Non- Hodgking`s lymphoma: Correlation with tumor markers. Priva Zabner de Oziel, Rosa Somoza, Valentina Wallis, Claudia Galicia, Jean Desenne, Ana Monzón de Orozco, Marina Gonzalez, Gretta Acquatella, Marisela Morales, Yasmin Ordoñez, Maria Alejandra Torres, Antonieta Natale, Aixa Müller	3
Molecular characterization of <i>Acanthamoeba Spp.</i> isolates Victoria Luongo C., Alejandra Ugarte-Pelayo S., Mónica Galindo, María Alejandra Vethencourt.....	27
Risk factors associated with metabolic syndrome in patients attending family clinical laboratory, valencia, carabobo state, venezuela, period december 2011 - march 2012. Beatriz Coelho y Ninoska González.....	34
Frequency of Sensitization for Food and Aero-Allergens in Patients Received in a Venezuelan Laboratory During 2010-2011 Period. Cristina Najm, Natacha Camacho, Jhonarly Guzmán, Nirsén García, Noel Silva.....	43
C677T gene polymorphism of the enzyme n-methyl-tetrahydrofolate reductase, A2756G gene polymorphism of the enzyme methionine Synthase and A66G gene polymorphism of methionine synthase reductase and its relationship with homocysteine in patients with cardiovascular disease M ^a Fátima Garcés, Hilda Stekman, Gustavo Martínez, Leonela Dokmaji, Adriana Rivas, Noel Silva, Mercedes Cerviño, Celsy Hernández, Francisco Hernández	49
Evaluation of the fungic flora of the atmosphere of the general archives of the Sucre States. Venezuela. Josefa Diaz.....	55
Dialogue of knowledge on Venezuela bioanalysis. Nathalia E. Cardona Ch. y Dagmarys C. Ortega Q.....	58

EDITORIAL

En el año 1992 fue fundada la Revista Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas, bajo la dirección de la Dra. Ana Monzón de Orozco, la cual surge como órgano divulgativo del quehacer investigativo en el ejercicio de los Bioanalistas como producto de su ejercicio profesional. Sus páginas han reflejado el progreso institucional buscando la excelencia desde el primer volumen editado en junio de ese año, la cual se mantuvo hasta el año 1995 siendo la editora la Esp. Josefina Guariguata.

Luego dicha publicación perdió la regularidad hasta el año 2000 por causas ajenas a nuestra voluntad, en ese año asume la Presidencia de la Sociedad el Dr. Axel Santiago, quien fue además el Editor – Director de la Revista hasta el 2001.

En el 2006 es electa Presidenta de la SVBE la Dra. Ana Monzón de Orozco, quien además preside la Comisión de Publicaciones y asume la Edición de la Revista hasta el 2012, sin embargo, motivado a los problemas económicos del país y la falta de financiamiento de los Proyectos de investigación ocasionaron la discontinuidad de la revista hasta el 2009. Ante estos hechos nos vemos en la imperiosa necesidad de fusionar en los años 2010, 2011 y 2012, la publicación de la Revista con el objeto de enmendar la periodicidad de nuestra Revista.

Han transcurrido veintiún (21) años desde su fundación; sin embargo, la publicación periódica ininterrumpida se ha mantenido a lo largo de 13 años, gracias a los aportes hechos por los investigadores que han tenido a bien divulgar sus experiencias y conocimientos a través de nuestra Revista y a la extraordinaria labor de los Comités Editoriales, permitiendo así conservarla, enriquecerla y renovarla.

La Revista de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas especialistas ha sido una herramienta importante de difusión de la productividad científica de los Bioanalistas. Durante su trayectoria se han publicado un significativo número de valiosos trabajos originales, tratando con rigor científico temas de gran interés e impacto para la salud pública de la población venezolana, en áreas como bioquímica, bacteriología, epidemiología, micología, parasitología, microbiología, biotecnología, bioética, entre otros; igualmente, se han innovado secciones para la publicación de revisiones y trabajos históricos.

La Revista de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas, asumió el reto a pesar de las dificultades que han ocasionado las severas limitaciones presupuestarias que enfrentamos, por lo que se reinicia un nuevo año editorial con una selección de trabajos que constituyen importantes aportes para el Bioanálisis.

Atentamente

Dra. María Fatima Garcés
Comité Editorial

Premio Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas 2012 PERFIL DE LAS ISOENZIMAS DE LDH EN LINFOMA NO HODGKIN: CORRELACIÓN CON MARCADORES TUMORALES.

Priva Zabner de Oziel¹, Rosa Somoza¹, Valentina Wallis¹, Claudia Galicia¹, Jean Desenne¹, Ana Monzón de Orozco¹, Marina Gonzalez¹, Gretta Acquatella¹, Marisela Morales¹, Yasmin Ordoñez¹, María Alejandra Torres¹, Antonieta Natale¹, Aixa Müller¹.

¹Dirección: Instituto de Oncología y Hematología (IOH). Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS), Universidad Central de Venezuela (UCV).

Recibido para publicación junio 2012. Aprobado para publicación septiembre 2012.

RESUMEN:

Introducción: La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) está conformada por cinco isoenzimas y es un importante factor pronóstico en pacientes con Linfoma No Hodgkin (LNH). Nuestro objetivo fue estudiar el patrón de las isoenzimas de LDH en pacientes con LNH y su correlación con marcadores tumorales clínico-patológicos y biológicos. **Métodos:** Se evaluaron 67 pacientes de primera consulta con diagnóstico de LNH confirmados clínica e histopatológicamente, sin tratamiento previo, VIH negativo y sin presentar otras enfermedades, durante el período 1999-2004, siendo el tiempo promedio de seguimiento de 30 meses (rango 3-48 meses), edad promedio 55 años (rango 18-79), Índice Pronóstico Internacional (IPI) 60(90%) bajo riesgo y 7(10%) alto riesgo. Se recolectaron muestras de sangre, para la obtención de suero y sangre total para la determinación de LDH, Isoenzimas de LDH, enzimas (AST, ALT, fosfatasa alcalina), Beta 2 Microglobulina, CA125, IL-6, sRaIL-2, Proteína C Reactiva, Albúmina sérica y VSG. Se procesaron muestras de suero de controles sanos para establecer los valores de referencia de las isoenzimas de LDH. **Resultados:** Los niveles séricos de la LDH y los valores absolutos de las isoenzimas de LDH fueron significativamente superiores en los pacientes respecto al grupo control ($p < 0,001$). Las frecuencias de las isoenzimas LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 y LDH5 resultaron con niveles absolutos significativamente elevados en 25 (37%), 29 (43%), 32 (48%), 20 (39%) y 11 (16%) de los casos respectivamente. La asociación y correlación de la actividad de LDH1 con los factores clínico-patológicos adversos, IPI alto riesgo y marcadores biológicos alterados, sugieren su expresión como un indicador de recambio celular y actividad de la enfermedad. Los cambios en el patrón de la LDH2 reflejaron su asociación y correlación con factores clínico-patológicos y biológicos indicadores de la progresión de la enfermedad, la actividad proliferativa del tumor, un IPI adverso y la respuesta del paciente frente a la enfermedad. La LDH3 fue la de mayor frecuencia con niveles elevados y su actividad se asoció con factores pronósticos clínico-patológicos y biológicos adversos que reflejan la respuesta del paciente frente al tumor, actividad inflamatoria y la propensión a la extensión de la enfermedad. Su correlación con el IPI de alto riesgo y marcadores biológicos alterados, sugiere ser un indicador de la actividad proliferativa del tumor y la afectación del paciente. Los niveles incrementados de LDH4 y su patrón de distribución, se asociaron y correlacionaron con la respuesta del paciente frente al tumor, un IPI de alto riesgo y la progresión y diseminación de la enfermedad, expresándose como marcador de actividad celular y de adaptación a un metabolismo anaeróbico. La alteración de los niveles de la LDH5 reflejó su asociación y correlación con el deterioro del estado general del paciente y su respuesta frente a la enfermedad, la actividad proliferativa y el potencial invasivo del tumor. Los cambios en la distribución del patrón sugieren una actividad adaptada al metabolismo anaeróbico en los tejidos tumorales. **Conclusiones:** Las alteraciones del patrón de las isoenzimas de LDH expresadas como marcadores de recambio y actividad proliferativa celular, adaptación metabólica y actividad de la enfermedad, permitirían afinar la información aportada por la LDH sérica total en los pacientes con LNH y profundizar sobre la biología del tumor.

Palabras claves: LDH, Isoenzimas de LDH, Linfoma No Hodgkin.

PROFILES OF LDH ISOENZYMES IN NON- HODKING`S LYMPHOMA: CORRELATION WITH TUMOR MARKERS.

SUMMARY

Introduction: Lactate dehydrogenase (LDH) consists of five isoenzymes and is an important prognostic factor in non-Hodgkin's lymphoma (NHL) patients. Our objective was to study the pattern of LDH isoenzymes in patients with NHL and its correlation with clinical pathological and biological tumor markers. **Methods:** We evaluated 67 newly diagnosed NHL patients clinically and histologically confirmed, previously untreated, HIV-negative and free from other diseases, during the period 1999-2004, the average follow-up time of 30 months (range 3-48), median age of 55 years (range 18-79), the International Prognostic Index (IPI) 60 (90%) of low risk and 7 (10%) of high risk. Serum and whole blood samples were collected for the determination of LDH, LDH isoenzymes, enzymes (AST, ALT, phosphatase alkaline), Beta 2 Microglobulin, CA125, and IL-6, sRaIL-2, C Reactive protein, serum albumin and ESR. Serum samples were processed from healthy controls in order to set reference values of LDH isoenzymes. **Results:** Serum levels of LDH and absolute values of LDH isoenzymes were significantly higher in patients compared to controls ($p < 0.001$). Frequencies of high absolute values of LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 and LDH5 isoenzymes were significantly elevated in 25 (37%), 29 (43%), 32 (48%), 20 (39%) and 11 (16%) of cases, respectively. LDH1 activity associated and correlated with adverse clinical pathological, biological factors and high risk IPI, suggests that it is an indicator of cell turnover and disease activity. LDH2 changes reflected its association and correlation with clinical pathological and biological factors which are indicators of disease progression, tumor proliferative activity, adverse IPI and the patient's response to the illness. LDH3 was elevated with greater frequency and its activity was associated with clinical pathological and biological prognostic factors reflecting the patient's response against the tumor, as well as inflammatory activity and disease extension. Its correlation with a high-risk IPI and altered biomarkers, suggested an indicator of tumor proliferative activity and patient involvement. Increased levels of LDH4 and the distribution pattern were associated and correlated with patient response against the tumor, high-risk IPI and the progression and spread of the disease, being expressed as a marker of cellular activity and anaerobic metabolism adaptation. Altered levels of LDH5 were associated and correlated with the patient's overall deterioration, their response to the disease, and the tumor's proliferative activity and invasive potential; changes in the distribution of its activity suggests an adapted pattern to anaerobic metabolism in tumor tissues. **Conclusions:** Alterations in the pattern of LDH isoenzymes expressed as turnover markers and cell proliferative activity, metabolic adaptation and disease activity, would refine the information provided by the total serum LDH in patients with NHL and deepen our knowledge about tumor biology.

Keywords: LDH, LDH isoenzymes, Non Hodgkin Lymphoma.

Solicitar copia a: Priva Zabner de Oziel (privaoziel@hotmail.com)

Introducción

Los Linfomas No Hodgkin (LNH) comprenden un grupo heterogéneo de neoplasias linfoides histológica y biológicamente diferentes que presentan una diversidad de cuadros clínicos y diferentes respuestas al tratamiento (1,2).

La enzima lactatodeshidrogenasa constituye uno de los componentes del Índice Pronóstico Internacional (IPI) en LNH y es considerada como un factor pronóstico adverso de la sobrevida en pacientes con esta patología (3-9).

Si bien la LDH total sérica es un factor pronóstico en LNH, existe poca información respecto al contenido sérico de las isoenzimas de LDH o sobre la significancia de sus alteraciones en esta malignidad.

Las deshidrogenasas de LDH comprenden una familia de 2-hidroxiácido-oxidoreductasas que simultánea, estereoespecíficamente y de forma reversible, interconvierten piruvato a lactato y NADH a NAD⁺. Esta reacción conocida como fermentación homoláctica anaeróbica, constituye un medio importante de regeneración de NAD⁺, permitiendo la continuación de la glicólisis. La LDH es una enzima esencial en la vía glicolítica de Embden -Meyerhof para la utilización de la glucosa, por lo que está presente prácticamente en todos los tejidos humanos donde ocurre la glicólisis, permitiendo generar un déficit temporal de oxígeno por acumulación de lactato, el cual es oxidado a piruvato cuando el oxígeno se hace accesible. Los niveles tisulares de la LDH son aproximadamente 500 veces mayor que los niveles séricos, por lo cual aun un pequeño daño tisular, puede determinar un incremento detectable de la LDH total en sangre; la técnica más específica para localizar el daño tisular es mediante el estudio de las isoenzimas de LDH (10-15).

La LDH es una molécula tetramérica compuesta por dos subunidades o isoformas polipeptídicas inmunológicamente distintas, conocidas como el monómero M ó A (abundante en músculo) y el monómero H ó B (abundante en corazón), también se ha identificado un tercer tipo, la forma X, restringida a los testículos. La isoforma M corresponde al gen A humano, localizado en el cromosoma 11p15.4 y está presente predominantemente en los tejidos anaeróbicos, tales como el músculo esquelético e hígado y la forma H corresponde al gen B humano, localizado en el cromosoma 12p12.2p12.1, predominante en tejidos aeróbicos tal como el músculo cardíaco. La combinación de las diferentes subunidades en tetrámeros híbridos o mezclados conforman

las cinco isoenzimas de LDH: H4, MH3, M2H2, M3H y M4 presentando una estructura altamente conservada y se designan respectivamente LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 y LDH5, de acuerdo a su movilidad electroforética de ánodo a cátodo (11-15).

Si bien, la enzima LDH sérica es considerada un marcador pronóstico de gran utilidad en malignidades hematológicas tales como LNH y mieloma múltiple (3,10,16,17), la información respecto a las modificaciones y alteraciones séricas del perfil de isoenzimas es escasa.

Los estudios de Paule y col. (18) sobre la actividad de las isoenzimas de LDH en malignidades hematológicas reportaron en LNH una disminución de la LDH1 y un incremento de LDH2, como un signo de evolución clínica hacia una fase más agresiva de la enfermedad o la ausencia de remisión clínica, aún sin observar variaciones significativas de la LDH total sérica y en los casos de leucemia linfocítica crónica y linfoma de Hodgkin no reportaron cambios significativos.

Por su parte Rotenberg y col. (19) reportaron niveles elevados de LDH sérica con predominio de las isoenzimas LDH2 y LDH3 como único signo y, además, de aparición más temprana en linfoma maligno oculto.

El grupo de Ricerca y col (20) analizaron el patrón sérico de las isoenzimas de LDH en un grupo de pacientes con LNH, al momento del diagnóstico, en recaída y remisión completa y su relación con el estadio clínico, el subtipo histológico y los síntomas generales. Los autores reportaron disminución de la LDH1 y aumento de las isoenzimas 3 y 4 respecto al grupo normal. Tanto la LDH total como las isoenzimas 1 y 4 se vieron influenciadas por el estadio clínico, grupo histológico y la presencia de síntomas generales. La isoenzima LDH3 se mantuvo elevada independientemente del estadio clínico, la histología y la presencia de síntomas generales, sugiriendo ser un marcador confiable de la presencia de enfermedad, mientras que la LDH total estaría más relacionada con la expansión del linfoma.

Otros trabajos reportan la aplicación de las isoenzimas de LDH como marcador predictivo de metástasis, con utilidad pronóstica e importancia para el monitoreo terapéutico. En tal sentido Dumontet y col. (21) evaluaron los perfiles y el valor pronóstico de las isoenzimas de LDH en pacientes con LNH. Los pacientes con incrementos de LDH sérica al momento del diagnóstico presentaron porcentajes y valores absolutos significativamente elevados de LDH2 y LDH3 respectivamente. Los

valores absolutos de LDH3 correlacionaron con el estado funcional alterado, estadio clínico avanzado e histología agresiva, mientras que, los porcentajes elevados de LDH2 solo correlacionaron con el estado funcional alterado.

Recientemente Bouafia y col. (22) analizaron el perfil de las isoenzimas de LDH y su valor pronóstico en pacientes con malignidades hematológicas. Sus resultados mostraron niveles elevados de la isoenzima LDH3 y porcentajes de LDH2 como factores pronósticos de una menor sobrevida global en los pacientes con LNH. Según el análisis univariado de la sobrevida, los valores elevados de LDH3, los altos porcentajes de LDH2, la LDH total, el estadio clínico y la agresividad del tumor, fueron variables pronósticas de la sobrevida.

Una serie de investigaciones han mostrado la actividad de las isoenzimas de LDH como indicador de alteraciones celulares y metabólicas, así como de marcador pronóstico (21-26). Jurisic y col. (27-30) reportaron cambios en la actividad intracelular de la LDH y sus isotipos (H y M) asociados con la inducción de apoptosis y alteración de la membrana celular en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con linfoma.

El gran interés en profundizar el conocimiento sobre los biomarcadores pronósticos, se origina de la heterogeneidad pronóstica observada dentro de los grupos de riesgo del IPI y del mejor entendimiento de la biología de los linfomas, lo cual es crítico para determinar el pronóstico de la enfermedad.

La evaluación y aplicación de las isoenzimas de LDH y el de una serie de marcadores tumorales en el estudio del LNH, es importante como expresión del comportamiento biológico de esta enfermedad. Profundizar el estudio del patrón de las isoenzimas de LDH en pacientes con Linfoma No Hodgkin, su asociación y correlación con otros marcadores tumorales, contribuiría a afinar y complementar la información del IPI, los parámetros clínico-patológicos y biológicos de la enfermedad, además de estudiar su comportamiento en población venezolana.

Métodos

Pacientes

Se evaluaron 67 pacientes con diagnóstico de LNH confirmados clínica e histopatológicamente, quienes asistieron a la Consulta de la Comisión de Linfoma en el Instituto de Oncología y Hematología (IOH), MPPS-UCV, durante el periodo 1999-2004, siendo el tiempo promedio del

seguimiento de la enfermedad de 30 meses (rango 3-48 meses). Se incluyeron pacientes que no recibieron tratamiento previo para la enfermedad, con serología negativa para VIH, excluyéndose los pacientes con LNH con enfermedades asociadas tipo diabetes, insuficiencia renal u otras. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del IOH.

Las características clínico-patológicas consideradas como factores pronósticos comprendieron: sexo, edad, histología del tumor (Clasificación OMS) (31), estadio clínico (Clasificación ANN ARBOR modificada en Costwolds) (32), presencia de síntomas B (fiebre, sudoración nocturna y pérdida de peso), estado funcional escala Karnofsky (33), número de regiones ganglionares, afectación extraganglionar, enfermedad voluminosa, compromiso de médula ósea, compromiso abdominal. De acuerdo al IPI (3) se clasificaron en grupos de riesgo: Bajo riesgo (bajo riesgo e intermedio bajo) y Alto riesgo (riesgo intermedio alto y alto riesgo). En la práctica clínica con fines pronósticos los LNH se clasificaron en las categorías de linfomas indolentes y agresivos (2).

Estrategia de tratamiento y evolución clínica.

Los pacientes se trataron con esquemas de primera línea establecidos internacionalmente para LNH (32) y el seguimiento clínico de los pacientes se evaluó de acuerdo a los siguientes criterios:

- Remisión completa (RC): 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 fueron anormales antes de iniciar la quimioterapia. Una vez finalizado el tratamiento, la respuesta se mantendrá, al menos 3 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 Hemoglobina, > 100.000 plaquetas /mm³ y >1.500 granulocitos/mm³).
- Remisión completa incierta (RCi): Se define como la desaparición de todos los síntomas y casi todas las masas medibles en dos diámetros (reducción en más del 75% por TAC) pero con persistencia de anomalías radiológicas por ese método (radiología o tomografía). Sin embargo, la Gammagrafía por Galio o el PET-scan deberán ser negativos.
- Remisión parcial (RP>50%): Remisión parcial se define como una reducción del 50% o más de la enfermedad medible durante al menos 1 mes. Debe haber ausencia de citopenias periféricas.

- **Enfermedad estable (EE):** Regresión en términos de enfermedad medible inferior al 50%, sin nuevas manifestaciones y si hay progresión, esta será menor del 25%.
- **Fracaso y/o progresión (F):** 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.
- **No respuesta:** No variación de las manifestaciones clínicas y signos de la enfermedad inicial con el tratamiento aplicado.
- **Sobrevida global (SG):** 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 (SLE):** Es el tiempo transcurrido entre la fecha de RC y la nueva aparición de síntomas y signos de enfermedad (recaída).
- **Sobrevida libre de falla al tratamiento:** Es el tiempo transcurrido desde que se inicia el tratamiento hasta la recaída o muerte.

Grupo Control

Para la determinación de los valores de referencia de la LDH total sérica e isoenzimas de LDH en la población venezolana se procesaron 122 muestras de controles provenientes de donantes de Banco de Sangre e individuos aparentemente sanos, con edades comprendidas entre 18-74 años, de los cuales 60(49%) fueron de sexo femenino y 62(51%) de sexo masculino.

Muestras

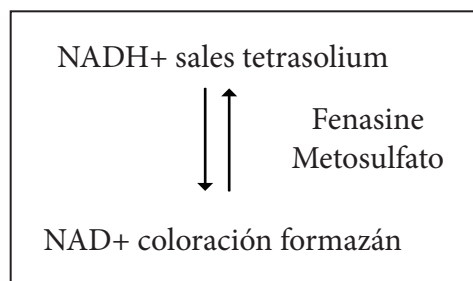
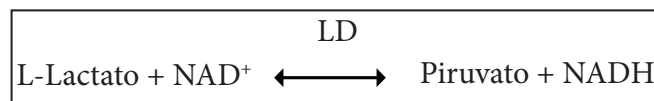
Las muestras de sangre se recolectaron por punción venosa, para obtener suero y sangre total, una sola toma de muestra por paciente al momento del diagnóstico, antes de iniciar el tratamiento. Las muestras de suero se separaron a partir de las muestras de sangre, recolectada en tubos sin anticoagulante, por centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos a 20°C. Los sueros se procesaron inmediatamente para la determinación de las enzimas hepáticas y las isoenzimas de LDH. Para la determinación de la LDH total e isoenzimas de LDH, los sueros se conservaron a la temperatura de 15-30°C ó 2-6°C hasta 48 horas, dada la inestabilidad de las fracciones y la sensibilidad de las mismas a la temperatura de congelación. Para la determinación de los otros marcadores biológicos séricos las muestras de suero se congelaron a -70°C, repartidas en

fracciones de 0.5 ml. Para la obtención de sangre total se obtuvieron las muestras de sangre venosa anticoagulada con EDTA para la determinación de los marcadores hematológicos y la velocidad de sedimentación globular (VSG).

Determinación de Marcadores Biológicos:

Isoenzimas de LDH: Se realizó la determinación cualitativa y cuantitativa de las isoenzimas de LDH aplicando el método de electroforesis en gel de agarosa, según el procedimiento del sistema Helena Titan Gel (Helena Laboratorios Catálogo N° 3043). Este método provee mayor información que otros, porque permite la separación de las cinco fracciones de LDH sin riesgo de superposición de las mismas. El medio de soporte utilizado incluyó acetato de celulosa, agar agarosa y geles de acrilamida.

- El fundamento de la determinación de las isoenzimas de LDH se basó en la separación de acuerdo a su movilidad electroforética en gel de agarosa. Posteriormente cada isoenzima se detectó colorimétricamente, mediante la reducción de la sal tetrazolium con la formación de una coloración formazán.



Reactivos: Placas Titán Gel LD Isoenzimas (Placas de agarosa en buffer Barbital), Reactivo Titan Gel LD Isoenzima(conteniendo NAD Lithium lactato, NBT y PMS reconstituido en 1 ml de diluyente),Titan Gel Isoenzima diluyente (Buffer AMP, Bicina, Barbital, Aspartato y Azida de Na),. Buffer Titan Gel LD Isoenzima: AMPD, Bicina, Barbital y Aspartato, Azida de Na, pH 8.1-8.3.

Procedimiento: Se preparó la cámara de electroforesis añadiendo 35 ml del buffer diluido en cada canal interno de la cámara y una cámara húmeda a 45°. Se aplicaron 3µl de la muestra en cada pozo del gel de agarosa, previa colocación de la plantilla. Se colocó la placa portadora del gel en la cámara electroforética y se realizó la corrida a 100

voltios por 15 minutos. El reactivo de isoenzimas LD se preparó cinco minutos antes de culminar la corrida electroforética. Para la visualización de las bandas se colocó la placa de la corrida sobre una lámina de vidrio, se vertió el reactivo LD sobre el gel en el extremo anódico y se extendió con una pipeta serológica a lo largo de toda la superficie de la placa. Luego de 15 segundos se corrió la pipeta en sentido contrario para eliminar el exceso del reactivo. Se colocó la placa en la cámara de incubación e incubó a 45°C por 25 minutos. Al final de este período, se lavó la placa en ácido acético al 10% por 2 minutos, luego de remover la placa y colocarla sobre una superficie de vidrio y cubrir el gel con papel de filtro humedecido en ácido acético al 10% y tres toallas de papel se colocó en una prensa para someterlo a presión por 3 a 5 minutos. Posteriormente, eliminado el papel de filtro y las toallas de papel, se lavó la placa con ácido acético al 10% por un minuto y secó a 60°C por cinco minutos. La evaluación cualitativa se realizó mediante la visualización de las bandas y la evaluación cuantitativa mediante la lectura de la placa e integración de las bandas en un densitómetro a 590 nm. (Densitómetro Helena Scan 2 (Cat N° 1260), para lo cual se introdujo el valor de LDH total para calcular los valores absolutos y porcentuales de las isoenzimas. La interpretación del patrón de isoenzimas de LDH se realizó en conjunto con el valor de la actividad de LDH total sérica.

Valores de referencia: En el grupo control (n=122) se determinaron los rangos referenciales de las isoenzimas de LDH expresados en valores absolutos y porcentuales. **LDH1:** 18.4-71.7 U/l , 18.6-47.7% ; **LDH2:** 28.1-90.1U/L , 26.2-47.9%; **LDH3:** 14-47.5 U/L , 11.6-27.2% ; **LDH4:** 3.1-19.2U/L , 2.8-13.5%; **LDH5:** 2.3- 17.2 U/L, 2.0-12.5%. El criterio de corte o cut off correspondió al límite superior del rango de referencia establecido para cada isoenzima.

- **Lactato deshidrogenasa (LDH):** Método LDH-L cinético UV (Invelab Catálogo N° 89289). Valores de referencia: 80-285 U/L
- **Aspartato amino transferasa (AST):** Método cinético UV (Roche Catálogo 851121). Valores de referencia: ≤38 U/L
- **Alanino amino transferasa (ALT):** Método cinético UV (Roche Catálogo 851132). Valores de referencia: ≤ 41 U/L
- **Fosfatasa alcalina (F. ALC):** Método cinético colorimétrico (Roche Catálogo 816388). Valores de referencia: ≤ 290 U/L
- **Albúmina sérica:** Método Verde Bromocresol (Colorimétrico).Autoanalizador Hitachi

modelo 704 (Roche). Valores de referencia: 3.4-4.8 g/l

- **Antígeno de Cáncer CA 125:** Se determinó mediante la tecnología de inmunoensayo enzimático sobre micropartículas (MEIA) empleando el sistema IMX (Abbott Laboratorios Catálogo N° 69-4123/R3). Valores de referencia: ≤35 u/ml
- **B2 microglobulina (B2M):** Se determinó aplicando la tecnología de inmunoensayo enzimático sobre micropartículas (MEIA) empleando el sistema IMX (Abbott Laboratorios Catálogo N° 69-2197/R11). Valores de referencia: ≤ 3.4 mg/l.
- **Interleuquina-6 (IL-6):** Se empleó un ensayo inmunoenzimático (ELISA) método sándwich, (Quantikine Catálogo N° D6050 RD Systems). Valores de referencia: 0 – 1.99 pg/ml (34).
- **Receptor alfa soluble de Interleuquina 2 (sRα IL-2):** Se aplicó el método de ensayo inmunoenzimático (ELISA) tipo sándwich, (Quantikine Catálogo N° DR2A00 RD Systems). Valores de referencia: 320-2000 pg/ml (35).
- **Proteína C Reactiva (PCR):** Se utilizó la prueba de aglutinación látex directo en placa, semicuantitativo. Valores de referencia: ≤6 mg/l. (Wiener LAB Catalogo N° 1683152).
- **Marcadores hematológicos:** Hematología completa. Analizador Cell Dyn 1.400 (Laboratorios Abbott).- VSG. Método: Wintrobe 1 hora. Valores de referencia: 0-15 mm

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando los programas Statgraphics Statistical, Graphics Systems Version 6, y Graphpad Software V2 05^a Basic Statistics, Inc.

Se aplicaron las siguientes pruebas estadísticas con un nivel de significancia $p=0.05$

- **Análisis exploratorio de los datos (EDA):** Histograma de frecuencia para evaluar la distribución de la normalidad de los datos, análisis de componentes principales para la representación gráfica de la correlación multifactorial de las variables biológicas.
- **Análisis no paramétrico:** Prueba de U Mann Whitney para comparar el comportamiento de una variable entre dos grupos, expresado por el valor de la mediana (M) y la prueba de Spearman para determinar la correlación entre dos variables diferentes expresada por el Coeficiente de Correlación (r) de Spearman.

Resultados

Características clínico-patológicas y biológicas de los pacientes con LNH:

La Tabla I presenta las características clínico-patológicas de los pacientes al momento del diagnóstico, antes de iniciar el tratamiento. Se evaluaron 67 pacientes con edades comprendidas entre 18 a 79 años (Mediana 55 años), siendo el tiempo promedio de seguimiento de la enfermedad de 30 meses (rango 3-48 meses). Tomando en cuenta los factores pronósticos adversos, el 58% incidió en el sexo masculino y el 31% en pacientes mayores de 60 años. Según la clasificación de la OMS, el 60% de los linfomas correspondió al tipo histológico difuso de células grandes tipo B (LDCGB) y el 12% de los pacientes presentaron el tipo folicular. De acuerdo a las categorías pronósticas, el 73% de los pacientes presentaron LNH agresivos, que comprenden histológicamente a los linfomas de intermedio y alto grado de malignidad, con mayor tendencia al crecimiento y diseminación (difuso de células grandes tipo B, células del manto, parecido al Burkitt, células grandes anaplásicas T, células T periféricas e inmunoblástico) y el 27% correspondió a LNH indolentes, histológicamente de bajo grado de malignidad y crecimiento lento (folicular, linfocítico pequeño, tipo maltoma y micosis fungoides).

El 60% de los pacientes presentaron estadio clínico III - IV (enfermedad avanzada) y el 9% estado funcional alterado (Karnofsky <70%). El 66% de los pacientes presentaron enfermedad extranodal en más de un área y enfermedad voluminosa mayor de 10 cm., el 30% presentó más de 4 áreas ganglionares. La presencia de síntomas B, el compromiso de médula ósea y la enfermedad abdominal se detectaron en el 43%, 21% y 59% de los pacientes respectivamente. De acuerdo al Índice Pronóstico Internacional (IPI), el 90% de los linfomas fueron de bajo riesgo, incluyendo los de bajo riesgo y riesgo intermedio bajo, mientras que el 10% de los linfomas fueron de alto riesgo, agrupando a los de riesgo intermedio alto y alto riesgo.

En relación a los marcadores biológicos, 17(25%), 8(12%), 8(12%), 11(16%), 16(24%) y 30(45%) de los pacientes presentaron respectivamente valores elevados de B2M, AST, ALT, FALC, CA125, PCR y 16 (24%) de los pacientes cursaron con concentraciones disminuidas de albúmina sérica. Respecto a la LDH, 9(13%) presentaron valores anormales, siendo el criterio de anormalidad los valores de la actividad enzimática por encima del 100% del límite superior del rango de referencia, de acuerdo a lo establecido en el IPI (3). Se

determinaron niveles elevados de IL-6 y sRα IL-2 en 38(66%) y 25(58%) de los casos respectivamente, habiendo 6 y 24 muestras respectivamente con valores desconocidos por no cumplir con las condiciones adecuadas de almacenamiento. Los valores de VSG resultaron aumentados en 30(79%) del grupo evaluado, habiendo 29 muestras con valores desconocidos de este parámetro.

Comparación de los niveles séricos de LDH total e Isoenzimas de LDH en pacientes con LNH y controles sanos:

La Tabla II presenta los niveles séricos de la actividad de LDH total e isoenzimas de LDH de los pacientes comparados con el grupo control de individuos sanos. Los pacientes con LNH al momento del diagnóstico, antes de iniciar el tratamiento, presentaron niveles de LDH total significativamente superiores a los del grupo control ($p < 0.001$). Los niveles séricos de las isoenzimas LDH1, LDH2, LDH3, LDH4, LDH5, expresados en valores absolutos, resultaron significativamente elevados en los pacientes respecto al grupo control ($p < 0.001$).

El análisis comparativo de los valores de la mediana expresado en porcentaje del valor de la LDH total, muestra la actividad de LDH1 significativamente inferior en los pacientes respecto a los controles ($p = 0.02$). Por el contrario, se obtuvieron porcentajes significativamente elevados de LDH2 ($p = 0.04$), LDH3 ($p < 0.01$) y LDH5 ($p = 0.045$) en los pacientes respecto al grupo control y no se obtuvieron diferencias respecto a LDH4.

Niveles séricos de LDH total y perfil de Isoenzimas de LDH en pacientes con LNH:

De los 67 pacientes evaluados 9(13%) presentaron niveles séricos de LDH total significativamente elevados y 58(87%) presentaron niveles por debajo del criterio de corte ($p < 0.001$) (Tabla III). Respecto a las isoenzimas LDH1, LDH2, LDH3, LDH4, LDH5, la distribución en valores absolutos indicó niveles significativamente elevados ($p < 0.0001$) en el 37%, 43%, 48%, 39% y 16% de los casos respectivamente. La distribución porcentual del perfil de isoenzimas reveló valores elevados de LDH1, LDH2, LDH3, LDH4, LDH5 en el 1%, 4%, 10%, 4% y 4% respectivamente. Si bien el análisis comparativo de las medianas de los valores en porcentajes resultó significativo, la distribución de los valores se basa en grupos disímiles no comparables entre sí respecto al tamaño de la muestra (datos no mostrados).

En relación al grupo de pacientes con niveles elevados de LDH total ($n = 9$; 13%), la incidencia de los niveles elevados de las isoenzimas de LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 y LDH5, en este grupo

Tabla I. Características clínico-patológicas de los pacientes con LNH

Características		N=67	%(100)
Edad (mediana 55, rango 18-79 años)	≤ 60 años	46	(67)
	> 60 años	21	(33)
Sexo	Masculino	39	(42)
	Femenino	28	(58)
Clasificación Histológica	Difuso de células grandes	40	(60)
	Células del manto	1	(1)
	Parecido Burkitt	1	(1)
	Células grandes anaplásicas T	3	(5)
	Células T periféricas	2	(3)
	Inmunoblástico	2	(3)
	Folicular	8	(12)
	Linfocítico pequeño	6	(9)
	Tipo maltoma	2	(3)
	Micosis fungoide	2	(3)
Categorías pronósticas	Agresivos	49	(73)
	Indolentes	18	(27)
Estadio Clínico	I-II	27	(40)
	III-IV	40	(60)
Estado funcional Karnofsky	< 70%	6	(9)
	≥ 70%	61	(91)
Enfermedad extraganglionar	≤ 1	23	(34)
	> 1	44	(66)
Síntomas B	No	38	(57)
	Si	29	(43)
Nº regiones ganglionares	0-4	47	(70)
	>4	20	(30)
Enfermedad voluminosa	≤10 cm	23	(34)
	> 10 cm	44	(66)
Compromiso de médula ósea	No	53	(79)
	Si	14	(21)
Enfermedad abdominal	No	27	(41)
	Si	40	(59)
IPI	Bajo riesgo	60	(90)
	Alto riesgo	7	(10)

IPI: Índice Pronóstico Internacional Bajo riesgo (bajo e intermedio bajo) Alto riesgo (intermedio alto y muy alto riesgo)

correspondió a 7(78%), 9(100%), 9(100%), 8(89%) y 5(56%) respectivamente (datos no mostrados).

Asociación de los niveles séricos de LDH total e Isoenzimas de LDH con las características clínico-patológicas de los pacientes con LNH: Las Tablas IV y V muestran el perfil de isoenzimas de LDH expresado en valores absolutos y porcentajes, relacionado con las características clínico-patológicas de los pacientes. De acuerdo a los grupos etarios, no se obtuvieron modificaciones

en la actividad de LDH total y del patrón de isoenzimas de LDH. Observamos niveles absolutos significativamente superiores de LDH1 ($p<0.0001$) y LDH2 ($p=0.02$) en el grupo de pacientes con estadio clínico III - IV respecto al grupo con estadio clínico I y II, de modo que éstas isoenzimas son las que influirían sobre la significancia de la LDH total ($p=0.018$) entre los grupos comparados; por el contrario no se observaron variaciones en los niveles absolutos de

Tabla II. Niveles séricos de LDH total e isoenzimas de LDH en pacientes con LNH y controles sanos

Variables	Pacientes (n=67)			Controles (n=122)		
	(M)	Rango	Referencia	(M)	Rango	Referencia
LDHT U/L	204	(83-1371)		131	(80-285)	<0.001
LDH1 U/L	55.4	(4.5-596)		36.3	(18.4-71.7)	<0.001
	%	25.0	(8.0 - 54)	27.8	(18.6-47.7)	0.02
LDH2 U/L	78.1	(24.1-535.5)		50.5	(28.1-90.1)	<0.001
	%	39.4	(22.2-50.2)	37.6	(26.2-47.9)	0.04
LDH3 U/L	44.1	(16.1-394.2)		28.8	(14-47.5)	<0.001
	%	21.9	(4.6-118.8)	14.0	(11.6-27.2)	<0.001
LDH4 U/L	16.0	(4.2-260.6)		8.4	(3.1-19.2)	<0.001
	%	6.7	(2.8-21.4)	6.4	(2.8-13.5)	0.47
LDH5 U/L	9.3	(4.0-86.5)		6.2	(2.3-17.2)	<0.001
	%	4.6	(1.0-26.8)	3.9	(2.0-12.9)	0.045

LDH: lactato deshidrogenasa
p *: U Mann-Whitney.

LNH: Linfoma No Hodgkin
M= Mediana

p significativa = 0,05

LDH3, LDH4 y LDH5 asociadas con la progresión de la enfermedad. El análisis porcentual reveló valores significativamente elevados de LDH4 y LDH5 ($p < 0.0001$) asociados al grupo de pacientes con estadio clínico III – IV.

La actividad de la LDH total y de las cinco isoenzimas en valores absolutos resultó significativamente aumentada ($p \leq 0.05$) en los pacientes con estado funcional alterado comparado con el grupo de pacientes con estado funcional normal, siendo la de menor significancia la isoenzima LDH5. El análisis de los valores en porcentaje no arrojó resultados significativos.

La asociación de la actividad de la LDH total e isoenzimas de LDH con la enfermedad extraganglionar no arrojó resultados significativos en valores absolutos. Sin embargo, los porcentajes de las fracciones de las isoenzimas de LDH3 y LDH4 fueron significativamente superiores ($p=0.05$) en los pacientes que presentaron más de una región extranodal. No se observaron variaciones asociadas a esta condición para las isoenzimas LDH1, LDH2 y LDH5.

Los pacientes que presentaron síntomas B, expresaron niveles absolutos significativamente elevados de LDH total ($p=0.001$), LDH1 ($p=0.05$), LDH2 ($p=0.02$), LDH3 ($p=0.05$) y LDH4 ($p < 0.0001$), respecto a los pacientes con ausencia de síntomas B; no se detectaron diferencias entre ambos grupos relacionadas con LDH5 y la distribución en porcentajes no presentó modificaciones significativas.

De las cinco isoenzimas, solamente el incremento de la actividad en valor absoluto de la LDH1 se asoció con la presencia de más de 4 regiones ganglionares.

Respecto a la presencia de enfermedad voluminosa, no se observaron variaciones significativas de LDH total e isoenzimas de LDH expresadas en valores absolutos. El patrón en porcentaje sólo reveló valores de LDH5 significativamente elevados ($p=0.028$) en los pacientes con enfermedad voluminosa mayor de 10 cm., comparados con el grupo de pacientes con enfermedad voluminosa <10 cm. No se obtuvieron variaciones en porcentajes en el patrón de isoenzimas de LDH1, LDH2, LDH3 y LDH4 asociadas a esta condición. Los niveles absolutos de la LDH1 se asociaron significativamente con los pacientes que presentaron compromiso de médula ósea ($p=0.01$) y no se obtuvieron variaciones significativas para LDH total y el resto de las isoenzimas relacionadas con dicha condición. No se observaron variaciones significativas expresadas en porcentajes.

En el grupo de pacientes que cursaron con enfermedad abdominal solo se detectaron valores absolutos significativamente elevados de LDH2 ($p=0.02$) respecto a los pacientes que no presentaron compromiso abdominal. La distribución en porcentaje de la isoenzima LDH5 resultó significativamente superior ($p=0.048$) en el grupo de pacientes con enfermedad abdominal y tampoco incidió sobre el valor de la LDH total. No se detectaron cambios en porcentajes en

las fracciones de LDH1, LDH2, LDH3 y LDH4 asociados a esta condición.

En relación al Índice Pronóstico Internacional (IPI), al comparar los valores entre los grupos de alto y bajo riesgo, observamos que el grupo de alto riesgo se asoció con niveles significativamente superiores de LDH total ($p < 0.0001$) y valores absolutos elevados de LDH4 ($p = 0.02$). No se detectaron variaciones en valor absoluto para LDH1, LDH2, LDH3 y LDH5 relacionadas a los grupos de riesgo. En este caso la significancia de la LDH total está influenciada principalmente por la isoenzima LDH4. La distribución de los valores en porcentajes, reveló para el grupo de alto riesgo valores significativamente superiores en la actividad de LDH1 ($p = 0.039$) y LDH4 ($p = 0.05$) comparado con el grupo de bajo riesgo. No se detectaron variaciones en porcentaje entre ambos grupos referentes a las isoenzimas LDH2, LDH3 y LDH5.

Asociación de los niveles séricos de LDH total e Isoenzimas de LDH de acuerdo a los marcadores biológicos en pacientes con LNH: En la Tabla VI observamos la actividad de la LDH total y del patrón de las isoenzimas de LDH reportado en

valores absolutos y porcentuales, de acuerdo a los niveles de B2M, AST, ALT, F.ALC. y CA-125.

Respecto a la B2M, los niveles elevados de LDH total sérica se asociaron con concentraciones aumentadas de B2M ($p = 0.01$). Se obtuvieron valores absolutos de LDH1 ($p = 0.0001$) y LDH2 ($p = 0.02$) asociados significativamente a esta condición.

No se observaron modificaciones significativas para el perfil de las isoenzimas LDH expresado en porcentaje.

En relación a la enzima AST, tanto la LDH total como la actividad en valores absolutos de las isoenzimas LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 y LDH5 se asociaron significativamente ($p < 0.05$) con niveles elevados de AST. La distribución en porcentajes no reveló variaciones significativas respecto a la actividad de AST.

No se observaron modificaciones en la actividad de LDH total y el perfil de isoenzimas de LDH asociadas a la actividad de las enzimas ALT y F.ALC.

Los niveles de LDH total se relacionaron significativamente con concentraciones elevadas

Tabla III. Niveles séricos de LDH total y perfil de isoenzimas de LDH en pacientes con LNH

Variables	N	(%)	M	Rango	*p
LDHT U/L					
≤ 570	58	(87)	186	(83-556)	
>570	9	(13)	879	(580-1371)	<0.0001
LDH U/L					
≤71.7	42	(63)	43	(4.5-65)	
>71.7	25	(37)	95	(76.9-596)	<0.0001
LDH2 U/L					
≤90.1	38	(57)	55	(24.1-87)	
>90.1	29	(43)	163	(106.9-535)	<0.0001
LDH3 U/L					
≤47.5	35	(52)	29	(16.1-44.1)	
>47.5	32	(48)	87	(47.6-394.2)	<0.0001
LDH4 U/L					
≤19.2	41	(61)	11	(4.2-19.0)	
>19.2	20	(39)	31	(20.5-260.6)	<0.0001
LDH5 U/L					
≤17.2	56	(84)	8.4	(3.9-16.1)	
>17.2	11	(16)	22	(18-86.5)	<0.0001

M: Mediana
p significativa = 0,05
p*: U Mann-Whitney

N: n° de pacientes
LNH: Linfoma No Hodgkin
LDH: Lactato deshidrogenasa

(%): Frecuencia

Tabla IV. Niveles séricos de LDH total e isoenzimas de LDH de acuerdo a las características clínico-patológicas en pacientes con LNH

Variables	N°	LDHT	LDH1	LDH2	LDH3	LDH4	LDH5					
		(M) U/L	(M) U/L %	(M) U/L %	(M) U/L %	(M) U/L %	(M) U/L %					
Edad												
≤60 años	46	202	55.8	24.1	78.9	39.4	46.4	16.4	16.2	6.1	9.6	3.8
>60 años	21	203	44.9	23.4	69.2	39.5	43.1	11.9	12.4	6.9	8.5	4.2
p*		0.41	0.21	0.44	0.62	0.97	0.75	0.15	0.56	0.76	0.27	0.88
Estadio Clínico												
I-II	27	163	41.9	24.9	60.5	37.8	34.7	12.5	13.3	5.7	9.3	3.4
III-IV	40	289.5	64.9	25.1	115.3	41.5	65.4	16.0	17	8	9.1	5.6
p*		0.018	<0.0001	0.76	0.02	0.08	0.15	0.37	0.48	<0.0001	0.99	<0.0001
Estado Funcional Karnofsky												
≥70	61	199	53.5	25.5	77.2	39.9	42.9	13.2	14.1	6.7	9	4.1
<70	6	887.5	116.6	16.9	381.9	36.7	214.6	15.2	43.9	8.5	13.1	2
p*		<0.0001	0.02	0.11	0.01	0.66	<0.0001	0.32	<0.0001	0.87	0.05	0.11
Enfermedad Extraganglionar												
≤1	3	203	53.2	39.4	69.4	13.5	47.6	6.1	16.4	6.1	9.9	4.4
>1	44	206	55.8	35.0	79.8	14.2	43.5	7.5	15.1	7.5	8.8	3.6
p*		0.92	0.76	0.87	0.62	0.67	0.72	0.05	0.29	0.05	0.53	0.57
Síntomas B												
Ausente	38	171	45.9	24.6	67.4	41.7	34.4	16.4	11.4	6.7	8.5	3.4
Presente	29	312.5	65.0	25.5	116.8	38.1	65.9	11.3	20.5	6.7	10.7	4.4
p*		0.01	0.05	0.42	0.02	0.07	0.05	0.08	<0.0001	0.36	0.14	0.10

p significativa = 0,05
LDH: Lactato deshidrogenas

p*: U Mann-Whitney
U/L: Unidades en valor absoluto

LNH: Linfoma No Hodgkin
%: Valor porcentual

M:Mediana

de CA-125 ($p < 0.0001$). El patrón de las cinco isoenzimas de LDH expresado en valores absolutos mostró el mismo comportamiento: LDH1 ($p = 0.01$), LDH2 ($p = 0.01$), LDH3 ($p = 0.05$), LDH4 ($p < 0.0001$), y LDH5 ($p < 0.0001$). El análisis del patrón de isoenzimas expresado en porcentaje no mostró variaciones significativas.

La Tabla VII presenta el comportamiento de la LDH total y las isoenzimas de LDH de acuerdo a los valores de la PCR, IL-6, sRaIL-2, VSG y albúmina sérica.

La actividad de la LDH total se asoció significativamente con niveles elevados de la PCR ($p = 0.014$). Respecto a las isoenzimas de LDH, los valores absolutos elevados de LDH2 ($p = 0.013$) y porcentajes aumentados de LDH3 ($p = 0.0001$) se asociaron significativamente a concentraciones elevadas de PCR.

En relación a la IL-6, los niveles de LDH total se asociaron significativamente ($p = 0.014$) con concentraciones aumentadas de esta citoquina. El patrón de isoenzimas de LDH mostró valores

absolutos de LDH2 asociados significativamente con niveles elevados de IL-6 ($p = 0.014$). No se observaron modificaciones porcentuales significativas del perfil de isoenzimas asociadas a las concentraciones de IL-6.

El patrón de isoenzimas de LDH no mostró modificaciones significativas asociadas a las concentraciones del sRaIL-2.

Respecto a la VSG, solo se obtuvieron porcentajes significativamente elevados de LDH3 ($p < 0.0001$) asociados a valores aumentados de VSG. No se observaron diferencias en el patrón de las isoenzimas de LDH en valores absolutos y tampoco para la actividad de la LDH total relacionadas con los valores de la VSG.

En relación a la albúmina sérica, no se obtuvieron modificaciones de la actividad de la LDH total y del patrón de isoenzimas de LDH expresados en valores absolutos. El patrón de isoenzimas de LDH expresado en porcentajes, reveló valores de LDH3 significativamente aumentados ($p < 0.0001$) relacionados con concentraciones disminuidas de la albúmina sérica.

Tabla V. Niveles séricos de LDH total e isoenzimas de LDH de acuerdo a las características clínico- patológicas en pacientes con LNH

Variables	N°	LDHT		LDH1		LDH2		LDH3		LDH4		LDH5	
		(M)	U/L	(M)	%	(M)	%	(M)	%	(M)	%	(M)	%
N° regiones ganglionares													
0-4	47	200		46	24.6	74	23	44	39	16	11	9.7	7.0
> 4	20	261		65.0	25.5	105	26	49	40	18	19	9.3	6.0
p*		0.19		0.05	0.59	0.12	0.09	0.85	0.12	0.59	0.16	1.0	0.16
Enfermedad Voluminosa													
≤10 cm	23	169		43.8	27.5	57.3	38.9	33.1	13.4	12.7	6.8	9.1	3.5
> 10 cm	44	241		55.8	23.8	96.3	41.7	59.2	15.4	17.6	6.5	9.4	5.5
p*		0.45		0.25	0.1	0.09	0.08	0.21	0.53	0.23	0.98	0.98	0.028
Compromiso Médula ósea													
Ausente	53	192		45.5	23.3	77.2	39.1	44.1	12.5	16	7.0	8.3	4.3
Presente	14	304.5		83.3	26.9	129.7	41.7	53.5	16.6	17.6	5.8	1.0	3.6
p*		0.66		0.01	0.30	0.4	0.70	0.92	0.38	0.11	0.44	0.11	0.47
Enfermedad Abdominal													
Ausente	26	169		43.6	23.3	66.5	37.9	33.8	13.3	13.4	7.1	9.1	3.8
Presente	39	241		56.2	25.5	108.9	40.9	64.2	16.4	17.4	6.3	9.7	5.6
p*		0.66		0.4	0.5	0.02	0.09	0.92	0.29	0.11	0.19	0.11	0.048
IPI													
Bajo Riesgo	60	176		55.5	23.9	67.5	39.3	51.6	14.0	10.7	4.6	9.3	3.9
Alto Riesgo	7	375		46.3	30.9	82.1	45.2	31.6	12.0	16.9	6.7	8.2	4.3
p*		<0.0001		0.9	0.039	0.44	0.29	0.06	0.65	0.02	0.05	0.58	0.63

p significativa = 0,05
LNH: Linfoma No Hodgkin
Alto riesgo: Intermedio alto y alto riesgo.

p*: U Mann-Whitney
M: Mediana

IPI: Índice Pronóstico Internacional
Bajo riesgo: bajo e intermedio bajo

U/L: Unidades en valor absoluto %: Valores porcentuales

Correlación de los niveles séricos de LDH total e Isoenzimas de LDH con las características clínico-patológicas en los pacientes con LNH: En la Tabla VIII observamos una correlación significativa y directa de los niveles séricos de la LDH total ($p=0.012$) y de las isoenzimas LDH1 ($p=0.002$) y LDH2 ($p=0.02$), pero no de las LDH3, LDH4 y LDH5, con la progresión de la enfermedad. Los niveles de la enzima LDH total y de las cinco isoenzimas de LDH correlacionaron significativamente de forma inversa ($p \leq 0.05$) con el estado funcional de los pacientes, correspondiendo a la isoenzima LDH3 el mayor factor de correlación y de mayor significancia ($p=0.002$). En relación al número de regiones ganglionares, el compromiso de médula ósea y la enfermedad abdominal, solo la isoenzima LDH1 mostró correlación directa y significativa ($p=0.01$) con dichas condiciones. La LDH total correlacionó de forma directa y significativa con síntomas B ($p < 0.01$) pero no así las isoenzimas y no se observó correlación alguna con enfermedad voluminosa.

Respecto al IPI, el análisis reveló una correlación significativa entre la actividad de la LDH total ($p=0.04$), LDH2 ($p=0.001$), LDH3 ($p=0.02$) y LDH4 ($p=0.01$) con esta condición, reflejando una influencia desfavorable o negativa sobre el pronóstico de la enfermedad. Las isoenzimas LDH1 y LDH5 no correlacionaron con esta variable.

Correlación de los niveles séricos de LDH total e Isoenzimas de LDH con los marcadores biológicos en pacientes con LNH: El análisis entre los niveles de LDHT y las isoenzimas de LDH con las concentraciones de B2M (Tabla IX) demostró una correlación directa y significativa de los niveles de LDH total ($p=0.0001$), LDH1 ($p=0.0001$), LDH2 ($p < 0.0001$), LDH3 ($p=0.001$), LDH4 ($p=0.002$) y LDH5 ($p=0.005$). Así mismo, observamos una correlación determinante de una influencia directa y significativa de los niveles de LDH total ($p=0.01$), LDH1 ($p=0.0002$), LDH2 ($p=0.002$), LDH3 ($p=0.005$), LDH4 ($p=0.0005$) y LDH5 ($p=0.005$) con la actividad de la AST.

Tabla VI. Niveles séricos de LDH total e isoenzimas de LDH de acuerdo a los marcadores biológicos en pacientes con LNH

Variables	N°	LDHT		LDH1		LDH2		LDH3		LDH4		LDH5	
		(M) U/L	(M) UL	(M) %	(M) U/L	(M) %	(M) U/L	(M) %	(M) U/L	(M) %	(M) U/L	(M) %	
B2M mg/l													
≤3.4	50	180	45.6	25.7	71.5	38.9	40.4	13.0	13.8	5.7	8.3	4.45	
> 3.4	17	376	91.9	24.6	157.9	41.9	70.4	16.5	19.9	6.9	10	3.2	
p*		0.01	>0.0001	0.71	0.02	0.09	0.31	0.39	0.11	0.4	0.11	0.11	
AST U/L													
≤38	59	192	46.7	21.6	71.5	39.5	40.4	13.9	15.1	6.9	9.1	4.1	
>38	8	386	91.9	25.8	157.9	39.44	86.5	14	26.6	6.7	15.1	3.9	
p*		0.01	0.02	0.94	0.02	0.36	0.04	0.94	0.04	0.45	0.03	0.84	
ALT U/L													
≤ 41	59	199	50.1	25.2	75.4	42.3	43.1	12.5	16	5.6	9.2	3.0	
>41	8	249	73.6	24.9	104.1	39.1	66.1	14.4	25.5	6.7	10	4.1	
p*		0.4	0.18	0.48	0.39	0.44	0.65	0.77	0.71	0.30	0.96	0.48	
F. ALC. U/L													
≤290	56	204	50.1	24.6	77.6	39.9	44.3	14.1	16.3	5.8	9.2	4.1	
>290	11	188	68.4	31.9	78.9	39.0	39.4	13.7	14.6	7.0	10.2	3.5	
p*		0.68	0.11	0.053	0.89	0.83	0.76	0.92	0.55	0.052	0.73	0.53	
CA-125 U/ml													
≤35	51	180	45.5	26.2	69.4	39.1	39.6	13.4	13.5	6.4	8.5	3.9	
> 35	16	340	76.4	22.2	143.4	40.1	76.3	16.5	28.4	7.1	15.3	4.2	
p*		<0.0001	0.01	0.09	0.01	0.81	0.05	0.14	<0.0001	0.12	<0.0001	0.80	

P* significativa = 0,05 Prueba de U Mann-Whitney

LNH: Linfoma No Hodgkin

LDH: Lactato Deshidrogenasa

B2M: Beta 2 microglobulina

AST: Aspartado aminotransferasa

ALT: Alanino aminotransferasa

F. Alc.: Fosfatasa alcalina

CA-125: Antígeno Cáncer 125

M: Mediana

En relación al CA-125, la actividad de LDH total correlacionó directa y significativamente ($p=0.05$) con este marcador, así como las isoenzimas LDH1 ($p=0.008$) y LDH5 ($p=0.04$); no se obtuvieron correlaciones significativas con LDH2, LDH3 y LDH4.

El análisis con los niveles de IL-6 reflejó un correlación directa y significativa de los niveles séricos de LDH total ($p=0.017$) y las isoenzimas LDH1 ($p=0.035$), LDH2 ($p=0.027$) y LDH4 ($p=0.049$) con esta variable. Las isoenzimas LDH3 y LDH5 no correlacionaron con IL-6.

No se obtuvieron resultados significativos al correlacionar la actividad de la LDH total y las isoenzimas de LDH con los valores de ALT, F.ALC, PCR, sRαIL-2, VSG y albúmina sérica.

Análisis de componentes principales: Se aplicó el análisis de componentes principales para obtener la representación visual o gráfica del comportamiento simultáneo (correlación multifactorial) de la enzima LDH total e isoenzimas de LDH en los

pacientes con LNH (Figura N° 1). Cada variable está representada por una línea cuya longitud refleja la influencia o importancia de los marcadores en el proceso evaluado (a mayor longitud, mayor influencia). Todas las variables convergen en un punto (la enfermedad), generando ángulos que reflejan la correlación entre ellas (a menor ángulo mayor cercanía, por lo tanto mayor correlación). Observamos que las isoenzimas LDH1, LDH2 y LDH3 son las que presentan mayor cercanía con la LDH total, la isoenzima LDH3 ocupa la posición central y según la gráfica resultó ser la de mayor correlación con la LDHT, mientras que las LDH4 y LDH5 están más correlacionadas o cercas entre si pero mas distantes de LDHT.

Evolución clínica de los pacientes con LNH: Se evaluaron 67 pacientes con un tiempo promedio de seguimiento de 30 meses (rango 3 - 48 meses), de los cuales 27(40%) entraron en remisión completa, 12(19%) y 17(25%) presentaron remisión parcial <50% y >50% respectivamente, registrando una respuesta global (RC+RP) en 56

Tabla VII. Niveles séricos de LDH total e isoenzimas de LDH de acuerdo a los marcadores biológicos en pacientes con LNH

Variables	N°	LDHT		LDH1		LDH2		LDH3		LDH4		LDH5	
		(M)	U/L	(M)	%	(M)	%	(M)	%	(M)	%	(M)	%
PCR mg/l													
≤ 6	37	180	47.1	25.8	68	35.9	39.6	9.0	12.7	6.7	8.5	3.6	
>6	30	269	64.4	23.8	109.6	40.7	66.2	18.9	18.4	6.1	9.7	4.3	
p*		0.014	0.35	0.27	0.013	0.7	0.35	<0.0001	0.28	0.61	0.32	0.26	
IL-6 pg/ml													
≤1.99	23	169	45.4	24.9	67.4	38.5	39.6	9.0	11.4	7.0	9.3	4.6	
>1.99	38	280.5	60.0	23.05	115.3	39.5	69.8	14.3	19.15	6.7	8.8	3.5	
vd	6												
p*		0.014	0.16	0.17	0.014	0.59	0.22	0.26	0.19	0.91	0.70	0.18	
sRαIL-2 pg/ml													
≤2000	18	175.5	51.3	26.6	67.8	39.7	33.2	12.5	13.7	6.9	9.4	3.9	
>2000	24	176	53.2	26.5	77.2	40.4	33.1	16.4	13.5	6.1	8.2	3.9	
vd	24												
p*		0.95	0.70	0.75	0.64	0.94	0.83	0.51	0.89	0.85	0.68	0.74	
VSG mmh													
≤15	8	174	44.6	23.6	70.9	37.8	40.4	7.9	13.7	6.8	9.05	5.1	
>15	29	184	56	27.5	68.4	38.8	34.65	16.0	13.4	6.9	9.85	4.4	
vd	29												
p*		0.71	0.34	0.50	0.96	0.87	0.60	<0.0001	0.85	0.9	0.68	0.80	
ALBÚMINA g/dl													
≥3.4	51	199.5	53.3	25.5	75.5	39.3	43.1	11.0	16	6.4	8.8	4.3	
<3.4	16	312	68.6	25.2	128.3	41.2	55.4	17.5	21.8	7.4	10.58	2.9	
p*		0.97	0.32	0.56	0.41	0.71	0.99	<0.0001	0.71	0.71	0.28	0.24	

p* significativa= 0.05 Prueba de U Mann-Whitney

LNH: Linfoma No Hodgkin

IL-6: Interleuquina 6

VSG: Velocidad de sedimentación globular

LDH: Lactato Deshidrogenasa

PCR: Proteína C Reactiva

sRαIL-2: Receptor α soluble de Interleuquina 2

M: Mediana vd: Valor desconocido.

(84%). La progresión de la enfermedad se registró en 11(16%) de los casos y 24(36%) fallecieron.

Discusión

En el estudio de los LNH se han identificado una variedad de factores clínico-patológicos y biológicos con significancia pronóstica para la caracterización de la enfermedad, la evolución de los pacientes y la respuesta al tratamiento. La importancia de este estudio no solamente consistió en la determinación de las isoenzimas de LDH y una serie de marcadores tumorales en LNH, sino también en la profundización del conocimiento respecto a su relación con la enfermedad y las otras variables pronósticas en la población de pacientes venezolanos.

Se estudiaron 67 pacientes de primera consulta, siguiendo las pautas internacionales establecidas para el abordaje de la enfermedad; se evaluaron

los marcadores pronósticos al momento del diagnóstico, antes de iniciar el tratamiento, que reflejan las características del tumor y su potencial invasivo (LDH, estadio clínico, afectación extranodal, compromiso de médula ósea, N° de regiones ganglionares, enfermedad abdominal, enfermedad voluminosa e histología del tumor), la respuesta del paciente frente al tumor (estado funcional, síntomas B, B2M, enzimas hepáticas, albúmina sérica, CA125, VSG, IL-6, sRαIL-2), así como la capacidad del paciente de tolerar el tratamiento (edad, estado funcional y compromiso de médula ósea). La consideración de los factores pronósticos clínico-patológicos en conjunto con el IPI permitió categorizar a los pacientes en grupos de riesgo para la adecuada selección de las estrategias terapéuticas.

En nuestro trabajo la mayoría de los pacientes presentaron enfermedad avanzada, afectación de

Tabla VIII. Correlación de los niveles séricos de LDH total e isoenzimas de LDH con las características clínico- patológicas en pacientes con LNH

Variables n=67		LDHT U/L	LDH1 U/L	LDH2 U/L	LDH3 U/L	LDH4 U/L	LDH5 U/L
Edad	r	0.06	0.83	0.005	0.03	0.04	0.0008
	p	0.58	0.5	0.96	0.79	0.73	0.99
Estadio Clínico	r	0.30	0.38	0.29	0.17	0.08	0.001
	p	0.012	0.002	0.02	0.15	0.47	0.98
Estado Funcional	r	-0.35	-0.22	-0.32	-0.40	-0.33	-0.23
	p	0.004	0.05	0.013	0.002	0.01	0.05
Enfermedad Extraganglionar	r	0.07	0.05	0.11	0.03	0.06	0.03
	p	0.56	0.7	0.4	0.8	0.6	0.8
Síntomas B	r	0.29	0.02	0.1	0.08	0.11	0.2
	p	0.01	0.1	0.3	0.7	0.3	0.4
Nº regiones ganglionares	r	0.21	0.39	0.21	0.03	0.11	0.07
	p	0.08	0.002	0.08	0.79	0.34	0.55
Enfermedad voluminosa	r	0.19	0.15	0.20	0.15	0.16	0.02
	p	0.10	0.2	0.08	0.20	0.2	0.9
Compromiso Médula Ósea	r	0.2	0.30	0.15	0.02	0.11	0.12
	p	0.17	0.01	0.26	0.86	0.39	0.34
Enfermedad Abdominal	r	0.22	0.32	0.23	0.13	0.18	0.05
	p	0.07	0.013	0.06	0.29	0.31	0.95
IPI	r	-0.36	-0.2	-0.39	-0.38	-0.33	-0.23
	p	0.004	0.09	0.001	0.002	0.01	0.058

p significativa= 0.05

p*: Spearman

r = Coeficiente de Correlación

LNH: Linfoma No Hodgkin

IPI: Índice Pronóstico Internacional

más de un sitio extranodal, carga tumoral > 10cm y enfermedad abdominal, reflejando la extensión del tumor y su potencial invasivo, factores asociados con una disminución de la respuesta al tratamiento y sobrevida (3,4,36). Solo el 30% de los pacientes presentaron más de 4 regiones ganglionares; tanto el número como la localización de las áreas ganglionares afectas reflejan la extensión de la enfermedad. En relación al estado funcional y la presencia de síntomas B como expresión de la respuesta del paciente al tumor, la mayoría de los pacientes no presentaron alteraciones para estas condiciones. La capacidad funcional del paciente es considerada como uno de los factores pronósticos independientes con mayor influencia al valorar la repercusión que la enfermedad produce en el estado general del paciente y está relacionada con

otros parámetros como síntomas B, carga tumoral, otras enfermedades concomitantes y la edad (4). La vinculación de los síntomas B (fiebre, sudoración nocturna y pérdida de peso) al pronóstico ha sido controversial para los diferentes tipos de LNH (5), se ha reportado que pacientes con LNH agresivos con síntomas B, presentan una pobre respuesta a la quimioterapia y sobrevida (4). Las localizaciones extraganglionares específicas involucradas con la enfermedad han sido identificadas como áreas con significancia pronóstica, siendo una de ellas la médula ósea. En los casos de afectación de médula ósea el patrón de infiltración nodular, así como el escaso porcentaje de infiltración, va asociado a un mejor pronóstico para todos los tipos de linfoma (5); en nuestro estudio solo el 21 % de los pacientes presentó infiltración de la MO.

Tabla IX. Correlación de los niveles séricos de LDH total e isoenzimas de LDH con los marcadores biológicos en pacientes con LNH

Variables		LDHT U/L	LDH1 U/L	LDH2 U/L	LDH3 U/L	LDH4 U/L	LDH5 U/L
B2M mg/l n= 67	r p	0.56 <0.0001	0.53 <0.0001	0.51 <0.0001	0.40 0.001	0.45 0.002	0.34 0.005
AST U/L n= 67	r p	0.48 0.001	0.45 0.0002	0.38 0.002	0.34 0.005	0.43 0.0005	0.35 0.005
ALT U/L n= 67	r p	0.15 0.20	0.19 0.11	0.16 0.21	0.16 0.21	0.12 0.32	0.01 0.93
F. ALC. U/L n= 67	r p	0.12 0.30	0.21 0.08	0.05 0.66	-0.18 0.87	-0.002 0.98	0.07 0.53
CA-125 U/ml n= 67	r p	0.24 0.05	0.32 0.008	0.18 0.14	0.07 0.52	0.17 0.15	0.24 0.04
PCR mg/l n= 67	r p	0.13 0.27	0.10 0.4	0.09 0.4	0.05 0.67	0.09 0.45	1.0 1.0
IL-6 pg/ml n= 61	r p	0.30 0.017	0.27 0.035	0.28 0.027	0.23 0.07	0.25 0.049	0.19 0.12
SR α IL-2 pg/ml n= 43	r p	-0.03 0.81	-0.09 0.52	-0.11 0.46	-0.02 0.86	-0.09 0.52	-0.08 0.59
VSG mmh n= 38	r p	-0.01 0.91	0.05 0.75	-0.09 0.56	-0.17 0.29	-0.03 0.82	0.20 0.22
ALBÚMINA g/dl n= 67	r p	-0.17 0.16	-0.16 0.17	-0.16 0.19	-0.08 0.47	-0.12 0.44	-0.09 0.46

p significativa = 0.05

p*: Spearman

r : coeficiente de correlación

AST: Aspartado aminotransferasa

LDH: Lactato deshidrogenasa

F. Alc.: Fosfatasa alcalina

LNH: Linfoma No Hodgkin

PCR: Proteína C Reactiva

B2M: Beta 2 microglobulina

sR α IL-2: Receptor α soluble de Interleuquina 2

ALT: Alanino aminotransferasa

CA-125: Antígeno cancer 125

IL-6: Interleuquina 6

VSG: Velocidad de sedimentación globular

En relación a los modelos pronósticos, el IPI en los últimos años, dado su elevado valor predictivo, ha sido de utilidad en los diferentes tipos de LNH, tanto agresivos como indolentes (3,37) y más recientemente a partir del año 2004, se ha propuesto la aplicación del FLIPI para los linfomas foliculares (38) y el R-IPI para los linfomas agresivos (39). En tal sentido, los pacientes evaluados en el estudio correspondieron al período 1999-2004 y para la categorización en grupos de riesgo se aplicó el IPI para todos los grados de malignidad, así la mayoría (90%) correspondió al grupo de bajo riesgo (riesgo bajo e intermedio bajo) y solo el 10 % de alto riesgo

(intermedio alto y alto riesgo).

Al considerar la distribución de los marcadores biológicos, la mayoría de los pacientes presentó valores de LDH, B2M, AST, ALT, F. ALC., CA125, PCR y albúmina sérica dentro del rango normal de referencia. Solo el 13% de los pacientes cursaron con alteración de la actividad de LDH total, en base al valor cut off establecido como el 100% del valor superior del rango de referencia); este bajo porcentaje pudiera estar influenciado por el tamaño de la muestra. El valor sérico de la LDH es uno de los factores pronósticos individuales que mayor información aporta en los diferentes tipos de LNH, hasta el punto que actualmente

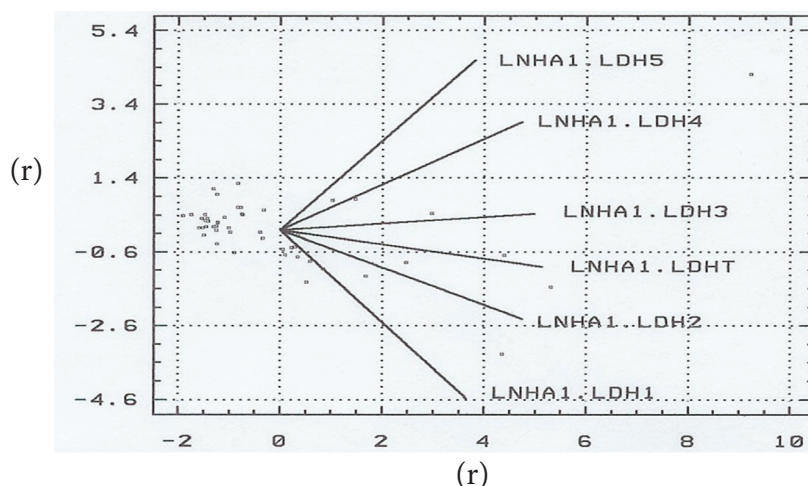


Figura N° 1. Análisis de componentes principales de los niveles de LDHT e isoenzimas de LDH en pacientes con LNH.

(r): coeficiente de correlación N° Pacientes: 67 LNHA1: Base de Datos
LDH: Lactato Deshidrogenasa LNH: Linfoma No Hodgkin

es considerado como dato imprescindible para definir el pronóstico de un paciente. Los marcadores biológicos que presentaron mayor incidencia de valores alterados correspondieron a la IL-6, sRaIL-2 y VSG. Si bien son marcadores que reflejan la actividad de la enfermedad, existieron pacientes con valores desconocidos y esto pudiera influir en los resultados.

Entre los factores pronósticos en LNH, la enzima LDH representa un marcador pronóstico independiente y forma parte del IPI (3). Constituye uno de los sistemas enzimáticos preferencialmente producidos y retenidos por las células cancerosas, siendo necesario para mantener el crecimiento y la proliferación del tumor (23,40, 41). Cuando las isoenzimas de LDH son liberadas por el tejido neoplásico al torrente circulatorio, se producen cambios en el patrón sérico de las mismas, así pudimos observar un incremento en los valores absolutos de la actividad de todas las isoenzimas y de la LDH total en los pacientes respecto al grupo control, con cambios en la distribución en porcentaje, que reflejaron disminución de LDH1, aumentos de LDH2, LDH3 y LDH5, pero no modificaciones de LDH4 (Tabla II). Ricerca y col. (20) obtuvieron resultados similares en el patrón de las isoenzimas en LNH, respecto al incremento de los valores absolutos, así como la disminución del porcentaje de LDH1 y el aumento de LDH3, sin embargo registraron porcentajes aumentados de LDH4 y no detectaron cambios en LDH2 y LDH5. La disminución de la LDH1 de los pacientes respecto a los controles, pareciera ser un patrón

que se repite, sugiriendo una tendencia hacia las isoformas LDH4 y LDH5 asociadas a los tejidos con alta producción de ácido láctico o sea con metabolismo anaeróbico. Ferraris y col. (42) no observaron cambios en el patrón de las isoenzimas de LDH en pacientes con LNH, no obstante Batsakis y col. (43) reportaron LDH3 aumentada. Por su parte Rottenberg y col. (19) describieron tres casos en los cuales el aumento de los niveles de la LDH total se acompañó del predominio de las isoenzimas 2 y 3, siendo el único y más temprano signo de linfoma maligno oculto.

Más recientemente, Dumontet y col. (21) reportaron en pacientes con LNH, porcentajes elevados de la isoenzima 2 en pacientes con LDH total elevada respecto a los controles y al grupo de pacientes con valores normales de LDH. Otros autores (22) registraron incrementos en el porcentaje de LDH2 en los pacientes con LNH, pero no en otras patologías como Linfoma de Hodgkin (LH) y mieloma múltiple, cuando se compararon con los valores normales. Según Paule y col. (18) la disminución de LDH1 y el incremento de LDH2 pareciera ser un marcador bioquímico de la evolución del proceso tumoral y de la diferenciación celular.

En el presente trabajo, los resultados del patrón de isoenzimas de LDH se expresaron en valores absolutos y porcentuales. El análisis en valor absoluto permite estudiar a la variable en su valor real, facilitando la comparación de la actividad enzimática con otros estudios, mientras que el nivel en porcentaje expresa valores relativos,

generando resultados e interpretaciones diferentes al compararlo con el del valor absoluto. El resultado en porcentaje nos orientaría acerca de la distribución de las fracciones de LDH y sobre la dirección o tendencia metabólica del tejido afectado. Otros factores influyentes a considerar comprenden la heterogeneidad biológica de la población estudiada y las diferentes metodologías empleadas en la determinación del marcador biológico, así como los rangos de referencia, cuando se comparan diferentes estudios.

Al analizar la frecuencia de las isoenzimas de LDH en los pacientes con LNH en base a los valores establecidos para la población venezolana, observamos que de las cinco isoenzimas, la LDH3 presentó la mayor incidencia de niveles elevados, tanto en valor absoluto como porcentual, seguido de la LDH2. Estos resultados coinciden con los reportes de otros autores sobre la incidencia del incremento de la isoenzima 3 en pacientes con mieloma múltiple y leucemia granulocítica crónica (44,45), así como la frecuencia incrementada del porcentaje de LDH2 en pacientes con LNH, leucemia linfocítica crónica y síndromes linfoproliferativos (22-23). Las isoenzimas 2 y 3 están presentes en los órganos linfoides (14), siendo la LDH3 la isoenzima más abundante en el tejido linfocítico normal (13) con altos porcentajes en células B, T y timocitos (46-47).

En las enfermedades linfoproliferativas los niveles elevados de la LDH total sérica reflejan un incremento en el metabolismo o recambio celular asociado con la expansión y actividad proliferativa del tumor. Battle y col.(48) reportaron niveles elevados de LDH asociados con el estadio clínico (III-IV), el estado funcional alterado y enfermedad voluminosa, en un grupo de 240 pacientes con LNH. Otros autores (20) observaron la relación de la actividad incrementada de la LDH total con los estadios clínicos avanzados, la presencia de síntomas generales y linfomas de alto grado de malignidad. En el presente trabajo observamos los niveles de LDH asociados con la progresión de la enfermedad (estadio clínico III-IV), alteración del estado funcional, presencia de síntomas B e IPI de alto riesgo (Tablas IV y V) evidenciando su importancia internacionalmente establecida (4,7,8). Nuestros resultados coincidieron con los de Ricerca y col.(20), quienes reportaron cambios en la actividad de la LDH influenciada por la progresión de la enfermedad y la presencia de síntomas B.

La información sobre el comportamiento de las isoenzimas de LDH respecto a los factores pronósticos es escasa, por lo cual profundizamos en este análisis. Así, observamos valores

incrementados de LDH1 en los pacientes con enfermedad avanzada, estado funcional alterado, presencia de síntomas B, afectación de médula ósea, N° de regiones ganglionares y el porcentaje elevado de la isoenzima asociado con un IPI de alto riesgo. El estudio de Ricerca y col. (20) también reportó cambios en la distribución de LDH1 influenciados por la progresión de la enfermedad. Otros investigadores (21,22) determinaron una mayor frecuencia de porcentajes elevados de la isoenzima 2 en pacientes con alteración de su estado funcional y valores absolutos elevados de LDH3 más frecuentemente asociados con pacientes que presentaron afectación del estado general, enfermedad avanzada y linfoma de tipo agresivo. Al igual que dichos autores, obtuvimos una relación entre los valores absolutos de LDH2 y el estado funcional anormal y además con la presencia de síntomas B, es decir con la respuesta del paciente frente al tumor, con la progresión, diseminación de la enfermedad y su potencial invasivo. Nuestros hallazgos respecto a la asociación de la LDH3 con el estado funcional coincidieron con los de otros autores (21,22), pero adicionalmente encontramos una relación significativa con los síntomas B y la afectación extranodal. Es importante señalar que estos autores compararon las frecuencias de los valores absolutos o porcentajes elevados, mientras que en nuestro caso comparamos la actividad de las isoenzimas expresada bien sea tanto en valor absoluto como en porcentaje. Por su parte Ricerca y col.(20), no obtuvieron resultados significativos para LDH2 en relación al estadio clínico, síntomas generales e histología del tumor, mientras que la actividad de LDH3 en porcentaje se asoció con el estadio clínico, síntomas B e histología de alto grado de malignidad, al comparar los valores con el grupo normal. Este hallazgo sugiere que la LDH3 pareciera ser un marcador de la presencia de enfermedad al presentar un comportamiento independiente de los factores clínicos patológicos, por lo que siendo la LDH3 la isoenzima más abundante en los tejidos linfocíticos, es posible que sus valores incrementados reflejen el tamaño de la masa tumoral en los pacientes con LNH. En lo que concierne a la isoenzima LDH4, en nuestra casuística, sus valores absolutos se vieron influenciados por el estado funcional y los síntomas B y su distribución en porcentaje se alteró con la progresión de la enfermedad y la afectación extraganglionar, coincidiendo con lo reportado por Ricerca y col. (20), además resultó ser la única isoenzima cuyos valores absolutos y porcentaje se asociaron con un IPI de alto riesgo. Cuando evaluamos a la LDH5, observamos sus valores absolutos influenciados por el estado funcional

del paciente y su distribución en porcentaje influenciada por los factores pronósticos asociados con el potencial invasivo del tumor (estadio clínico avanzado, enfermedad voluminosa y compromiso abdominal), sin encontrar reportes de otros autores al respecto. Los resultados en porcentaje nos reflejarían la tendencia o la expresión de los cambios en los tejidos sobre la dirección metabólica, estando la expresión de LDH5 más en relación con la producción de lactato en el tejido u órgano involucrado.

El análisis del contenido de las isoenzimas en las muestras de tumor nos podría orientar acerca del origen o incremento de las mismas a nivel sérico. Estudios *in vitro* han revelado que la actividad intracelular de los isotipos de LDH (H y M) muestran diferentes expresiones en los linfocitos B y T, en estado de reposo y de activación, siendo su patrón de expresión un mejor marcador de activación celular que del fenotipo (24, 25,49). Además de la utilidad de la determinación de la LDH total sérica, las características intracelulares de la misma y del perfil isotípico, son indicadores sensibles del estado metabólico (50), de la dirección aeróbica o anaeróbica de la glicólisis (14), del estado de activación (41), transformación maligna (51,52), así como del daño de la membrana celular (53). Los cambios en la actividad celular de la LDH y del isotipo (H, M) se han asociado con la inducción de apoptosis y la alteración de la membrana celular en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con linfoma. La tasa de apoptosis y consecuentemente la liberación de la LDH a través de la membrana de las CMSP, depende de la masa tumoral, la agresividad del tumor y de los estadios avanzados de la enfermedad. La actividad intracelular de la LDH y del isotipo M en las CMSP y la actividad de la LDH liberada espontáneamente, se vieron significativamente incrementadas en LNH con estados avanzados y alto grado de malignidad, contrario a lo observado en los pacientes con LH, quienes mostraron elevaciones en todos los parámetros (27). En los pacientes con LNH la actividad intracelular de los isotipos LDH H y LDH M de las CMSP ultrasonificadas, fue significativamente elevada antes de comenzar la terapia y su actividad fue mayor en los estadios avanzados de la enfermedad en comparación con los estadios tempranos (30). Así en nuestro trabajo, pudimos observar que la actividad sérica de la LDH total y las isoenzimas 1, 2, 3, 4 y 5 mostraron la misma tendencia.

Por su parte Pan y col. (24,25) demostraron una correlación significativa entre la expresión de los isotipos de la LDH y la actividad proliferativa de las

células linfoides humanas normales y poblaciones de células humanas neoplásicas, mediante la inmunotinción con anticuerpos monoclonales anti H de LDH (LDH 1,2) y anti M de LDH (LDH 4,5), reaccionando ambos anticuerpos débilmente con LDH3.

Tomando en cuenta estas consideraciones, cuando evaluamos la asociación del patrón de isoenzimas de LDH con el estadio clínico, podríamos interpretar por una parte que la actividad elevada en valores absolutos de la isoenzimas LDH1(H4) y LDH2(H3M) serían reflejo de la actividad proliferativa del tumor y, por otra, las proporciones (%) aumentadas de LDH4 (HM3) y LDH5 (M4), indicativos del metabolismo anaeróbico de las células tumorales, lo cual ha sido reportado en la mayoría de los tumores(14). La actividad incrementada de la LDH2 en el grupo de pacientes con enfermedad abdominal sería expresión del alto recambio celular (15). Igualmente, la proporción elevada de LDH5, asociada con la enfermedad voluminosa (carga tumoral) y el compromiso abdominal, nos reflejaría la relación con el metabolismo anaeróbico del tumor y su potencial invasivo, además de ser un marcador sensible del daño hepático (14). Recientemente Koukourakis y col.(49) reportaron la sobreexpresión de LDH5 en muestras de tejido de cáncer de pulmón de células pequeñas, asociada con la hipoxia del tumor y niveles elevados de LDH total sérica. Otros autores (54,55) mediante el análisis inmunohistoquímico evaluaron la expresión citoplasmática y nuclear de la isoenzima LDH5 en LNH difuso de células grandes B y linfoma folicular, detectando una alta expresión de LDH5 en ambos tipos de linfomas y ninguna en linfocitos no neoplásicos. La expresión de LDH5 se asoció significativamente con las proteínas reguladoras de la hipoxia celular, conocidas como los factores inductores de hipoxia (HIF) 1 alfa y 2 alfa. También observaron una amplia expresión del receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular fosforilado (VEGF2/KDR) y su correlación con la activación de los factores HIF y su participación en la activación de la angiogénesis. En nuestro caso, observamos el significativo incremento de los valores absolutos de la LDH1 relacionados con la afectación de médula ósea y el número de regiones ganglionares como expresión de la extensión del tumor, esto podría ser reflejo de la respuesta proliferativa o recambio celular (15), aunque no se afecte el valor de la LDH total.

Los estudios *in vitro* de Jurisik V y col.(30) señalaron una actividad de LDH-H intracelular en CMSP de pacientes con LNH previo a la administración del tratamiento, no obstante,

la misma disminuyó después que las CMSP fueron tratadas con factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), mostrando un efecto contrario al comparar con las CMSP de controles sanos. La actividad del isotipo LDH-M intracelular de las CMSP de pacientes con LNH, previo al tratamiento con quimioterapia, se mantuvo elevada y sus valores no variaron post-tratamiento. La actividad intracelular de los isotipos de LDH y su relación, constituyen marcadores importantes de fenómenos biológicos intracelulares seguidos del efecto del TNF α . La actividad de la LDH-H estaría más relacionada con la proliferación celular que con la especificidad del algún tipo de malignidad. Según otras investigaciones, los cambios en la actividad de la LDH-H en controles sanos y pacientes con linfoma, antes y después de la quimioterapia, pudieran depender de características intracelulares previas de las CMSP, sugiriendo el papel de la expresión del receptor del TNF α o la activación de señales intracelulares (28).

Cuando relacionamos la actividad tanto de la LDH total como de las cinco isoenzimas (valores absolutos) con el estado funcional, se asociaron con un estado general alterado, reflejando la repercusión que la enfermedad produce en el paciente, sin producir cambios significativos en la distribución (%) del patrón isoenzimático, es decir hay una afectación general del paciente y de la actividad enzimática sin discriminar órganos o tejidos. Por otra parte es conocido que la LDH es un marcador inespecífico y también es producido por el tejido circundante al tumor. Al evaluar los cambios respecto a los síntomas B, se observaron alteraciones de todas las isoenzimas menos en la actividad de la LDH5.

Respecto a la enfermedad extraganglionar, observamos modificaciones porcentuales en el patrón de LDH3 y LDH4, aún cuando no incidió sobre la actividad total de LDH (Tabla IV). Por una parte, este factor pronóstico nos refleja la carga tumoral y por otra, la LDH3 es fisiológicamente la más abundante en los tejidos linfoides; así mismo, junto con la LDH4, parecen ser las isoformas más abundantes en las células hematopoyéticas en maduración (15) y predominantes en la mayoría de los tejidos malignos (10,13).

Nuestros hallazgos indicaron que los pacientes con niveles elevados de LDH total se asociaron con un IPI de alto riesgo, ejerciendo una mayor influencia sobre la proporción de la LDH1 como expresión de recambio celular y la actividad incrementada de LDH4, tanto en valores absolutos como en porcentaje. En tal sentido, las variaciones de LDH1 y LDH4 podrían deberse al proceso de diferenciación celular, además del comportamiento

del tumor, indicando la actividad proliferativa del tumor, el predominio del metabolismo anaeróbico y su asociación con tejidos malignos (47,50).

Cuando se correlacionaron los niveles de la LDH total con las características clínico-patológicas, observamos, que su actividad aumentó significativamente con los factores adversos indicativos de la progresión de la enfermedad, además con la afectación del estado general del paciente y la presencia de síntomas, influyendo significativamente de forma negativa sobre el pronóstico de la enfermedad (Tabla VIII). Estos resultados soportan la importancia de la LDH total como marcador tumoral a pesar de ser inespecífico (9,10). La evaluación de las isoenzimas (Tabla VIII) reveló que un incremento de la actividad enzimática de LDH1 se correlacionó con una mayor actividad proliferativa del tumor, es decir con la progresión de la enfermedad, así como con la extensión de la misma (N° de regiones ganglionares y compromiso de médula ósea) y el potencial invasivo del tumor, mientras que la actividad de la isoenzima 2 solo se vió influenciada directamente por el estadio clínico. El incremento de la actividad de las cinco isoenzimas cursó con un significativo deterioro de la capacidad funcional del paciente y de la respuesta frente al tumor. El IPI empeoró significativamente en la medida que la actividad enzimática de las isoenzimas 2, 3 y 4 incrementó, siendo interesante comentar que en la literatura se menciona que en los nódulos linfáticos con lesiones malignas se presentan mayores concentraciones de LDH2, LDH3 y LDH4 que de LDH5 (10).

En la literatura encontramos reportes sobre el patrón LDH1>LDH2 (inversión de la relación LDH1/LDH2) en tumores de ovario y de células germinales, así como de niveles séricos elevados de LDH1 en cáncer testicular avanzado. Se ha sugerido que el fenómeno del cambio de relación LDH1/LDH2 se relaciona con cambios megaloblásticos en la médula ósea o por cardiocitotoxicidad por agentes citolíticos. El patrón de la relación invertida LDH1>LDH2, la cual es ampliamente utilizada en la enfermedad miocárdica, también puede ser vista en pacientes con cáncer. Las isoenzimas LDH1, LDH2 y LDH3 pudieran ser marcadores importantes de discrasias hematológicas y otras malignidades, explicando de esta manera nuestra observación en el análisis de componentes principales (Figura N° 1), de que estas tres isoenzimas tuvieron mayor correlación con la LDH total en el proceso estudiado.

La importancia clínica de los marcadores biológicos serológicos en LNH está basada en la información que complementa al diagnóstico

morfológico, así como su papel en la estadificación, pronóstico y monitoreo de la enfermedad.

En las enfermedades linfoproliferativas los niveles de la LDH constituyen un marcador de recambio celular y se correlacionan con la proliferación y expansión celular; sin embargo en relación a las isoenzimas de LDH existe poca información respecto a su asociación y correlación con los marcadores biológicos serológicos en LNH. Dumontet y col. (21) reportaron valores séricos elevados del TNF α y su receptor p75 asociados a altos porcentajes de LDH2 en pacientes con LNH, considerando la influencia que este marcador pudiera ejercer sobre las alteraciones del perfil de isoenzimas de LDH en estos pacientes.

En nuestro trabajo pudimos observar que los niveles elevados de la LDH total influenciados por la actividad de LDH1 y LDH2, reflejaron el comportamiento del tumor y su potencial invasivo al asociarse con una elevada síntesis de la B2M, la cual es expresión del aumento de la tasa de activación y proliferación tumoral.

Nuestros datos indican que la actividad aumentada de la LDH total y las cinco isoenzimas cursaron con un incremento de los niveles de la B2M y AST, reflejando una correlación directa entre la actividad enzimática, la proliferación celular y el compromiso hepático (Tabla IX). También observamos la asociación de todas las isoenzimas con los niveles de la AST y del CA125, lo cual nos sugiere una relación con la afectación hepática y el potencial invasivo del tumor respectivamente, estando en concordancia con otros autores sobre la significativa relación entre la LDH y el CA125 (48,56-60). Es interesante señalar que la información biológica que nos provee el CA125 es diferente a la que aportan los marcadores LDH y B2M, los cuales son liberados por las células linfomatosas, reflejando una medida de la carga tumoral y actividad proliferativa del tumor, mientras que el CA125 es indicativo de la respuesta del paciente frente al potencial invasivo del tumor, aportando una idea acerca de su actividad infiltrante. Nuestros resultados sugieren una correlación directa y significativa entre la LDH total y el antígeno CA125, coincidiendo con el trabajo de Bairey y col. (56), no obstante contrastan con los de otros investigadores (48,60). Cuando evaluamos las isoenzimas, obtuvimos una correlación significativa con las isoenzimas LDH1 y LDH5, lo cual correspondería con la actividad proliferativa de los isotipos H y M respectivamente. Nuestros resultados reflejaron el comportamiento biológico de los pacientes con LNH respecto a la actividad de la LDH total, sus isoenzimas y los marcadores inflamatorios. Así observamos la

asociación de los niveles elevados de la LDH con los valores anormales de la PCR e IL-6, coincidiendo con los trabajos de otros autores (33,61-63), no obstante en la literatura encontramos referencias controversiales para la relación entre la LDH total y la IL-6 (64,65).

Al considerar el perfil de las isoenzimas en nuestros pacientes, los niveles elevados de la LDH2 sérica se asociaron con concentraciones alteradas de la IL-6 y PCR. Se obtuvieron porcentajes incrementados de la isoenzima LDH3 relacionados con los pacientes que presentaron valores alterados de la PCR, VSG, y albúmina sérica, por lo cual es posible que las modificaciones de las isoenzimas observadas en los pacientes estudiados, pueda deberse entre otros factores a la producción de las citoquinas inflamatorias, además de que la LDH2 y LDH3 son las más abundantes en las células linfoides (14). La correlación significativa entre la actividad de la LDH Total y las isoenzimas 1,2 y 4 con la IL-6 reflejan la correlación entre la actividad proliferativa del tumor y el proceso inflamatorio.

Algunos autores han señalado que los niveles elevados de la PCR representan un marcador pronóstico sencillo que refleja directamente la actividad de la IL-6 en pacientes con LNH (34,63). Los niveles disminuidos de la albúmina sérica, la presencia de síntomas B, niveles elevados de la VSG y la anemia en pacientes con linfomas agresivos, pudieran explicarse como efectos de la liberación de las citoquinas a la circulación (41). Las isoenzimas de LDH pudieran ser marcadores importantes en discrasias hematológicas y otras malignidades, no obstante, la interpretación de sus valores debe hacerse con el entendimiento de que están presentes en otras células como leucocitos, plaquetas y reticulocitos, pudiendo observar que algunas isoenzimas son indicadores de alteraciones celulares y metabólicas, mientras que otras están asociadas al pronóstico de la enfermedad (66).

Es importante mencionar las variables y limitaciones que pudieran influir en la evaluación de los marcadores tumorales en los pacientes con LNH. En relación a los pacientes evaluados, el perfil de los pacientes seleccionados representa una diferencia metodológica por lo que se requiere precisar si el estudio se realiza en el grupo total de los pacientes o de acuerdo a las categorías pronósticas. Un importante aspecto que influye en la comparación de los resultados se refiere a la heterogeneidad histológica de los subtipos, lo cual dificultaría la comparación debido a los recientes cambios en la clasificación de LNH. Desde el punto de vista metodológico, el método utilizado, la variabilidad de los rangos para establecer el

criterio de anormalidad o cut-off, así como el análisis estadístico aplicado, son determinantes en la reproducibilidad de los resultados. Nosotros establecimos los rangos de referencia para las isoenzimas de LDH en la población venezolana y este hecho constituye otro de los aportes de esta investigación.

En el presente estudio profundizamos sobre el comportamiento de las isoenzimas de LDH en pacientes con LNH, al momento del diagnóstico, antes de recibir el tratamiento, siendo importante complementar los estudios a nivel molecular, celular y serológico, para ampliar el panorama de acción de las isoenzimas, tanto en LNH como en otras malignidades.

La asociación y correlación de la actividad de la LDH1 con los factores clínico-patológicos adversos, IPI de alto riesgo y marcadores biológicos alterados, reflejan su compromiso con la progresión de la enfermedad, actividad proliferativa del tumor, recambio celular y la actividad de la enfermedad, así como la afectación del paciente y su respuesta frente al tumor. Los cambios en el patrón de la isoenzima LDH2 reflejaron su asociación con los factores clínico-patológicos y biológicos como expresión de la progresión y diseminación de la enfermedad, actividad proliferativa del tumor, respuesta del paciente frente a la enfermedad y actividad inflamatoria. Su actividad correlacionó con la progresión de la enfermedad, alteración del estado funcional y un IPI adverso. La isoenzima de mayor frecuencia con niveles elevados fue la LDH3 y su actividad se asoció con los factores pronósticos clínico-patológicos y biológicos adversos que reflejan la respuesta del paciente frente al tumor, la actividad inflamatoria y la propensión a la extensión de la enfermedad. Su correlación con el deterioro del estado general del paciente, el IPI de alto riesgo y los marcadores biológicos alterados, sugiere ser un indicador de la actividad proliferativa del tumor y la afectación del paciente. Los niveles incrementados de la isoenzima LDH4 y su patrón de distribución, se asociaron con la respuesta del paciente frente al tumor, IPI de alto riesgo, progresión y diseminación de la enfermedad y con marcadores biológicos que reflejan actividad hepática y el potencial invasivo del tumor. Su actividad correlacionó con los marcadores biológicos de la respuesta inflamatoria, actividad proliferativa del tumor y metabolismo hepático, expresándose como un marcador de actividad celular y del metabolismo anaeróbico. La alteración de los niveles de la LDH5 reflejó su relación y asociación con el deterioro del estado general del paciente y su respuesta frente a la enfermedad, la actividad

proliferativa y el potencial invasivo del tumor. Los cambios en la distribución del patrón de la LDH5 sugieren la tendencia a su localización en los tejidos tumorales con actividad metabólica anaeróbica.

Conclusiones

Si bien la LDH se determina de rutina en los pacientes con malignidades hematológicas, existe poca información relacionada con el contenido de las isoenzimas, sus alteraciones y la significancia pronóstica.

En el presente estudio observamos alteraciones específicas en el perfil sérico de las isoenzimas de LDH, asociadas y correlacionadas con las características clínico-patológicas y la biología del tumor en los pacientes con LNH. La interpretación de los resultados en valores porcentuales o absolutos tiene sus implicaciones; los valores en porcentaje serían el reflejo del desplazamiento o la tendencia de la dirección metabólica, mientras que en valores absolutos obtenemos el valor real de la actividad enzimática, lo cual es importante para la comparación de la actividad enzimática con otros estudios reportados.

En base a los resultados del presente trabajo es recomendable profundizar el estudio de las isoenzimas de LDH, a nivel molecular, celular y serológico, tanto en LNH como en otras malignidades hematológicas, en poblaciones de mayor tamaño así como evaluar el patrón de isoenzimas de LDH considerando los diferentes subtipos de LNH, dada la heterogeneidad biológica de la enfermedad.

Agradecimientos

Al Profesor Leovigildo Garcia (UCV) por la asesoría estadística.

A la Fundación Badan por la colaboración en el financiamiento del estudio estadístico. Al Grupo Evo-Lab, C.A. por la donación de los reactivos para las Isoenzimas de LDH.

Referencias

1. Fisher RI, Mauch PM, Harris NL, Friedberg JW. Non-Hodgkin Lymphomas. En: Cancer Principles & Practice of Oncology. Vicent De Vita Jr, Samuel Hellman, Steve A Rosemberg. 7th Edition. Lippincott: Williams & Wilkins 2005, capítulo 41-2; 1957-97.
2. Hennessy BT, Hanrahan EO, Daly PA. Non-Hodgkin Lymphoma: An update. The Lancet Oncol. 2004; 5: 341-53.

3. Shipp MA, Harrington DP, Anderson JR, Armitage JO, Bonadonna G, Brittinger G, et al. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non Hodgkin's lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J. Med.* 1993; 329:987-94.
4. Nicolaidis C, Dimou S, Pavlidis N. Prognostic factors in aggressive Non-hodgkin's Lymphomas. *The Oncologist.* 1998 ; 3 : 189-97.
5. Rabasa MP. Factores pronósticos en los linfomas: Linfomas no Hodgkin y linfoma de Hodgkin. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 2001; 24 (suplemento 1) : 141-58.
6. Moore DF, Cabanillas F. Overview of prognostic factors in Non-Hodgkin's lymphoma. *Oncology* 1998; 12 (10 suppl 8): 17-24.
7. Morra E. The biological markers of Non-Hodgkin's Lymphomas: Their role in diagnosis, prognostic assessment and therapeutic strategy. *Int J Biol Markers* 1999; 14 (3): 149-53.
8. Montserrat E. Prognostic factors in aggressive lymphoma. The contribution of novel markers. *Ann Hematol.* 2001; 80: B42 - B44.
9. Huijgen HJ, Sanders GT, Koster RW, Veeken J, Bossuyi P. The clinical value of lactate dehydrogenase in serum: A quantitative review, *Eur J Clin Chem. Clin Biochem.* 1997; 35 (8): 569-79.
10. Schwartz M. Lactic dehydrogenase. An old enzyme reborn as a cancer marker? *Am J Clin Pathol.* 1991; 96 (4): 441- 43.
11. Dawson DM, Goodfriend ThL, Kaplan N. Lactic dehydrogenases: function of the two types. *Science.* 1964;43:929-33.
12. Adams MJ, Buehner M, Chandra SK, Ford GC, Hackert ML, Liljas A, et al. Structure-function relationships in lactate dehydrogenase. *Proc Nat Acad Sci.* 1973;1968-72.
13. Henderson AR. Isoenzymes of lactate dehydrogenase. En: *Methods of enzymatic analysis. Enzymes 1: Oxidoreductases, transferases.* Bergmeyer; H.V, 3er Ed. Weinhein, Deerfield Beach, Florida, Basel Verlagdreinie. 1984; Vol III.
14. Sun Tsieh. Lactate dehydrogenase bioenzymes. En: Sun Tsieh Editor. *Interpretation of protein and bioenzymes patterns in body fluids.* USA. Igashun Shoin Medical Publishers, Inc; 1991 p.197-215.
15. Alibert G, Pulignano I, Proietta M, Corvisieri P, De Michelle LV. Lactate dehydrogenase and its isoenzymes in the marrow and peripheral blood from haematologically normal subjects. *Physiol Res.* 1997; 46:435-38.
16. Coiffier B, Gisselbrecht C, Vose JM. Prognostic factors in aggressive malignant lymphomas. Description and validation of a prognostic index that could identify patients requiring a more intensive therapy. *J Clin Oncol.* 1991;9:211-19.
17. Dimopoulos MA, Barlogie B, Smith TL, Alexanian R. High serum lactate dehydrogenase level as a marker for drug resistance and short survival in multiple myeloma. *Ann Intern Med.* 1991;115: 931-35.
18. Paule B, Frnacoual J, Lindenbaum C, Derrieux C, Russo C, Gerbet D, et al. Lactate dehydrogenase isoenzyme activity in malignant haematological diseases. *Biomed Pharmacother.* 1984;38:62-65.
19. Rotenberg Z, Weinberger I, Fuchs Y, Erdberg A, Davidson E, Agmon J. Elevation of serum lactic dehydrogenase levels as an early marker of occult malignant lymphoma. *Cancer* 1984;54:1379-81.
20. Ricerca BM, Storti S, Compisi S, Pagano F, Dalla Torre R, Marra A, et al. Serum lactate dehydrogenase Isoenzymes pattern in non Hodgkin's lymphoma. *Int J Biol Markers* 1988; 3 (4): 237-42.
21. Dumontet C, Draï J, Bienvenu J, Berard EN, Thieblemont C, Bouafia F et al. Profiles and prognostic values of LDH Isoenzymes in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 1999;13 (65):811-17.
22. Bouafia F, Draï J, Bienvenu J, Thieblemont C, Espinouse D, Salles G, et al. Profiles and prognostic values of serum LDH Isoenzymes in patients with haematopoietic malignancies. *Bull cancer* 2004; 91 (7-8): E229-40.
23. Coiffier B, Bastion Y, Berger F, Felma p, Bryon PA. Prognostic factors in follicular lymphoma. *Sem Oncol.* 1993; 20: 89-95.
24. Pan L, Xu J, Isaacson PG. Cellular H and M type lactate dehydrogenase (LDH) isoenzymes and tumour diagnosis - an immunohistochemical assessment. *Journal of Pathol.* 1991; 163:53-60.
25. Pan L, Beverley PC, Isaacson PG. Lactate dehydrogenase (LDH) isoenzymes and proliferative activity of lymphoid cells on immunocytochemical study. *Clin Exp Immunol.* 1991;86:240-45.
26. Reisser T, Langgut W, Kersten H. The nutrient factor queuine protects HeLa cells from hypoxic stress and improves metabolic adaptation to oxygen availability. *Eur J. Biochem.* 1994;221: 979-86.
27. Jurisic V, Konjevic G, Banicevic B, Djuricic B, Spuzic I. Different alterations in lactate dehydrogenase activity and profile of peripheral blood mononuclear cells in Hodgkin's and Non Hodgkin's lymphomas. *Eur J Haematol.* 2000;64:259-66.
28. Jurisic V. Estimation of cell membrane alteration after drug treatment by LDH release. *Blood* 2003;101(7):2894
29. Jurisic V, Janci'c-Nedeljkovic R, Strenovi'c M, Banicevi'c B, Colovic M, et al. The comparison of spontaneous LDH release activity from cultures CMSP with sera LDH activity in Non Hodgkin's lymphoma patients. *Med Oncol.* 2004; 21(2): 179-85.
30. Jurisic V, Bumbasirevic V, Konjevic G, Djuricic B, Spuzic I. TNF- α induced changes in LDH isotype profile

- following triggering of apoptosis in CMSP of Non Hodgkin's lymphoma. *Ann Haematol* 2004;3:89-91.
31. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller HK, Vardiman J, et al. World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting. *J Clin Oncol*. 1999;17: 3835-49.
 32. Feldman AL, Pittaluga S, Jaffe ES. Clasificación and Histopatología de los linfomas. En: Canellos GP, Lister TA, Young B, editors. *The Lymphomas*. Second Edition. Saunders Elsevier; 2006. p. 2-38.
 33. Schag CC, Heinrich RL, Ganz PA. Karnofsky performance status revisited: Reliability, validity and guidelines. *J Clin Oncol*. :1984;2:187-193.
 34. Zabner-Oziel P, Galizia C, Somoza R, Wallis V, Desenne J, Gonzalez M, et al. Valor pronóstico de los niveles séricos de la IL-6 en linfoma No Hodgkin. *Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec*. 2006,9(1):11-21.
 35. Galizia C, Zabner-Oziel P, Somoza R, Wallis V, Desenne J, González M, et al. Valor pronóstico de los niveles séricos del Receptor α soluble de Interleuquina-2 en pacientes con linfoma No Hodgkin. *Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec*. 2007, 10(1):39-46.
 36. Hasselblom S, Ridell B, Nilsson-Ehle H, Anderson PO. The impact of gender, age and patient selection on prognosis and outcome in diffuse large B- cell lymphoma- a population-based study. *Leuk Lymphoma* 2007; 48(49): 736-45.
 37. Hermans J, Krol ADG, Groningen K, Kluin PhM, Kluin-Nelemans JC, Kramer MH, et al. International Prognostic Index for aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma is valid for all malignancy grades. *Blood*. 1995; 88 (4): 1460-63.
 38. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Saez R, et al. Follicular Lymphoma International Prognostic Index. *Blood*. 2004; 104 (5) : 1258-65.
 39. Ngo L, H S-W, L L-C, Tao M, Quek R, Yap S-P, et al. Prognostic factors in patients with diffuse large B cell lymphoma: Before and after the introduction of rituximab. *Leuk Lymphoma*. 2008; 49(3):462-69.
 40. Wollberg P, Nelson D. Regulation of the expression of lactate dehydrogenase isoenzymes in human lymphocytes. *Mol Cell Biochem*. 1992; 110:161-64.
 41. Xue Q, Yeung ES. Determination of lactate dehydrogenase isoenzymes in single lymphocytes from normal and leukemia cell lines. *J Chromatogr. B* 1996, 677: 233-40.
 42. Ferraris AM, Giuntini P, Gaetani GF. Serum lactic dehydrogenase as a prognostic tool for non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 1979; 54:928-32.
 43. Batsakis JG, Siders D. Enzyme molecular heterogeneity (isoenzymes) in surgical diagnosis. *Arch Surg*. 1967; 95:138-43.
 44. Copur S, Kus S, Kars A, Renda N, Tekuzman G, Firat D. Lactate dehydrogenase and its isoenzymes in serum for patients with multiple myeloma. *Clin Chem*. 1989; 35:1968-70.
 45. Buchbaum R, Liu FJ, Trujillo JM. Serum lactate dehydrogenase 3 isoenzyme in chronic granulocytic leukemia. *Am J Clin Pathol*. 1991; 96:464-69.
 46. Plum J, De Smedt M. Enzymatic relationship between human Ty+ lymphocytes and thymocytes. *Cell Immunol*. 198; 55: 485-89.
 47. Blatt I, Spiegel RY, Papadopoulos NM, Lazarou SA, Magrath JT, Poplack DC. Lactate dehydrogenase isoenzymes in normal and malignant human lymphoid cells. *Blood* 1982; 60: 491-94.
 48. Battlle M, Ribera JM, Oriol A, Pastor C, Mate JL, Fernandez Aviles F, Flores A, et al. Usefulness of tumor markers CA 125 and CA 15-3 at diagnosis and during follow up in non Hodgkin's lymphoma: study of 240 patients. *Leuk & Lymphoma* 2005; 46:1471-76.
 49. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Bougioukas G, Didilis V, Gatter KC, et al. Lactate dehydrogenase -5 (LDH-5) overexpression in non small cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *Br J Cancer* 2003; 89:877-85.
 50. Marjanovic S, Skog S, Heiden T, Tribukait B, Nelson BD. Expression of glycolytic isoenzymes in activated human peripheral lymphocytes: Cell cycles analysis using flow cytometry. *Exper Cell Res*. 1991; 193: 425-31.
 51. Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, et al. C-Myc transactivation of LDH-A: Implication for tumor metabolism and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1997; 94:6658-63.
 52. Pathak Ch, Jaiswal YK, Vinayak M. Modulation in the activity of lactate dehydrogenase and level of C-Myc and C-Fos by modified base queuine in cancer. *Cancer Biol Ther*. 2008; 7(1):85-91.
 53. Konjevic G, Jurisic V, Spuzic I. Corrections to the original lactate dehydrogenase (LDH) release assay for the evaluation of NK cell cytotoxicity. *J Immunol Meth*. 1997; 200:199-201.
 54. Giatromanolaki A, Kourakis MI, Pezzella F, Sivridis E, Turley H, Harris AL, et al. Lactate dehydrogenase 5 expression in non-Hodgkin B cell lymphomas is associated with hypoxia regulated proteins. *Leuk Lymph*. 2008; 49 (11): 2181-86.
 55. Giatromanolaki A, Kourakis MI, Pezzella F, Sivridis E, Turley H, Harris AL, et al. Phosphorylated VEGFR2/KDR receptor are widely expressed in B-cell non Hodgkin's lymphomas and correlate with hypoxia inducible factor activation. *Hematol Oncol*. 2008; 26 (4):219-24.
 56. Bairey O, Blickstein D, Stark P, Prokocimer M. , Nativ

- HM , Kirgner I. et al.: Serum CA125 as a prognostic factor in Non-hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2003;44 (10):1733-38.
57. Dilek I, Ayakta H, Demir C. CA-125 levels in patients with non-Hodgkin's lymphoma and other hematologic malignancies. *Clin Lab Hem.* 2005; 27:51-55.
 58. Zidan J, Hussein O, Basher W, Zohar Sh. Serum CA 125 , A tumor marker for monitoring response to treatment and follow up in patients with Non-Hodgkin's lymphoma. *The Oncologist* 2004;9: 417-21.
 59. Bonnet C, Beguin Y, Fassott MF, Seidel L, Luyckx F, Fillet G. Limited usefulness of CA 125 measurement in the management of Hodgkin's and non Hodgkin's lymphoma. *Eur Jof Haematol.* 2007;78:399-404.
 60. Wei G, Yuping Z, Jun W, Bing Y, Qiaohua Z. CA 125 expression in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2006;47(7):1322-26.
 61. May LT, Santhanam U, Tatter SB, Helfgott DC, Ray A, Grayeb J, Sehgal PB. Phosphorylation of secreted forms of human interferon beta 2 / hepatocyte-stimulating factor /interleukin-6. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; 152:1144-50.
 62. Niitsu N, Okamoto M, Nakamine H, Yoshinot T, Tamaru J, Nakamura S, et al. 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.
 63. Legouffe E, Rodriguez C, Picot MC, Richard B, Klein B, Rossi JF. C Reactive Protein Serum Levels in a valuable and simple prognostic marker in non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk lymphoma* 1998, 31 (3-4):351-57.
 64. Seymour J, Talpaz M, Cabanillas F, Wetzler M, Kurzrock R. Serum Interleukin-6 levels correlate with prognosis in diffuse large-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 1995; 13(3): 575-582.
 65. Duleti'A, Steffer S, Mariji S, Luc k, Valcovi'c T, Petranovi'c D, et al. Serum IL-6, IL-8, IL-10 and beta 2 microglobulin in association with Internacional index in diffuse large B cell lymphoma. *Tumori* 2008 (July-August); 94(4) (aprox 10 p). Disponible en: www.tumorionline.it/articoli.php?archivio=yes&vol_id=371&id=4332.
 66. Mazzotta S, Guerranti R, Gozzetia A, Bucalossi A, Bocchia M, Sammassimo S, et al. Increased serum lactate dehydrogenase isoenzymes in ph-negative chronic myeloproliferative diseases: a metabolic adaptation? *Hematology* 2006; 11(4). 239-44.

Premio para Estudiantes de Bioanálisis “Profesora Franca Billi” 2012

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE *Acanthamoeba* spp.

Victoria Luongo C.¹, Alejandra Ugarte-Pelayo S.¹, Mónica Galindo¹, María Alejandra Vethencourt¹

¹Dirección: Escuela de Bioanálisis, Cátedra de Parasitología, Laboratorio de Amibiasis, Universidad Central de Venezuela (UCV).

Recibido para publicación junio 2012. Aprobado para publicación septiembre 2012.

RESUMEN:

Las especies del género *Acanthamoeba* tienen una amplia distribución, lo cual junto a su estrecha relación con el humano aumenta la probabilidad de actuar como agente etiológico de enfermedades de gravedad variable según el estado inmunológico del individuo. La presencia de estos microorganismos en pacientes con queratitis, dermatitis y encefalitis, es subestimada como agente causal. Debido a la subjetividad, limitada sensibilidad y especificidad en la identificación de estos microorganismos solo por morfología, es importante el empleo de herramientas moleculares. El objetivo de esta investigación se centró en la caracterización molecular de 14 aislados mantenidos en medio Page modificado en el Laboratorio de Amibiasis de la Escuela de Bioanálisis de la UCV, procedentes de muestras biológicas, mediante el empleo de PCR-RFLP (*Hinfl*, *HhaI* y *HaeIII*), previamente identificados morfológicamente como del género *Acanthamoeba*, según los parámetros propuestos por Pussard y Pons, 1977. Todos los aislados se excluyeron del Grupo I por tener quistes de menos de 18 μ m. De los 14 aislados seleccionados, 50% presentó características morfológicas compatibles con el Grupo II mientras que el otro 50% fue compatible con el Grupo III. Desde el punto de vista molecular, 86% de los aislados clasificados como Grupo II amplificaron productos de PCR de 900 pb, y el 100% de los aislados del Grupo III de 700 pb, así como el 14% restante del Grupo II. Se observó una tendencia que sugiere, que a mayor tiempo (años) de mantenimiento en medios de cultivo, se espera un producto de PCR de 700 pb y variaciones fenotípicas en estos microorganismos. Los aislados del Grupo III no se pudieron caracterizar molecularmente por PCR-RFLP, debido a que el patrón de digestión con las enzimas de restricción no coincidió con patrones publicados por Kong y Chung, 1996. Respecto al Grupo II, 71% (5/6) de los aislados se identificó a nivel de especie por medio del RFLP. Se identificó a A13 y A14 como *A. polyphaga*, A29 como *A. castellani* y A15 y A30 como *A. castellani* y/o *A. polyphaga* a partir de muestras de heces, lentes de contacto y/o úlcera corneal y aspirado de absceso cerebral, las cuales fueron obtenidas de pacientes con patología. Estas especies coinciden con las patógenas más comunes descritas en la literatura.

Palabras Clave: *Acanthamoeba* spp., Amibas de Vida Libre (AVL), PCR, RFLP, SU ADN_r 18S.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Acanthamoeba* spp. ISOLATES

SUMMARY

Members of the genus *Acanthamoeba*, have a wide distribution of pathogenic species, it's close relationship with humans increases the probability of life threatening or critical health conditions depending on the immune status of the patient. Usually these protozoans are not considered as the main cause of keratitis, dermatitis, and encephalitis in patients. As a consequence of the low sensibility, specificity, and high subjectivity that involves the morphologic identification of this microorganisms, has been considered the importance of the use of molecular analyses for its identification. By PCR-RFLP analyses, where characterized 14 isolates of *Acanthamoeba* spp. maintained in Page (modified) culture media in El Laboratorio de Amibiasis de la Escuela de Bioanálisis de la U.C.V, from clinical samples. These isolates where previously identified as *Acanthamoeba* using morphological methods as established for Pussard and Pons, 1977. 100% of the isolates where excluded from morphological Group I for showing sizes under 18 μ m. However 50% of the isolates where classified as members of morphological Group II and the other 50% as members of morphological Group III. Furthermore, 86% of the isolates classified as Group II exhibited PCR products of 900 pb as expected, while 100% of the isolated classified as Group III and 14% of the remaining isolates from Group II showed PCR products of 700 pb. In addition, it's been observed a tendency suggesting that the longer (time in years) the microorganisms are maintained in culture conditions, it is expected to obtain a PCR product of 700 pb and major phenotypic alterations. Moreover, species of isolates from Group III were not identified, because they showed patterns of digestion with restriction enzymes *Hinfl*, *HhaI* y *HaeIII* that differed from the reference ones published in 1996 by Kong & Chung. On the other hand, 71% of the isolates belonging to Group II showed patterns of identification compatibles with the references -Kong & Chung- using the same restriction enzymes. The isolates identified where: A13 and A14 as *A. polyphaga*, A29 as *A. castellani*, and A15 and A30 as *A. castellani* or *A. polyphaga*; these represent the most pathogenic and common identified species previously reported in other investigations.

Key words: *Acanthamoeba* spp., Free living Amoebas, PCR, RFLP, SU ADN_r 18S.

Solicitar copia a: Victoria Luongo (victorialuongo@gmail.com)

Introducción

Las amibas de vida libre (AVL) son protozoarios que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, animales y humanos. Son de interés en el área clínica y diagnóstica, debido a que han demostrado ser causantes de una variedad de enfermedades de curso diverso, tanto en pacientes inmunosuprimidos como inmunocompetentes (1).

Las AVL del género *Acanthamoeba*, son las que producen mayor número de casos de afección en el hombre y se han descrito varias especies que pueden producir principalmente tres patologías distintas: Encefalitis Granulomatosa Amibiana (EGA), Dermatitis Acanthamebiana (DA) y Queratitis Acanthamebiana (QA), siendo esta última la entidad de mayor prevalencia, principalmente en pacientes inmunocompetentes usuarios de lentes de contacto (2,3).

El cultivo de las muestras ha sido considerado como el procedimiento diagnóstico más sensible y específico por muchos años. Sin embargo, hoy se conoce que la identificación morfológica a partir de cultivos, a pesar de su gran utilidad carece de rapidez y su sensibilidad es limitada para realizar un diagnóstico oportuno (4,5).

Hoy día, con el advenimiento de las técnicas moleculares, el diagnóstico se convirtió en un procedimiento mucho más sensible, específico y rápido. En adición a esto, dichas técnicas permiten realizar un diagnóstico de género y de especie a partir de cualquier aislado (proveniente de muestras biológicas y no biológicas) extendiendo aún más el conocimiento del agente causal, su incidencia y vías de transmisión. Es por esto que nos propusimos caracterizar molecularmente el gen de la subunidad ribosomal 18S de algunos de los aislados de *Acanthamoeba* spp. que se han mantenido en el LAEBIOUCV desde que fueron diagnosticados

en pacientes de con distintas afecciones y de diferentes muestras.

Materiales y Métodos

Aislados de estudio

Se utilizaron 14 aislados provenientes de muestras biológicas (heces, raspados corneales, lentes de contacto y aspirado cerebral) y previamente identificados según su morfología como *Acanthamoeba* spp., mantenidos en cultivo en medio Pagé modificado desde su diagnóstico hasta la fecha. La nomenclatura empleada para su identificación fue acordada por los miembros de este Laboratorio, empleando la letra "A" precediendo a un número asignado. Los aislados analizados fueron: A1, A2, A10, A13, A14, A15, A16, A17, A19, A21, A22, A29, A30, A31.

Clasificación Morfológica

Se realizó siguiendo los criterios propuestos por Pussard y Pons, 1977 (6) quienes registraron la existencia de tres grupos, sobre bases morfológicas referentes al tamaño y morfología de los quistes. Las especies fueron distribuidas en tres grupos que se presentan en la Tabla I.

Clasificación Molecular PCR-RFLP

Se realizó la amplificación por PCR de una región del gen que codifica la Subunidad Ribosomal menor 18S (ARNr SU 18S, empleando los iniciadores (primers) descritos previamente por Kong y Chung (7), esperando obtener un amplificado entre 910-930 pb.

Acantha-for

(5'TTTGAATTCGCTCCAATAGCGTATATTA 3')

Acantha-rev

(5'TTTGAATTCAGAAAGAGCTATCAATCTGT 3')

Posteriormente se realizó la digestión de estos productos

TABLA I
Agrupación del género *Acanthamoeba* spp. según la morfología de los quistes por microscopía óptica.

GRUPO	ESPECIES	DIÁMETRO	ECTOQUISTE	ENDOQUISTE
I	<i>A. astronyxis</i>	>18 µm	Ligeramente liso	Estrellado
II	<i>A. castellani</i> <i>A. polyphaga</i>	<18 µm	Irregular o arrugado	Poligonal
III	<i>A. culbertsoni</i> <i>A. healy</i> <i>A. palestinensis</i>	<18 µm	Liso	Arrugado

con las enzimas de restricción (RFLP) *HinfI*, *HhaI* y *HaeIII* tomando como referencia los patrones de digestión publicados por Kong y Chung (7).

Los controles utilizados en esta investigación fueron dos aislados (C1=A27 y C2=A9) previamente identificados por Conde y Machado, 20108, como *A. castellani* y *A. polyphaga*, respectivamente.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico que se empleó para esta investigación fue de tipo no paramétrico debido al tamaño de la muestra implicada. Dependiendo de las comparaciones a realizar se empleó la prueba de Mann-Whitney U o la Prueba exacta de Fisher. Se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0,05$.

Resultados

Caracterización morfológica de los quistes

El 100% de los aislados evaluados morfométricamente, fueron excluidos del Grupo I según los criterios propuestos por Pussard y Pons (6), por presentar diámetros inferiores a $18\mu\text{m}$. El 50% de los aislados fue incluido en el Grupo II (A2, A13, A14, A15, A29, A30 y A31) y el 50% restante fue incluido en el Grupo III (A1, A10, A16, A19, A21 y A22). El diámetro de los quistes de los aislados pertenecientes al Grupo II fue en promedio $11,31\mu\text{m}$ ($9,0\text{-}14,2\mu\text{m}$), siendo estos significativamente más grandes ($p=0,026$) que los quistes de los aislados del Grupo III, los cuales presentaron un promedio de $8,4\mu\text{m}$ ($6,9\text{-}10,1\mu\text{m}$).

También se tomó en cuenta el número de puntas del endoquiste y la cantidad de éstas que contactan el ectoquiste. Los aislados del Grupo II presentaron mayor número de puntas en el endoquiste, en promedio 2,4 (1,6-3,9 puntas) y mayor número de puntas que contactan con el ectoquiste en promedio 2,0 (0,6-3,6 puntas). Respecto al Grupo III, presentaron escasas puntas en el endoquiste en promedio 0,4 (0,1-0,6 puntas) y ninguna contactaba con el ectoquiste. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la morfología de los quistes de ambos grupos para las variables mencionadas ($p=0,017$ y $p=0,004$, respectivamente).

Caracterización morfológica de los trofozoítos

Para la caracterización morfológica de los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. se tomó en cuenta criterios morfológicos tales como el número de vacuolas contráctiles, diámetro de las vacuolas contráctiles, longitud mayor y menor de los trofozoítos, número de pseudópodos emitidos y número de acantopodios. Para el Grupo II, los criterios de número y diámetro de las vacuolas contráctiles, longitud mayor del trofozoíto y número de acantopodios, fueron significativamente mayores respecto al Grupo III ($p= 0,022$; $0,001$; $0,002$; $0,001$, respectivamente).

Clasificación molecular

PCR

Dentro de los resultados obtenidos mediante esta técnica se pudo verificar la existencia de dos grupos de acuerdo al tamaño del producto de PCR obtenido: los aislados que amplificaron a 700 pb, (Grupo III y A22) y los que amplificaron a 900 pb, (GrupoII).

Al relacionar la morfología de los quistes (según Pussard y Pons (6)) con el tamaño de los productos de PCR obtenidos, se observó que existe concordancia entre la presencia de quistes lisos (Grupo III) con un producto de 700 pb y la presencia de quistes festoneados o plegados (Grupo II) con la amplificación de un producto de 900 pb ($p=0,005$).

En cuanto a la morfología de los quistes y el tiempo de mantenimiento en cultivo de los aislados de *Acanthamoeba* spp. no se observó relación entre estas variables ($p=0,192$). Cuando se evaluó la relación entre el tiempo de mantenimiento en cultivo y el tamaño del producto de PCR obtenido de los aislados de *Acanthamoeba* spp., se observó una tendencia ($p= 0,055$) a que los aislados que tengan un periodo ≥ 10 años de mantenimiento en cultivo, presentarán productos de PCR de 700 pb, mientras que aquellos aislados que tengan un tiempo de mantenimiento <10 años, presentarán un producto de PCR de 900 pb utilizando los primers publicados por Kong y Chung (7) (TABLA II).

TABLA II
Relacion entre los resultados moleculares (PCR), el Grupo morfológico y el tiempo de mantenimiento en cultivo de los aislados de *Acanthamoeba* spp.

Grupo según Pussard y Pons6	Producto de PCR (pb)		Tiempo (años) mantenimiento en cultivo	
	700	900	< 10	> 10
II	1/7 (14%)	6/7 (86%)	3/7 (43%)	4/7 (57%)
III	7/7 (100%)	0	7/7 (100%)	0

RFLP

Después de la digestión de los productos de PCR con las enzimas de restricción *HinfI*, *HhaI* y *HaeIII*, se pudo identificar el 71% de los aislados pertenecientes al Grupo II comparando los resultados obtenidos con los patrones de digestión publicados por Kong y Chung (7)

(Figura 1). Mientras que los aislados pertenecientes al Grupo III no pudieron ser identificados, por no presentar relación con los patrones de digestión publicados por Kong y Chung (7). En la TABLA III se puede observar los aislados, producto de PCR e identificación a nivel de especie del Grupo II.

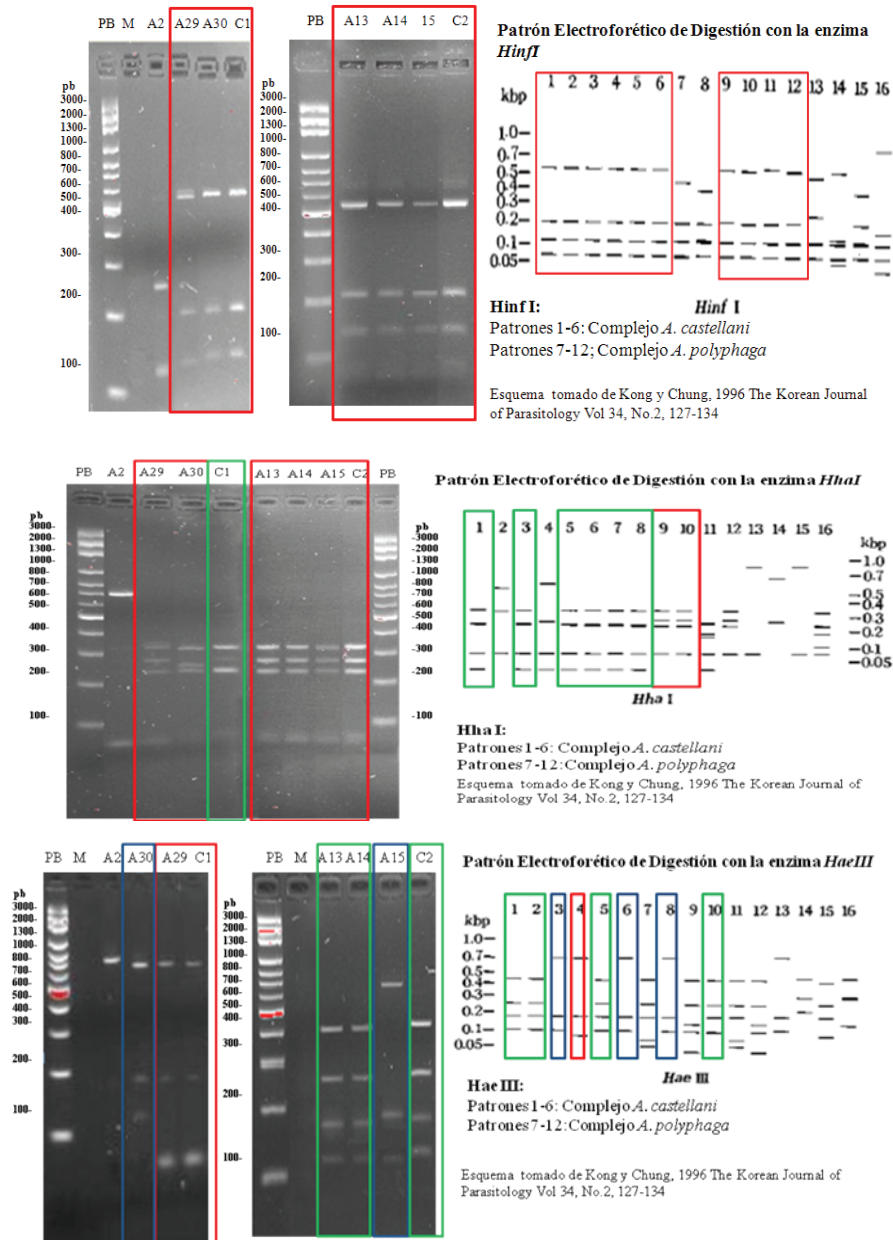


Figura 1: Electroforesis de los productos de digestión de *Acanthamoeba* spp. de Grupo II según Pussard y Pons (6) con *HinfI*, *HhaI* y *HaeIII* y Esquema de patrón electroforético de digestión de *Acanthamoeba* spp. con *HaeIII* realizado por Kong y Chung 1996 (8)

Electroforesis en gel de agarosa al 2,5% teñido con SYBR safe.
 PB: marcador de 100 pares de bases. M: mezcla: pb: pares de bases producto RFLP. C1: *A. castellanii*, C2: *A. polyphaga*. Conde y Machado, 2012 10

TABLA III
Resultados moleculares de aislados de *Acanthamoeba* spp. mantenidos en el LAEBIOUCV

Grupo según Pussard y Pons (6)	Aislado	Producto de PCR	Especie según patrones RFLP
Grupo II	A2	700 pb	NR
	A13	900 pb	<i>A. polyphaga</i>
	A14	900 pb	<i>A. polyphaga</i>
	A15	900 pb	<i>A. castellani</i> o <i>A. polyphaga</i>
	A29	900 pb	<i>A. castellani</i>
	A30	900 pb	<i>A. castellani</i> o <i>A. polyphaga</i>
	A31	900 pb	NSR

NR: No hubo relación; pb: pares de bases; NSR: No se pudo relacionar

Discusión

Los miembros del género *Acanthamoeba* son individuos ubicuos, por lo que no debe sorprender el hecho de que estudios han puesto en evidencia, la presencia de anticuerpos específicos contra *Acanthamoeba* spp. en más del 50% de la población estudiada (9,10), demostrando la continua exposición y frecuencia del contacto del humano con estos protozoarios.

En las últimas décadas, con el aumento del número de usuarios de lentes de contacto, se ha incrementado la prevalencia de la QA en pacientes inmunocompetentes (11), sin embargo hay entidades patológicas de menor prevalencia que la QA pero de alto índice de mortalidad debido al rápido progreso y gravedad del proceso infeccioso tal como es el caso de la EGA y la DA.

Para esta investigación, se analizaron 14 aislados previamente identificados como del género *Acanthamoeba* spp., a los cuales se les realizó un análisis morfológico y molecular con la finalidad de establecer la especie de cada uno de ellos.

Al analizar los 14 aislados de *Acanthamoeba*, se determinó que ninguno pertenecía al Grupo I según Pussard y Pons(6), por no presentar quistes de diámetro mayor a 18µm. Los aislados A2, A13, A14, A15, A29, A30 y A31 se incluyeron en el Grupo II según Pussard y Pons6 por presentar quistes con ectoquistes irregulares, pudiendo inferir que las posibles especies, según lo publicado (6) son *A. castellani* o *A. polyphaga*. Mientras que los aislados A1, A10, A16, A17, A19, A21 y A22, se incluyeron en el Grupo III según Pussard y Pons (6) por presentar ectoquistes lisos, pudiendo

inferir que las posibles especies, según lo publicado (6) son *A. culbertsoni*, *A. healy* o *A. palestinensis*. Entre estos dos Grupos, se observó que hay diferencia estadísticamente significativa en cuanto al tamaño y la morfología de los quistes, tal como se esperaba, debido a que según la metodología de diagnóstico morfológico, los quistes son la forma evolutiva empleada para la identificación de género. Al analizar los trofozoítos de todos los aislados, se observó que los pertenecientes al Grupo II, fueron más alargados y con un número mayor de acantopodios emitidos que los del Grupo III cuyos trofozoítos presentaron menor longitud y pseudópodos de tipo lobopodios en lugar de acantopodios. Se observó diferencia estadísticamente significativa entre el Grupo II y el Grupo III en cuanto a la morfología de los trofozoítos, ésto se pudiera explicar debido a que durante su fase vegetativa los aislados incluidos dentro del Grupo III no presentaron morfología tan típica del género *Acanthamoeba* spp. Pudiéndose constatar que se trata de una tendencia al mantenerlos durante periodos mayores a 10 años en medio de cultivo.

De acuerdo con el diseño de la investigación, en cuanto a los primers seleccionados y las publicaciones tomadas como referencia, los miembros del género *Acanthamoeba* spp. deben mostrar productos de PCR entre 910 y 930 pb7, sin embargo, los resultados obtenidos para los aislados pertenecientes al Grupo III, presentaron productos de menor tamaño en pb que lo esperado, posiblemente debido a una alteración de la región altamente conservada que pudo haber modificado las características fenotípicas de estos aislados. Estadísticamente, se pudo observar una tendencia a presentar productos de PCR de 700 pb en aislados mantenidos en cultivo durante periodos

mayores a 10 años, excepto el aislado A2, el cual se clasificó en el grupo II, pero amplificó un producto de 700 pb y se ha mantenido 21 años en cultivo.

Una de las hipótesis que podría explicar la obtención de productos de PCR de 700 pb en los aislados de *Acanthamoeba* estudiados, es el proceso de transposición. Una de las consecuencias de este proceso, es el denominado polimorfismo en regiones codificantes con alteración del fenotipo, pudiendo afectar su funcionalidad(12). Aunque el gen de la SU ARNr 18S, es una estructura altamente conservada que sufre solo pequeños cambios estructurales que permiten la identificación de especies del género *Acanthamoeba* spp.13,14,15, numerosos estudios han demostrado que la SU ARNr 18S posee intrones (ADN no codificante) lo que puede alterar la estructura genética, modificar el tamaño de los amplificadores por PCR y por tanto afectar la interpretación del mismo (7,13). Esto representa una limitación importante al momento de comparar con los patrones de RFLP de referencia para la identificación de las especies.

La identificación de las especies mediante RFLP se logró en un 36% del total de los aislados seleccionados mantenidos en el LAEBIOUCV. Las especies identificadas fueron *A. castellani* para A29, *A. polyphaga* para A13 y A14, y se obtuvo patrones solapados, para A15 y A30 impidiendo su identificación definitiva, siendo compatible con los patrones de *A. castellani* y *A. polyphaga*. Por otra parte, estos resultados se corresponden muy bien con las especies agrupadas por Pussard y Pons (6) que indican que las posibles especies para el género *Acanthamoeba* que exhiban características morfológicas compatibles con miembros del Grupo II pueden ser *A. castellani* y/o *A. polyphaga*.

El 57% de los aislados seleccionados para este proyecto, no presentó productos de digestión similares a los patrones de digestión con cada una de las enzimas publicados por Kong y Chung, 1996 (7). Sin embargo, la comparación entre los productos de digestión obtenidos para los aislados que obtuvieron productos de PCR de 700 pb, permitió observar que el 36% obtuvo patrones de digestión similares entre sí con las enzimas de restricción *HinfI* y *HaeIII*. Así mismo, se observó una similitud del 50 – 75% entre estos aislados y 3 de los aislados estudiados por Conde y Machado 2010 (8), por lo que se puede inferir que se trata de las mismas especies. Cabe destacar, que los aislados utilizados en la investigación realizada por Conde y Machado, 2010 (8), pertenecían al Grupo III según Pussard y Pons (6),

presentaban productos de 700 pb, y tenían un tiempo \geq a 10 años de mantenimiento en medio de cultivo.

En el caso puntual de A31, a pesar de que obtuvimos un producto de PCR de 900 pb, el rendimiento de RFLP no logró ajustarse tras varios intentos, habiendo esto impedido la posibilidad de identificación.

No se logró relacionar la procedencia del material biológico y la especie identificada, debido a que el porcentaje de aislados identificados es muy bajo (36%). Sin embargo, las especies identificadas tienen congruencia con lo descrito en la literatura ya que se trata de las especies más comunes y más patógenas (13).

Conclusiones y recomendaciones

Se clasificó según los criterios de Pussard y Pons, 1977, a los aislados A2, A13, A14, A15, A29, A30 y A31 como pertenecientes al Grupo II, y a los aislados A1, A10, A16, A17, A19, A21 y A22 como pertenecientes al Grupo III.

La amplificación del ADN mediante PCR de los aislados se correlaciona con la agrupación morfológica: los productos de amplificación para el grupo II fueron de 900 pb, (excepto A2) y para el grupo III fueron de 700 pb.

Se observó una tendencia que relaciona el tiempo de mantenimiento de los aislados en cultivo con los productos de PCR de 700 pb.

Se identificó sólo el 36% de los aislados seleccionados mediante RFLP. Se pudo determinar que la especie de los aislados A13 y A14 es *Acanthamoeba polyphaga*. La especie de A29 corresponde a *A. castellani*. Se presume que la especie de A15 y A30 es *A. castellani* o *A. polyphaga*.

Los aislados A16, A17 y A10 pertenecientes al Grupo III y con 700 pb, presentaron polimorfismos similares con las enzimas *HinfI* y *HaeIII* por lo pudiera ser sugestivo de que se trate de las mismas especies de *Acanthamoeba* spp.

Considerar la criopreservación para evitar la influencia del tiempo de mantenimiento sobre el cambio en la morfología.

Realizar la identificación de los aislados que amplificaron productos de PCR de 700 pb mediante el empleo de otros primers, otras enzimas y/o secuenciación de los aislados.

Realizar pruebas biológicas de patogenicidad de los aislados que amplificaron en 700 pb.

Referencias Bibliográficas

1. Oddó, B.D. Infecciones por amebas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anatómo-clínicos. *Rev Chil Infect* 2006; 23: 200-214.
2. Mathers, W.D. *Acanthamoeba* A difficult to evaluate and treat. *Cornea* 2004; 3:325.
3. Pérez de Galindo, M.V. Actualización en el conocimiento de Amibas de Vida Libre potencialmente patógenas. Aportes a su estudio en Venezuela, particularmente de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria*. [Trabajo presentado ante la Facultad de Medicina, UCV, para optar al ascenso en el escalafón universitario a Profesor Asociado]. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina, Escuela de Bioanálisis; 2005.
4. Bermúdez, A., Pérez de Galindo, M.V., Martínez, Y., Pérez de Suarez, E., Nieto, T. Identificación de *Acanthamoeba* spp. en 3 pacientes con conjuntivitis. *Ann Inst Barraquer (Barc)* 1998; 27:157-163.
5. Pereira, L., Domínguez, M., Ortiz, N., Torres, L., Placencio, A., Bermúdez, A. Clorhexidina y Poliheximetil Biguanida Tópica para el manejo de queratitis por *Acanthamoeba*. Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario de Caracas. *Rev Oftalmol Venez* 2003; 59:79-84.
6. Pussard, M. & Pons, R. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba*. *Protistologica* 1977; 13: 557-598.
7. Kong H.H., & Chung D.I. PCR and RFLP variation of conserved region of small subunit ribosomal DNA among *Acanthamoeba* isolates assigned to either *A. castellanii* or *A. polyphaga*. *Korean J Parasitol* 1996; 34: 127-134.
8. Conde, C. y Machado, R. Caracterización molecular por PCR-RFLP de la subunidad ribosomal 18S, de aislados de *Acanthamoeba* spp. mantenidos en el laboratorio de amibiiasis de la Escuela de Bioanálisis UCV provenientes de muestras oculares de pacientes. [Trabajo presentado para optar por el título de licenciado en Bioanálisis]. Mayo 2010.
9. Cursons, R.T.M., Brown, T.J., Keys, E.A., Moriarty, K.M. & Till, D. Immunity to pathogenic free-living amoeba: role of humoral antibody. *Infect Immun* 1980; 29: 401-407.
10. Cerva, L. *Acanthamoeba culbertsoni* and *Naegleria fowleri*. Occurrence of antibodies in man. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1989; 33: 99-103.
11. Stehr-Green, J.K., Bailey, T.M. & Visvesvara, G.S. The epidemiology of *Acanthamoeba keratitis* in the United States. *Am J Ophthalmol* 1989; 107: 331-336.
12. Cabrera, J.L., Herraes, A. Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la Salud. Elsevier, España 2008; 1: 367-369.
13. Kong H.H., Chung D.I. Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and 18S Small-Subunit Ribosomal DNA PCR-RFLP Analyses of *Acanthamoeba* Isolated from Contact Lens Storage Cases of Residents in Southwestern Korea. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1119-1206.
14. Stothard, D.R., Schroeder-Diedrich, J.M., Awwad, M.H., Gast, R.J., Ledee, D.R., Rodriguez-Zaragoza, S., Dean, C.L., Fuerst, P.A. & Byers, T.J. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J Eukaryot Microbiol* 1998; 45: 45-54.
15. Kong H.H., & Chung D.I. A ribotyping scheme for identification of unknown *Acanthamoeba* isolates at species level. *J Parasitol* 2002; 40: 25-31.

FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A SÍNDROME METABÓLICO EN PACIENTES ATENDIDOS EN FAMILIA LABORATORIOS CLÍNICOS, VALENCIA, ESTADO CARABOBO, VENEZUELA, PERIODO DICIEMBRE 2011 - MARZO 2012

Beatriz Coelho¹ y Ninoska González¹

Recibido para publicación abril 2012. Aprobado para publicación septiembre 2012.

RESUMEN:

Introducción: El Síndrome Metabólico (SM), se puede definir como una serie de síntomas clínicos y bioquímicos que se presentan, tanto en individuos obesos como delgados, aparentemente sanos. La importancia del SM radica en que las personas que lo padecen tienen mayor riesgo de desarrollar Enfermedad Cardiovascular o Diabetes Mellitus tipo II (DM2). **Objetivo:** Determinar la incidencia de Síndrome Metabólico, sus factores de riesgo predominantes y la relación existente con la insulina basal y post prandial en los pacientes que acudieron al Laboratorio Clínico Familia. **Método:** se estudiaron 100 pacientes de ambos sexos con edades comprendidas entre 13 a 71 años, que acudieron a Familia Laboratorios Clínicos. El diagnóstico para síndrome metabólico fue definido de acuerdo a los criterios de la National Cholesterol Education Program (NECP)/Adult Treatment Panel III (ATP III). **Resultados:** En esta investigación se observó un 75% de pacientes con un estado nutricional alterado (44% obesos y 31% con sobrepeso) siendo estadísticamente significativo para la presencia de sobrepeso u obesidad respecto al estado nutricional normal ($p < 0,01$). Se determinó una prevalencia para síndrome metabólico de 28% siendo el criterio más resaltante la circunferencia abdominal 96,4%, seguido de HDL-C bajo con 75% y triglicéridos altos en un 67,9%. Se midió la insulina basal obteniendo una prevalencia del 14% por encima del valor normal, donde solo el 7% fue diagnosticado con SM, el 35% presentó insulina post prandial elevada. Con los datos obtenidos se pudo observar que los valores de insulina postprandial, tomando como límite 60 $\mu\text{UI/ml}$, no se alteraron con respecto al número de criterios de diagnóstico para SM, como tampoco hubo relación con la circunferencia abdominal, no se evidenció asociación estadísticamente significativa entre la presencia de circunferencia abdominal por encima del límite establecido para cada sexo y la elevación de la insulina postprandial de 2 horas superior a 60 $\mu\text{UI/ml}$, ($p > 0,05$). **Discusión:** El presente estudio fue de tipo correlacional, transversal y no experimental, donde se encontró que el factor de riesgo predominante fue la circunferencia abdominal junto al sobrepeso y obesidad por encima del rango para ambos sexos. No se evidenció relación entre la insulina post prandial, la prevalencia de factores de riesgo y la circunferencia abdominal.

Palabras claves: síndrome metabólico, factores de riesgo, relación insulina-síndrome metabólico.

RISK FACTORS ASSOCIATED WITH METABOLIC SYNDROME IN PATIENTS ATTENDING FAMILY CLINICAL LABORATORY, VALENCIA, CARABOBO STATE, VENEZUELA, PERIOD DECEMBER 2011 - MARCH 2012.

SUMMARY

Introduction: Metabolic Syndrome (MS) can be defined as a series of clinical and biochemical symptoms that occur both in obese and lean apparently healthy. The importance of the SM is that people with the condition are at increased risk of developing cardiovascular disease and type II diabetes mellitus (T2DM). **Objective:** To determine the incidence of metabolic syndrome prevalent risk factors and the relationship with basal insulin and postprandial in patients presenting to the Family Clinical Laboratory. **Methods:** We studied 100 patients of both sexes aged 13-71 years, who attended Family Clinical Laboratory. The diagnosis for metabolic syndrome was defined according to the criteria of the National Cholesterol Education Program (NCEP) / Adult Treatment Panel III (ATP III). **Results:** In this survey found 75% of patients with altered nutritional status (44% obese and 31% overweight) were statistically significant for the presence of overweight or obese compared to normal nutritional status ($p < 0.01$). The sero prevalence for metabolic syndrome of 28% being the most salient criterion waist circumference 96.4%, followed by low HDL-C by 75% and triglycerides by 67.9%. Basal insulin was measured by obtaining a prevalence of 14% above the normal value, where only 7% were diagnosed with MS, 35% had elevated postprandial insulin values, taking as limit 60 mUL/ml, were not altered with respect to the number of diagnostic criteria for MS, as there was no relationship with waist circumference, no evidence statistically significant association between the presence of abdominal circumference above the limit established for each sex and elevated postprandial insulin over 2 hours 60 mUL/ml ($p < 0.05$). **Discussion:** This study was correlational, cross and not experimental, which found that the predominant risk for factor was by the abdominal circumference and overweight and obesity over the range for both sexes. No association between postprandial insulin, the prevalence of risk factors and waist circumference.

Key words: metabolic syndrome, risk factors, insulin ratio metabolic syndrome.

Solicitar copia a: Beatriz Coelho (guiomartinc@hotmail.com)

¹Laboratorios Clínicos Familia, Valencia - Estado Carabobo.

Introducción

El Síndrome Metabólico (SM), se puede definir como una serie de síntomas clínicos y bioquímicos que se presentan, tanto en individuos obesos como delgados, aparentemente sanos. Fue descrito por primera vez en 1988 por Gerald Reaven, del Departamento de Medicina del Centro Médico de la Universidad de Stanford, confirmando la asociación de las alteraciones metabólicas con la Resistencia a la Insulina (R.I)(1). La importancia del SM radica en que las personas que lo padecen tienen mayor riesgo de desarrollar Enfermedad Cardiovascular o Diabetes Mellitus tipo II (DM2) (2,3). Debido a esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Panel Norteamericano de Tratamiento del Colesterol en Adultos (NCEP) en su tercera versión (ATP III) han establecido una serie de condiciones para el diagnóstico del SM, la cual dice que al tener por lo menos tres de las condiciones (Tabla 1), pueden hacerlo un candidato a padecer SM, aunado a otros factores, como lo son el estado nutricional (Tabla 2), la predisposición hereditaria, sedentarismo, malos hábitos alimenticios, de acuerdo con el Centro Para el Control y la Prevención de Enfermedades en USA la CDC, en el 2001 (4,5).

La obesidad abdominal, se ha incorporado como parte del SM, ciertamente está asociada y se cree que la obesidad sea el detonador; al existir obesidad, sobre todo de predominio abdominal, aumenta la prevalencia de hipertensión, dislipidemias, alteraciones en la glicemia y empeora la resistencia a la insulina (6). La obesidad ha ido incrementándose a niveles de epidemia, y ha

convertido al SM en un problema de salud pública (7). Según los reportes de la OMS, la prevalencia varía entre 1,6 a 15%, pero cuando el IMC se incrementa a 35 o más, la prevalencia se incrementa hasta el 50% (8). Casi todos los expertos están de acuerdo en que los síntomas mejoran considerablemente al reducir el peso corporal y aumentar la actividad física. Un músculo inactivo es menos sensible a la insulina (9). Tal como concluyó Lee DC y col (2012), en un estudio realizado en USA, que al mantener o mejorar la condición física y alimentaria se reduce el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares en adultos sanos. (10)

La alteración del metabolismo glicémico es uno de los criterios diagnósticos de SM, donde se presenta una glicemia alterada en ayuna (GAA)⁵, considerándose un estado prediabético como tal ya que incrementa hasta 5 veces el riesgo de desarrollar DM2 (11), la cual suele ser diagnosticada en pacientes mayores de 30 años, sin embargo puede presentarse en niños y adolescentes; dicha alteración se caracteriza clínicamente por hiperglicemia y R.I, asociada comúnmente con obesidad, especialmente de tipo viscer/abdominal y suele presentarse tras un periodo de ganancia de peso (12).

La Resistencia a la Insulina se define “como la disminución funcional de la insulina para mantener la homeostasis de la glucosa, trayendo como consecuencia un aumento de la secreción de insulina”, compatible con una glicemia plasmática normal; la R.I da inicio a una lipólisis descontrolada, ocasionando alteraciones de los niveles sanguíneos de lípidos, esta resistencia puede ser

Tabla 1
Criterios Clínicos de la NECP-ATP III, para el diagnóstico de Síndrome Metabólico.

Factores de riesgo	Definición
Glicemia Alterada en ayuna (GAA)	> 100 mg/dl
Dislipidemias	Triglicéridos >150 mg/dl HDL-colesterol Hombres <40 mg/dl Mujeres <45 mg/dl
Circunferencia Abdominal (C.A)	Hombres >102 cm, Mujer >88cm.
Hipertensión Arterial	TA >130/85 mmHg

Tabla 2
Otros Criterios que se tomaron en cuenta en este estudio.

Criterios	Definición
Insulina Basal	5 – 15 μ UI/ml
*Insulina post prandial	> 60 μ UI/ml
** IMC (Kg/m ²)	
Normal	18,5 – 24,9
Sobrepeso	25,0 – 29,9
Obesidad Grado I	30,0 – 34,9
Obesidad grado II	35,0 – 39,9
Obesidad grado III	\geq 40,0

*datos obtenidos de la bibliografía 19

**datos obtenidos de OMS, 2008.

el mecanismo común que conduce a otras alteraciones: riesgo cardiovascular, alteraciones del metabolismo lipídico, aumento de la presión arterial. El trastorno inicial de la R.I parece centrarse en el adipocito, consistiendo en la incapacidad de almacenar ácidos grasos, secundaria a predisposición genética, alteraciones dietéticas, etc. La insulina regula la conversión de glucosa en triglicéridos y la de triglicéridos en ácidos grasos y también inhibe a la Lipoproteinlipasa (LPL), la cual se encuentra en las paredes capilares del tejido adiposo, y es la que desdobla los triglicéridos circulantes en ácidos grasos para luego ser almacenados, por lo tanto, la entrega de triglicéridos se deriva hacia las lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) que a su vez los intercambia por colesterol; es por ello que al aumentar los triglicéridos bajan las HDL-C (12,13).

Otro de los criterios que está estrechamente relacionado con el SM es la hipertensión arterial (HTA), la cual es un importante factor de riesgo para las principales complicaciones cardiovasculares (cardiopatía isquémica, accidentes cerebrovasculares, entre otros), el SM es un acumulo de factores de riesgo que comprende todas estas condiciones, además, la HTA desempeña un papel clave en el manejo clínico de los sujetos con SM (14).

Con respecto a estudios a nivel nacional, en el estado Zulia, Bermúdez V. y col., estudiaron una muestra importante, encontrando una prevalencia del 35,3% de SM, según los criterios de la ATP III, con diferencia pequeña entre razas, y con predominio en mujeres mayores de 50 años, siendo los componentes más frecuentes la obesidad abdominal y el HDL-C bajo (2008) (15); así como también Becerra A. y col., evaluaron la prevalencia del SM en una muestra representativa del Estado Mérida (2009), siendo ésta del 38% según los criterios del ATP III, hallándose una alta frecuencia de anormalidad en el peso corporal (80%), circunferencia abdominal (>50%), hipertrigliceridemia (56%) y valores bajos de HDL-C (76%), no observándose alteración de glicemia basal (6%). La frecuencia del SM fue del 24% en los individuos con normopeso y aumentó significativamente en función del IMC, en conclusión, el patrón de SM predominante se caracterizó por dislipidemia, obesidad visceral y baja frecuencia de glucosa en ayunas alterada (16).

En el 2007 un estudio regional Lozada M y col. Evaluaron un grupo de adolescentes (88 sujetos), donde obtuvieron una prevalencia de SM del 13.6%, sin diferencia estadísticamente significativa en el sexo; encontrando el HDL-C el criterio frecuentemente más alterado (61,4%), seguido por la hipertrigliceridemia (28,4%),

hiperglicemia (26,1%), obesidad (10,2%) e HTA (5,6%), concluyendo que el SM puede estar presentes desde etapas tempranas de la vida (17).

Debido a que en el estado Carabobo no existen suficientes aportes estadísticos acerca del SM, de sus factores de riesgo ni de su relación con los niveles de insulina basal y postprandial (en adultos), este trabajo se ha enfocado en establecer que factores de riesgo están predominando en el SM y evaluar el comportamiento de la insulina basal y postprandial en estos sujetos.

Objetivo General

Determinar la incidencia de Síndrome Metabólico, sus factores de riesgo predominantes y la relación existente con la insulina basal y post prandial en los pacientes con edades comprendidas entre 13 y 71 años, que acudieron al Laboratorio Clínico Familia, en el periodo de Diciembre 2011 a Marzo 2012.

Objetivos Específicos

- Determinar los niveles séricos basales de glicemia, insulina, triglicéridos y HDL colesterol en los pacientes estudiados, como factores de riesgo para síndrome metabólico.
- Medir circunferencia abdominal, peso y talla para determinar obesidad abdominal y nivel nutricional (índice de masa corporal); y tensión arterial, como factores de riesgo para síndrome metabólico en los pacientes estudiados.
- Determinar la prevalencia de síndrome metabólico en la muestra estudiada.
- Determinar la incidencia de los factores de riesgo en los pacientes con síndrome metabólico.
- Evaluar el comportamiento de los niveles séricos de insulina post prandial con relación al número de factores de riesgo para síndrome metabólico y la circunferencia abdominal.

Materiales y Métodos

El presente estudio fue de tipo correlacional, transversal y no experimental. La población estudiada estuvo representada por los 135 pacientes con impresión diagnóstica de síndrome metabólico y que fueron atendidos en Familia Laboratorios Clínicos, Valencia, Estado Carabobo, Venezuela, periodo diciembre 2011-marzo 2012, se trabajó con pacientes entre los 13 y 71 años de edad, de ambos sexos. La muestra fue no probabilística e intencional, integrada por 100 pacientes

(74,07% de la población) quienes cumplían con el criterio de inclusión establecido; el cual fue definido por no estar recibiendo tratamiento con hipoglicemiantes orales. Se cumplió con las normas de las buenas prácticas clínicas establecidas por la Organización Mundial de la Salud para los trabajos de investigación en los seres humanos y la declaración de Helsinki, ratificada en la 52ª Asamblea General de Edimburgo 2000 (18). La investigación fue realizada previo consentimiento de los representantes en el caso de los menores de edad o del propio paciente cuando se trató de un adulto.

Se les determinó glicemia basal (por colorimetría, glucosa oxidasa); insulina basal y post prandial, dos horas después del desayuno (determinada por quimioluminiscencia); determinación de triglicéridos en ayuna (utilizando el método colorimétrico de trinder); HDL-C (método colorimétrico directo); circunferencia abdominal tomada a la altura del ombligo, con cinta métrica; tensión arterial medida con tensiómetro manual Aneroid; se les tomó peso y talla utilizando balanza calibrada marca SECO, el Índice de Masa Corporal (IMC) se obtuvo del cociente entre el peso corporal en kilogramos sobre la talla expresada en metros elevada al cuadrado: $\text{Peso Kg}/(\text{Talla m})^2$. Los criterios para el diagnóstico de SM se tomaron de la NCEP-ATP III 2002.

Los resultados se presentan en cuadros de distribución de frecuencias y de asociación. Se realizó un análisis estadístico descriptivo y correlacional con el programa SPSS 15.0 para Windows. Para la estimación del riesgo relativo se empleó el odds ratio (OR) con sus respectivos intervalos de confianza para un 95%. Se usó la prueba t de Student, el Chi cuadrado (X^2) o la prueba exacta de Fisher, el coeficiente de correlación por rangos de Spearman (ρ), así como la comparación de proporciones con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

Los criterios empleados para determinar la condición de cada individuo están resumidos en las tablas 1 y 2.

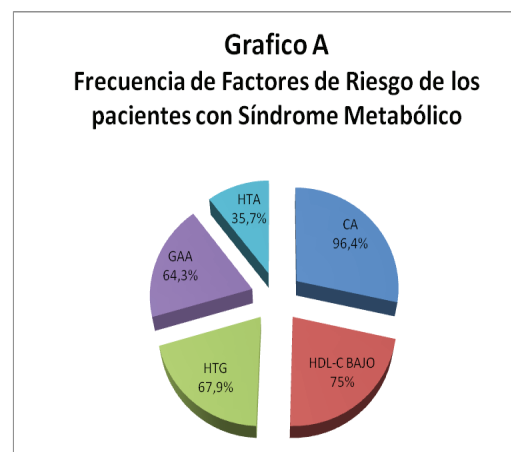
Resultados

La muestra estudiada estuvo integrada por 100 sujetos, 85% (85 pacientes) del sexo femenino y 15% (15 pacientes) del sexo masculino, con un promedio de edad de 36,8 años, desviación estándar (DS) de 14,8 años, edad mínima de 13 años y máxima de 71 años.

Del total, 44% presentaron obesidad ($\text{IMC} > 30 \text{ Kg/m}^2$ de superficie corporal, 23% tenían obesidad grado I, 16% obesidad grado II y 5% obesidad grado III) y 31% sobrepeso (IMC entre 25 y 29,9 Kg/m^2), un 21% tenía un estado nutricional normal y sólo 4% eran de bajo peso, existiendo un predominio estadísticamente significativo

de la presencia de sobrepeso u obesidad respecto al estado nutricional normal ($p < 0,01$). No se detectó asociación significativa entre el sexo y la presencia de obesidad ($p > 0,05$). El 14% de los pacientes estudiados eran hipertensos. Se encontró 14% de pacientes con insulina basal elevada y solo el 7% tenían SM.

Se determinó una prevalencia de SM del 28% (28 pacientes), con un promedio de edad de 41,2 con una DS de 13,8 años, donde el factor de riesgo más predominante fue la circunferencia abdominal 96,2% (27 pacientes), seguido de HDL-C bajo 75,0% (21 pacientes), luego hipertrigliceridemia 67,9% (19 pacientes), glicemia alterada en ayuna 64,3% (18 pacientes) y finalmente hipertensión arterial 35,7% (14 pacientes). (Gráfico A)



En el Cuadro N° 1 se puede apreciar la presencia de factores de riesgo para SM entre los integrantes de la muestra, en el cual destaca que el 69% presentó glicemia basal normal, 73% triglicéridos por debajo de 150mg/dl y tensión arterial normal en un 86%, estos resultados son estadísticamente significativos a favor de la ausencia del factor de riesgo, excepto en el HDL-C bajo y la circunferencia abdominal elevada.

En el Cuadro N° 2 se presenta una menor incidencia en las insulinas de la muestra estudiada con mayor énfasis en la post prandial 35%, pero sí, observándose que el 44% de los pacientes presentó obesidad ($\text{IMC} > 30 \text{ Kg/m}^2$).

Como puede observarse en el Cuadro N° 3, el 32% de los pacientes (32 personas) presentaron dos criterios positivos para síndrome metabólico, 17% tuvo tres criterios positivos, el 9% tuvo cuatro criterios y el 2% tuvo los cinco criterios diagnóstico para el síndrome metabólico; mientras que, el 12% no tuvo ningún criterio diagnóstico de SM de acuerdo a lo establecido en la revisión bibliográfica (4,5).

Cuadro 1.
Presencia de factores de riesgo para síndrome metabólico

Factores de riesgo	Presencia		Ausencia		P
	n	%	n	%	
Glicemia basal > 100 mg/dl	31	31	69	31	<0,001*
HDL-C bajo (Mujer <45 mg/dl, Hombre < 40 mg/dl)	45	45	55	45	0,16
Triglicéridos > 150 mg/dl	27	27	73	27	<0,001*
H.T.A. (> 130/85 mmHg)	14	14	86	14	<0,001*
Circunferencia abdominal (mujer >88cm, Hombre >102cm)	73	73	27	73	0,16

* Estadísticamente significativo.

Cuadro N° 2
Frecuencia de otros factores de riesgo estudiados

Variable	Presencia		Ausencia	
	n	%	n	%
Índice de Masa Corporal (>30Kg/m ²)	44	44	56	56
Insulina basal (>15µUI/ml)	14	14	86	86
Insulina Post prandial (>60 µUI/ml)	35	35	65	65

Cuadro N° 3
Número de criterios diagnóstico para síndrome metabólico en los pacientes estudiados

N° de criterios	Frecuencia	Porcentaje
Ninguno	12	12
Uno	28	28
Dos	32	32
Tres	17	17
Cuatro	9	9
Cinco	2	2
Total	100	100

En el Cuadro N° 4, se observa que de los pacientes con obesidad el 38,6% padecían síndrome metabólico. De los pacientes que no presentaron obesidad (11 pacientes) el 90,9% (10 pacientes) tenían sobrepeso.

Se detectó asociación estadísticamente significativa entre los criterios de diagnóstico con la presencia de síndrome metabólico al realizar la prueba de X² para las respectivas tablas de asociación ($p < 0,05$). El riesgo de presentar síndrome metabólico fue 16,9 veces mayor entre los pacientes con triglicéridos > 150 mg/dl (OR=16,9; IC 95%), 15,2 veces mayor entre los pacientes con circunferencia abdominal por encima del límite de lo normal para cada sexo (OR= 15,2; IC 95%), 8,2 veces

mayor entre los pacientes con glicemia basal > 100 mg/dl (OR= 8,2; IC 95%) y 6 veces mayor entre los pacientes con HDL-C bajo (OR= 6; IC 95%), siendo estos hallazgos estadísticamente significativos.

El Cuadro N° 5 compendia las comparaciones de medias de las variables numéricas entre los sujetos con y sin síndrome metabólico. Destaca la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos al realizar la prueba t de student, siendo mayores las medias de triglicéridos, HDL-C, IMC y circunferencia abdominal de los pacientes con síndrome metabólico ($p < 0,05$).

Cuadro N° 4
Asociación entre presencia de obesidad y de síndrome metabólico.

		Presencia de		Total	
		Síndrome Metabólico			
		Sí	No		
Presencia de obesidad	Sí	Frecuencia	17	27	44
		%	38,6	61,4	100
	No	Frecuencia	11	45	56
		%	19,6	80,4	100
Total	Frecuencia	28	72	100	
	%	28	72	100	

Cuadro N° 5
Comparaciones de medias de las variables numéricas entre los sujetos con y sin síndrome metabólico.

Variable	Media \pm desviación estándar	t	p
Edad	con SM: 41,4 \pm 13,6 sin SM: 35,0 \pm 14,7	0,46	0,64
Triglicéridos	con SM: 169,8 \pm 71,2 sin SM: 105,0 \pm 37,8	4,4	<0,001*
HDL-C	con SM: 40,6 \pm 6,2 sin SM: 49,8 \pm 11,2	-4,1	<0,001*
Índice de Masa Corporal	con SM: 32,1 \pm 4,9 sin SM: 28,1 \pm 6,3	4,5	<0,001*
Circunferencia Abdominal	con SM: 103,8 \pm 10,5 sin SM: 94,7 \pm 14,2	4,1	<0,001*

*Estadísticamente significativo. SM: Síndrome metabólico.

Cuadro N° 6:
Asociación entre número de criterios diagnóstico para síndrome metabólico
y presencia de Insulina postprandial elevada

		Insulina postprandial 2 horas > 60 μ UI/ml			Total
		Sí	No		
N° de criterios de diagnóstico	0	Recuento	5	7	12
		%	41,7	58,3	100,0
	1	Recuento	7	21	28
		%	25,0	75,0	100,0
	2	Recuento	12	20	32
		%	37,5	62,5	100,0
	3	Recuento	6	11	17
		%	35,3	64,7	100,0
	4	Recuento	3	6	9
		%	33,3	66,7	100,0
	5	Recuento	2	0	2
		%	100,0	0	100,0
	Total	Recuento	35	65	100
		%	36,7	63,3	100,0

Cuadro N° 7:
Asociación entre circunferencia abdominal elevada y presencia de Insulina
postprandial de 2 horas > 60 μ UI/ml en los pacientes estudiados según el sexo.

Sexo			Insulina postprandial 2 horas > 60 μ U/ml		Total
			Sí	No	
Femenino	C.A	Recuento	23	44	67
	>88cm	%	34,3	65,7	100,0
	C.A	Recuento	6	12	18
	≤ 88 cm	%	33,3	66,7	100,0
	Total	Recuento	29	56	85
		%	34,1	65,9	100,0
Masculino	C.A	Recuento	3	4	7
	> 102 cm	%	42,9	66,7	100,0
	C.A.	Recuento	3	5	8
	≤102 cm	%	37,5	62,5	100,0
	Total	Recuento	6	9	15
		%	40,0	60,0	100,0

Prueba exacta de Fisher: $p > 0,05$

Con los datos obtenidos se pudo observar que los valores de insulina postprandial, tomando como límite 60 $\mu\text{UI/ml}$, no se alteraron con respecto al número de criterios de diagnóstico para SM, es decir, no fueron directamente proporcionales.

Cuadro N° 7 no se evidenció asociación estadísticamente significativa entre la presencia de circunferencia abdominal por encima del límite establecido para cada sexo y la elevación de la insulina postprandial de 2 horas superior a 60 $\mu\text{UI/ml}$, ($p>0,05$).

Discusión

El síndrome metabólico está relacionado con un conjunto de factores de riesgo los cuales han estado en estudio desde hace algunos años. La NECP-ATP III establece que con tan solo tener tres (3) de sus criterios ya se considera un paciente con SM, así como otros estudios revisados, en éste se tomó en consideración realizar el diagnóstico de SM en base a estos criterios.

El factor de riesgo que más se presentó en el estudio fue la circunferencia abdominal con un 73%, seguido del HDL-C bajo en un 45%, relacionándose con otros estudios nacionales^{15, 16, 17}. Se obtuvo que el 75% de la muestra presentó alteraciones en el estado nutricional, sobrepeso en un 31% ($\text{IMC} > 25,0$) y obesidad en un 44% ($\text{IMC} > 30\%$) evidenciándose esto como un problema de salud pública⁷.

Se encontró una prevalencia del 28% de pacientes con SM, sin relevancia en cuanto al sexo, la edad promedio fue de $41,2 \pm 13,8$ años, donde el factor de riesgo más predominante fue la circunferencia abdominal (96,2%), coincidiendo con otros estudios, donde la obesidad es uno de los factores con mayor incidencia¹⁶, seguido de HDL-C bajo e hipertrigliceridemia; la glicemia, aunque no fue uno de los más relevantes, se mostró en un 64,3%, no así la hipertensión que solo se presentó en el 35,7% de los casos con SM.

Cabe destacar que, el 32% de la muestra presentó 2 criterios diagnósticos para SM, considerándolos con mayor riesgo de desarrollar este síndrome; señalando la circunferencia abdominal como el factor con más incidencia; mientras que solo el 28% arrojó 3 o más de dichos criterios. De los 28 pacientes con SM 17 presentaron obesidad, y de los 11 restantes 10 tenían sobrepeso.

La resistencia a la insulina e hiperinsulinismo eran consideradas el factor predominante en el SM, sin embargo, debido a que se requieren técnicas de alto costo y complejas la ATP III toma en consideración otros

factores de mayor importancia clínica. Sin embargo, en este estudio se evaluó el comportamiento de la insulina basal e insulina post prandial (IPP), ya que existe una solicitud significativa por parte de los médicos para la realización de estas pruebas, encontrándose una prevalencia del 14% de insulina basal elevada, donde solo el 7% fue diagnosticado con SM, y el 35% presentó IPP elevada (tomando como punto de referencia 60 $\mu\text{UI/ml}$), de los cuales 11 pacientes fueron diagnosticados con SM. Se relacionó la IPP con el número de criterios o factores de riesgo diagnósticos de SM, obteniéndose que la IPP elevada fue independiente del número de criterios, observándose una incidencia más alta en los pacientes sin SM (menos de 3 criterios). Al relacionarla con la circunferencia abdominal se evidenció el mismo comportamiento, es decir, no mantiene relación concluyente o determinante como criterio de riesgo para diagnóstico de SM.

Referencias Bibliograficas

1. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988; 37(12): 1595-1607.
2. Ford ES. Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence. *Diabetes Care*. 2005; 28: 1769-78.
3. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsén B, Lahti K, Nissén M y col. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2001; 24(4): 683-9.
4. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III): Final Report. Bethesda, Md: National Heart, Lung, and Blood Institute; 2002. Disponible en: http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/atp3_full.pdf.
5. Guías ALAD de Diagnóstico y Control y Tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2. OPS. 2006.
6. Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY y col. abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2007; 116: 39-48.
7. Ryder E., Una Epidemia Global; El Síndrome Metabólico. Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo. 2005.
8. Montes de Oca E., Loría Castellanos J., Chavarría R. Prevalencia y factores de riesgo para el desarrollo del

- síndrome metabólico en personal médico de un servicio de urgencias. Instituto Mexicano del Seguro Social. Ciudad de México.
9. EUFIC. Consejo Europeo de Información sobre la alimentación. El Síndrome Metabólico y su relación con el estilo de vida, 2003.
 10. Lee DC., Sui X., Church TS., Lavie CJ., Jackson AS., Blair SN. Changes in fitness and fatness on the development of cardiovascular disease risk factors hypertension, metabolic syndrome, and hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2012 Feb 14; 59 (7) 665-72.
 11. Sociedad Española de Cardiología. Sección de Cardiología Preventiva y Rehabilitación
 12. Manual de Merk, de Información médica para el hogar, Cap 139-140. España 2005. Manual de Merk, en español, 8va. Edición.
 13. Acosta, Ana María y Escalona M. Síndrome Metabólico. Revisiones Marzo 2006.
 14. Revista Española de Cardiología. 2005; Cordero Alberto, Moreno José y Alegría Eduardo. Supl D:34-45. Volumen 5. Hipertensión Arterial y Síndrome Metabólico. España 2005.
 15. Bermúdez V. y col., Comportamiento epidemiológico del Síndrome Metabólico según las diferentes clasificaciones, en una población urbana de Venezuela. Centro de investigaciones Endocrino-Metabólicas "Dr. Félix Gómez", Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo 2008.
 16. Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo. Volumen 7 nro. 3 Mérida sep. 2009. Becerra Ana y col., Prevalencia del Síndrome Metabólico en la población urbana de Mucuchíes, Mérida-Venezuela. Julio-agosto 2007.
 17. Lozada Martha y col., Factores de Riesgo asociados al Síndrome metabólico en adolescentes. Departamento de salud Pública y de pediatría de la Universidad de Carabobo. Valencia 2007.
 18. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. 52da Asamblea General Edimburgo, Escocia, Octubre 2000. Disponible: <http://www.wma.net/s/policy/pdf/17c.pdf>. Méndez-Castellano H.
 19. Zavala Urzúa, Carlos. Diagnostico de Resistencia a la Insulina. Diabetologo del departamento de Medicina Interna, Clínica Las Conde, Chile 2005.

FRECUENCIA DE SENSIBILIZACION A ALIMENTOS Y AERO-ALERGENOS EN PACIENTES RECIBIDOS EN EL LABORATORIO DE CORPODIAGNOSTICA C.A DURANTE EL PERIODO 2010-2011.

Najm, Cristina¹; Camacho, Natacha¹; Guzmán, Jhonarly¹; García, Nirsén¹; Silva Noel¹

Recibido para publicación abril 2012. Aprobado para publicación septiembre 2012.

RESUMEN:

La alergia tipo I se ha definido como una reacción inmunológica adversa mediada por IgE que se produce después de una exposición repetida al alérgeno. La prevalencia de las alergias ha aumentado considerablemente en los últimos 20 años, lo que aumenta la necesidad del estudio de la respuesta a varios alérgenos. El objetivo fue evaluar la frecuencia de sensibilización a alimentos y aero-alérgenos en los pacientes referidos al Laboratorio de Corpodiagnostica C.A durante el periodo 2010-2011. Se determinó niveles de IgE específica a 2445 pacientes, usando el método inmunoblot in vitro RIDA® Allergy-screen (r-Biopharm, Alemania). La tasa de sensibilización total mediada por IgE específica a alimentos fue de 30,43 %, donde los alimentos más comunes fueron Leche, Queso, Trigo, Maíz y Cerdo; mientras que la tasa de sensibilización para aero-alérgenos fue de 46,16 %; de los cuales los más comunes fueron los ácaros mayores y *B. tropicalis*. Este estudio provee de una herramienta importante para la identificación de los alérgenos alimentarios y respiratorios de mayor prevalencia en la población venezolana.

Palabras Clave: IgE específica, alergia, sensibilización.

FREQUENCY OF SENSITIZATION FOR FOOD AND AERO-ALLERGENS IN PATIENTS RECEIVED IN A VENEZUELAN LABORATORY DURING 2010-2011 PERIOD.

SUMMARY

Type I Allergy had been defined as an adverse immunologic reaction mediated by IgE that occurs after a repeated exposure to the allergen. The prevalence of the allergies has increased considerably in the last 20 years, thus increasing the need of study the response to several allergens. The objective was to evaluate the frequency of foods and respiratory allergens sensitization in patients referred to Corpodiagnostica Laboratory (Caracas, Venezuela, ISO 9001:2008 certified laboratory) in the period that correspond from January 2010 to July 2011. We determined specific IgE levels to 2445 patients, by the in vitro RIDA® Allergy-screen immunoblot method (r-biopharm®, Germany). The total sensitization rate mediated by specific IgE to food allergen was 30,43%, where the foods most common were milk, cheese, wheat flour, corn and pork; while the sensitization for aero-allergens was 46,16%; the most common were the major mites and *B. tropicalis*. This study provides an important tool for the identification of food and aero-allergens with major prevalence in the Venezuelan population.

Key words: *specific IgE, allergie, sensitization.*

Solicitar copia a: Najm, Cristina, (labcalidad@corpodiagnostica.com)

¹Laboratorio de Corpodiagnostica C.A .Av. La Salle con Av. Lima. Torre Phelps Piso 8 Oficinas A y C. Urb Los Caobos. Plaza Venezuela, Caracas – Venezuela. Teléfonos: 0212-5168488 / 0500 2537442

Introducción.

Las alergias tipo I son enfermedades crónicas perturban notablemente la calidad de vida de los individuos afectados y predisponen a la aparición de otras enfermedades de gran importancia tales como el asma, neumonía, conjuntivitis, entre otros (1).

La prevalencia de las enfermedades alérgicas se ha duplicado en estos últimos veinte años. Así, por su repercusión económica sobre la salud pública, las enfermedades alérgicas se sitúan en el cuarto lugar mundial según la OMS. La alergia alimenticia es a menudo la primera manifestación de la alergia en la infancia. Predispone al desarrollo ulterior de la alergia respiratoria y de ahí, la importancia de su diagnóstico para implantar precozmente las medidas de prevención (2).

Al ser enfermedades crónicas, las Alergias afectan notablemente la calidad de vida del individuo afectado, causando gran cantidad de síntomas en el organismo, los cuales van desde dermatitis, rinitis, tos, entre otras, hasta la predisposición del individuo a otras enfermedades de mayor gravedad tales como neumonías, asma, choques anafilácticos, intolerancias alimenticias, y otros. Dentro de los distintos tipos de alergia descritos por la literatura, encontramos las denominadas tipo I, (sinónimos conocidos: atopia, anafilaxis y reacciones de hipersensibilidad inmediata mediadas por Inmunoglobulina E, IgE), las cuales han venido siendo estudiadas desde el siglo XIX (3).

En general, se han clasificado a las sustancias o alérgenos que generan este tipo de Alergias, como "Inhalantes o Alimentos", dependiendo de la vía de entrada que tengan al organismo, sin embargo, existen sustancias que pudiesen causar efectos a través de ambas vías. Ej. Los ácaros (4).

Los alimentos más estudiados capaces de producir alergias alimentarias son: leche de vaca, huevo de gallina, trigo, tomate, chocolate, maní, pescados, ostras y mariscos. Se estima que el 0,2 % de la población presenta síntomas de alergia a los alimentos. En USA el 5% de los menores de 3 años y el 1,5% de la población general (alrededor de 4.000.000) manifiesta síntomas de alergia a los alimentos (5).

La importancia de cada alimento varía con la edad: en el primer año de vida es común la alergia a las proteínas de la leche de vaca; en niños más grandes, puede sobrevenir alergia al trigo, el huevo y el pescado; mientras que en los jóvenes y adultos, a los frutos secos, las legumbres, los mariscos y las frutas. Se ha observado que con el paso del tiempo se desarrolla tolerancia a los alimentos. El 85% de los pacientes con alergia a la leche de vaca desarrolla tolerancia a los tres años de edad y sólo 50 a 60% puede tolerar el huevo en edad escolar (6).

En muchas partes del mundo, los ácaros de la familia Piroglyphyidae, género Dermatophagoides, constituyen más de 90% de los ácaros encontrados en las muestras de polvo doméstico y son la causa principal de alergia. Se estima que en áreas de clima tropical o subtropical la población está sensibilizada a los ácaros, aproximadamente de 59 a 61.7% para Dermatophagoides pteronyssinus, de 56.7 a 59.9% para Dermatophagoides farinae y de 40.7 a 54.7% para Blomia tropicalis. (7). En un estudio realizado con anterioridad se encontró que el 53.19% de los individuos estaban sensibilizados a los ácaros, 29.79% a los hongos y 19.15% de los individuos a ambos alérgenos (8).

Se ha determinado que los ácaros y hongos ambientales se desarrollan mejor en ambientes cerrados, húmedos, y con poca higiene tales como pudiesen ser algunas oficinas y hogares; por lo que investigar su sensibilización (IgE Específica) mediante métodos de diagnóstico in vitro en una población particular que posee síntomas sospechosos de alergias, podría contribuir con el diagnóstico correcto de la misma, e incidir finalmente en la elaboración de estrategias terapéuticas y de control que generen mejoras en sus síntomas y calidad de vida, así como un mejor entendimiento de la patología alérgica. Adicionalmente, hoy se conoce que su prevalencia ha venido incrementándose en los últimos años, especialmente en las zonas más desarrolladas (urbanas), a diferencia de lo que sucede con otras enfermedades que afectan a zonas rurales y/ o de menor desarrollo (8).

Las alergias tipo I a inhalantes por lo general se consideran el trastorno respiratorio crónico más frecuente en todo el mundo. La prevalencia de las enfermedades alérgicas en la infancia ha aumentado considerablemente en los últimos 20 a 30 años, por lo que la necesidad de realizar estudios de alergias se ha incrementado paralelamente. Diversos estudios han demostrado el papel de los alérgenos inhalados en la exacerbación de las enfermedades respiratorias, principalmente, el asma, tanto de los perennes (ácaros domésticos, insectos y descamaciones de animales) como de los estacionales (pólenes y hongos). Los ácaros del polvo se encuentran entre los alérgenos perennes más prevalentes en todo el mundo (9).

Partiendo de la necesidad de realizar estudios de prevalencia en aras de proveer herramientas para los especialistas que contribuyan al diagnóstico de alergia, el presente estudio tiene como objetivo evaluar la frecuencia de sensibilización a alimentos e inhalantes en pacientes sintomáticos, sin criterio de exclusión para edad o sexo, recibidos en el Laboratorio de Corpodiagnóstica, C.A referidos por un médico especialista durante el periodo 2010-2011.

Materiales y Métodos.

Población y Muestra.

Pacientes que acudieron al Laboratorio de Corpodiaagnostica, C.A provenientes de diferentes partes de Venezuela, principalmente Caracas.

La muestra consta de un total de 2445 pacientes, sin criterio de exclusión para edad o sexo, que acudieron al Laboratorio de Corpodiaagnostica, C.A durante todo el año 2010 y el primer semestre del año 2011 referidos como sintomáticos por un médico especialista.

Se realizaron determinaciones de IgE específica por el método inmunoblot in vitro RIDA AllergyScreen® de r-Biopharm, Alemania, el cual es un método utilizado en más de 60 países del mundo, evaluado adecuadamente por líderes de opinión en el área, (4) y para el cual el Laboratorio de Corpodiaagnostica, C.A., controla su calidad internamente y mediante la participación en un programa o esquema de control de calidad interlaboratorios organizado en el Reino Unido (U.K.), en donde participan más de 300 laboratorios especializados a nivel mundial, denominado UK NEQAS. (United Kingdom National External Quality Assessment Service).

Metodología para la prueba de IgE específica.

La prueba para determinación de IgE alérgeno-específica EAST se basa en una modificación no isotópica del método original de radio alergo absorbancia (RAST, sigla en inglés de Radio Allergo Sorbent Test), y permite la determinación simultánea en un paciente de los niveles de IgE contra varios alérgenos específicos. Se obtienen resultados cuantitativos usando un sistema de clasificación similar al utilizado en las pruebas RAST. Todos los paneles de alérgenos de las pruebas EAST incorporan controles internos que evalúan el rendimiento del ensayo y compensan la unión no específica en la muestra de suero del paciente. El ensayo a utilizar específicamente es el método de inmunoblot in vitro RIDA® Allergy Screen, el cual está diseñado para la determinación semi-cuantitativa o cualitativa de inmunoglobulinas de tipo IgE alérgeno-específicas en el suero humano (4) para el diagnóstico in vitro. Se trata de un inmunoensayo enzimático con membrana de nitrocelulosa (inmunoblot) para la identificación semi-cuantitativa de anticuerpos específicos IgE contra un panel de alérgenos individuales en suero humano, en clase EAST (Enzymo Allergy Sorbent Test). En la superficie de membranas de nitrocelulosa están unidos los alérgenos correspondientes a la composición del panel. Los anticuerpos IgE alérgeno-específicos presentes en muestras de suero de pacientes se unen a los antígenos y en un segundo paso se agregan los anticuerpos antihumanos IgE acoplados a biotina. Durante el tercer paso de incubación se produce la unión

de la biotina a la estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina. La enzima convierte el sustrato incoloro (BCIP/NBT) en un producto final azul violáceo. La intensidad de la coloración azul es proporcional a la cantidad de anticuerpos alérgeno-específicos en el suero. La lectura de los paneles se realizan con el programa RIDA® X-Screen, obteniéndose resultados semi-cuantitativo en el sistema 6 clases EAST y en concentración en Unidades Internacionales por mililitro (IU/mL). El método fue validado en Alemania, siendo los resultados de la validación del método los siguientes: (4)

Comparación con el método de referencia (IgE):

Sensibilidad: 84.3%
Especificidad: 95.0%
Exactitud: 90.6%

Comparación con el skin-prick test (prueba de piel):

Sensibilidad: 95.1%
Especificidad: 80.2%
Exactitud: 88.3%

Análisis Estadístico.

Para los fines de este trabajo utilizamos el cálculo de tasa de sensibilización, la cual se estima con la siguiente fórmula:

$$Ts = Ct/Nt$$

Ct= número de pacientes sensibilizados.

Nt= número total de individuos en la población en ese momento o edad determinados.

Resultados

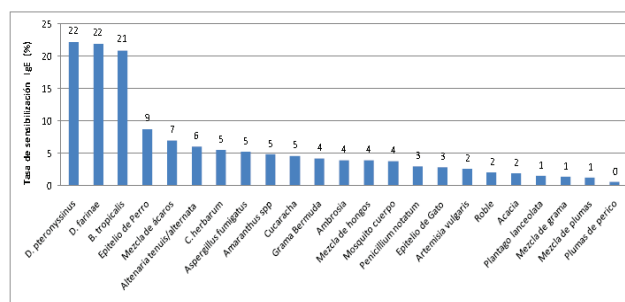


Figura N° 1. Tasa de sensibilización para IgE específica a aero- alérgenos (n= 1042)

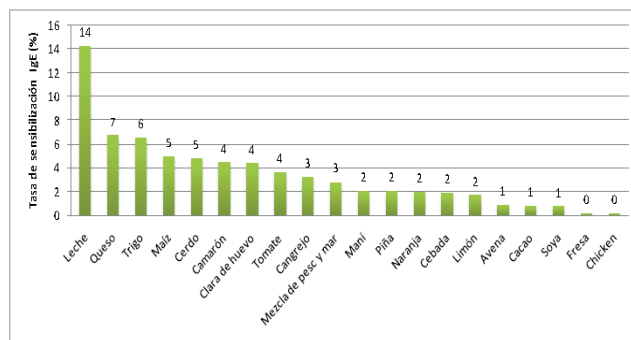


Figura N° 2. Tasa de sensibilización para IgE específica a alimentos (n= 1403)

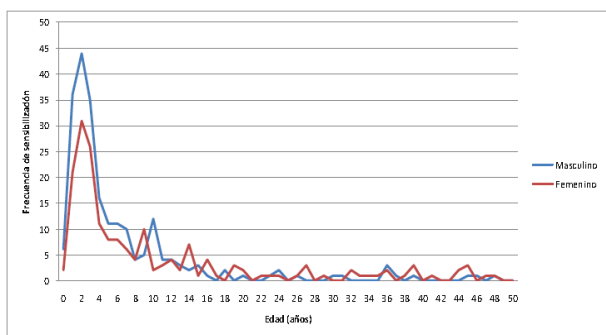


Figura N° 3. Frecuencia de sensibilización para IgE específica a alimentos según edad y sexo (n=427)

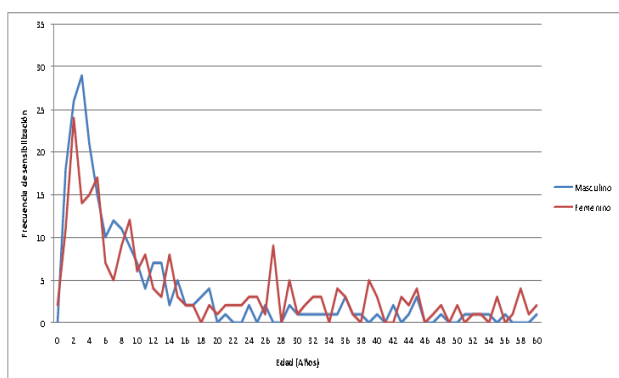


Figura N° 4. Frecuencia de sensibilización para IgE específica a aero-alérgenos según edad y sexo (n= 481)

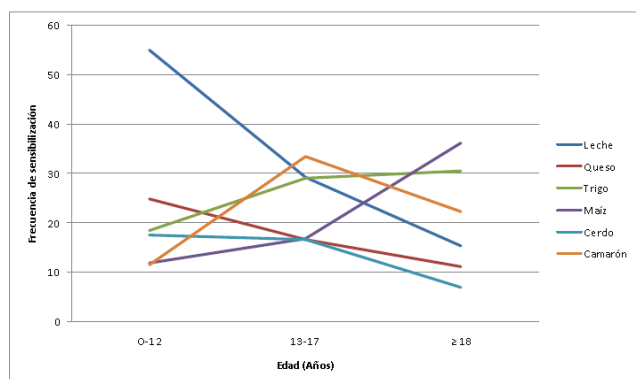


Figura N° 5. Frecuencia de sensibilización para IgE específica a alimentos por grupos etarios (n=427)

Discusión.

En algunos estudios poblacionales, la prevalencia acumulada de enfermedades alérgicas en la niñez es del 25-30%, de este porcentaje la dermatitis atópica representa el 15-20%, el asma el 7-10% y la rinitis y conjuntivitis alérgicas el 15-20% (9).

En este estudio, el porcentaje de la tasa de sensibilización total mediada por IgE específica a alimentos, para los 1403 pacientes recibidos con síntomas de alergias en el Laboratorio de Corpodiagnostica, C.A. fue de 30,43 %; de los cuales los alimentos más comunes fueron Leche (14%), Queso (7%), Trigo (6%), seguido de Maíz y Cerdo (5% cada uno) y Camarón, Clara de Huevo y Tomate (4% cada uno), entre algunos otros con un porcentaje mucho menor.

Entre Enero de 2002 y Enero de 2006 se reportó una revisión 3105 historias clínicas del Servicio de Gastroenterología Pediátrica del Hospital de Especialidades de Maracaibo, Venezuela, con diagnóstico de alergia alimentaria. Se encontraron 421 casos, con una prevalencia del 13.5% (10).

La tasa de sensibilización para aero-alérgenos fue de 46,16 % de un total de 1403 pacientes; de los cuales los más comunes fueron los ácaros mayores y *B. tropicalis*, el 22% corresponde a *Dermatophagoides pteronyssinus*, otro 22% a *Dermatophagoides farinae*, 21% a *Blomia tropicalis*, seguido de epitelio de perro y hongos ambientales. Los ácaros, a diferencia del resto de los alérgenos respiratorios y evaluados en este estudio, tienen un nivel de respuesta en los pacientes mayor, es decir las concentraciones y clasificación según la FDA (Food and Drugs Administration) (11) de IgE específica es más elevada lo que puede deberse a la tasa de exposición al alérgeno, su capacidad antigénica, el tipo de antígeno, la pureza del extracto utilizado en la metodología para el diagnóstico, así como también la reactividad cruzada que puede haber entre alérgenos de ácaros de especies diferentes (7). El cruce antigénico puede ocurrir entre otros alérgenos, como es el caso de los de la reactividad cruzada que se presenta entre los epitelios de algunos animales (12).

En países latinoamericanos, en los que las estaciones del año están claramente diferenciadas (Argentina, Chile y Uruguay), los síntomas suelen mantener un patrón compatible con la clásica alergia estacional; en cambio, cuando predominan los climas tropicales y subtropicales la estación de polinización suele ser más larga y, como consecuencia de la más extensa exposición natural a los pólenes, los síntomas permanecen durante periodos más prolongados. Los alérgenos más comúnmente hallados en la región son los de los ácaros del polvo doméstico, los cuales conforman una fauna muy rica y variada. En el polvo doméstico de distintos lugares de

Latinoamérica se han identificado: *Dermatophagoides pteronissynus*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia tropicalis*, entre otros. Todos estos alérgenos de ácaros son potencialmente sensibilizantes y la mayoría de niños y adultos con rinitis y asma tienen pruebas cutáneas positivas a extractos de ácaros (13).

En este estudio se evidenció que la tasa de sensibilización mediada por IgE específica tanto para alimentos como aero-alérgenos es mayor en el sexo masculino que en el femenino en edad infantil, sin embargo la población adulta evaluada no representa un número significativo para discernir este comportamiento. Este hallazgo se correlaciona con lo reportado en estudios anteriores, sin embargo existen discrepancias al respecto (14, 15)

La frecuencia de sensibilización para leche es la más alta evidenciada en este estudio, observándose una disminución constante a medida que se incrementa la edad en la población estudiada. Esto podría explicarse por el grado de exposición a este alérgeno, ya que la Leche es introducida en la dieta desde el nacimiento; así como también por su eliminación en la rotación de alimentos una vez evidenciada dicha sensibilización por pruebas in vivo e in vitro.

A diferencia de la Leche, se obtuvo que la sensibilización al Maíz y Trigo se incrementa constante y progresivamente, a medida que aumenta la edad en la población estudiada, sin embargo, es el Maíz el alérgeno que evidencia un incremento más pronunciado después de la adolescencia.

Conclusiones

Este es el primer estudio con una muestra considerable (2445) que provee una referencia nacional de los alimentos y aero-alérgenos más comunes en Venezuela, por metodologías in vitro validadas por programas de control de calidad externo (Ej. UK NEQAS) lo cual garantiza valides y exactitud de los resultados.

La tasa de sensibilización total mediada por IgE específica a alimentos, fue de 30,43 %, se obtuvo que los alérgenos más comunes fueron Leche, Queso, Trigo, Maíz y Cerdo, entre algunos otros con un porcentaje mucho menor.

La tasa de sensibilización para aero-alérgenos fue de 46,16 %; de los cuales los más comunes fueron los ácaros mayores y *B. tropicalis*, seguido de epitelio de perro y hongos ambientales.

La tasa de sensibilización mediada por IgE específica tanto para alimentos como aero-alérgenos es mayor en el sexo masculino que en el femenino en edad infantil, sin embargo la población adulta evaluada no representa un número significativo para discernir este comportamiento.

La frecuencia de sensibilización para maíz y trigo se

incrementa con la edad, mientras que para la leche disminuye.

Este estudio provee de una herramienta importante para la selección de los alérgenos potenciales asociados a alergias alimentarias y respiratorias en la población venezolana.

Recomendaciones

Más investigaciones son necesarias para evaluar el impacto de la sensibilización a alimentos y aero-alérgenos, especialmente en niños.

Calcular la tasa de sensibilización de acuerdo a la edad para determinar si los especialistas deberían considerar la edad para la interpretación de los resultados.

El diagnóstico del laboratorio debería realizarse por medio de paneles para incluir aquellos pacientes alérgicos poli-sensibilizados.

Referencias Bibliográficas.

1. Allergies in UK among highest prevalence in the world costing £1bn annually [en línea], 14 Apr 2004, [Acceso 15 de Febrero de 2012], Disponible en: <http://www.medicalnewstoday.com/articles/7256.php>.
2. Traube C, Ardelean-Jab D, Grimfeld A, Just J. La alergia alimenticia del niño. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 2004; 38 (3): 319-27.
3. Roitt Ivan. *Inmunología Fundamentos*. 9a Ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2000.
4. Sánchez-Borges M, Suárez-Chacón R, Capriles-Hulett A, Caballero-Fonseca F. Ingestión de ácaros: Anupdate on oral anaphylaxis from mite ingestion. *Annals of allergy, asthma, & immunology*. 2005; 94(2):216-221.
5. Bassan N, Vinuesa M, Roma S, et al. Modelo biológico para la detección de antígenos alimentarios. *ALAN*. 2002; 52(3): 249-256.
6. Rodríguez-Ortiz P, Muñoz-Mendoza D, Arias-Cruz A, González- Díaz S, Herrera-Castro D, Vidaurri-Ojeda A. Características epidemiológicas de pacientes con alergia a alimentos atendidos en el Centro Regional de Alergias e Inmunología Clínica de Monterrey. *Revista Alergia México* 2009; 56(6):185-91
7. Martínez N., Aguilar D. y col. Prevalencia de la sensibilización a *Blomia tropicalis* y *Dermatophagoides pteronyssinus*, *farinae* y *siboney* en pacientes con rinitis o asma alérgica (o ambas) en una población de la zona metropolitana de la Ciudad de México. *Revista Alergia México* 2010; 57(1): 3-10.
8. Monterrey C., Silva Y., y col. Prevalencia de sensibilización

- hacia ácaros y hongos en trabajadores con alergia Tipo I. Acta Científica de Bioanalistas Especialistas 2007; 10 (2): 73-85.
9. Estudio Internacional de Asma y Alergia en la Infancia. (Estudio ISAAC en línea). [Fecha de acceso: 4 de abril de 2011]. Disponible en: <http://www.respirar.org/isaac/index.htm>.
 10. Barboza F. Aspectos Clínicos de Alergia Alimentaria. Revista Gastrohnap 2009; 11 (3) 167.
 11. Food and Drug Administration USA. Radioalergosorbente Test (RAST) Methods for Allergen-Specific Immunoglobulin E (IgE) 510(k)s. Final Guidance for Industry and FDA. 2001.
 12. Spitzauer S., Pandjaitan B., y col. Major cat and dog allergens share IgE epitopes. The Journal of Allergy and Clinical Immunology 1997; 99 (1): 100-106.
 13. Baena C., Lockey R., y col. Inmunoterapia en América Latina. Del pasado al futuro. Revista Alergia México 2008; 55 (1): 33-37.
 14. The Quest Diagnostics. Allergies Across America. The largest study of allergy testing in the United States. Health Trends. Allergy Resport 2011.
 15. Kelly C, Gangur V. Sex Disparity in Food Allergy: Evidence from the PubMed Database. J Allergy (Cairo). 2009; 2009:1-7.

POLIMORFISMO DE LOS GENES C677T DE LA ENZIMA METIL-N-TETRAHIDROFOLATO REDUCTASA, A2756G DE LA ENZIMA METIONINA SINTASA Y A66G DE LA ENZIMA METIONINA SINTASA REDUCTASA Y SU RELACIÓN CON LA HOMOCISTEÍNA EN PACIENTES CON ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

M^a Fátima Garcés¹, Hilda Stekman¹, Gustavo Martínez¹, Leonela Dokmaji¹, Adriana Rivas², Noel Silva¹, Mercedes Cerviño³, Celsy Hernández¹, Francisco Hernández¹

¹Facultad de Medicina. Escuela de Bioanálisis, Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas, Universidad Central de Venezuela, Caracas. ²Licenciado en Bioanálisis. Clínica Santiago de León, Caracas. ³Facultad de Medicina. Escuela de Enfermería. Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas, Universidad Central de Venezuela, Caracas.

Recibido para publicación junio 2012. Aprobado para publicación septiembre 2012.

RESUMEN:

La Hiperhomociteinemia (HHcy) se considera como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de aterosclerosis y de enfermedad arterial coronaria (EAC). Los polimorfismos en las enzimas involucradas en la regulación del metabolismo de la Hcy como la metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR), metionina sintasa (MTR), y la metionina sintasa reductasa (MTRR) pueden contribuir a la variación de los niveles de homocisteína en plasma (Hcy). Objetivo: En este estudio investigamos la asociación de los polimorfismos genéticos de las enzimas involucradas en la remetilación de la homocisteína: metionina sintasa (MTR), metil N-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y metionina sintasa reductasa (MTRR), con los niveles de Hcy en pacientes con EAC y sujetos sanos. Población: 136 individuos de los cuales 90 presentaron diagnóstico de enfermedad cardiovascular (IAM y ACV) y 46 eran aparentemente sanos (controles). Resultados: La concentración de Hcy fue significativamente más alta en pacientes con ECV que en los sujetos control ($P < 0,001$). HHcy ($> 15 \mu\text{mol/L}$) confirió un RR de IAM de 2.52 (95% IC: 1.4-4.4, $P < 0,001$) y de ACV de 1.88 (95% IC: 1.0-3.5, $P < 0,05$). Los niveles de vitamina B12 y folato se encontraba en el rango de los valores de referencia en el 86% de los individuos. La frecuencia del alelo T para C677T de MTHFR, del alelo G para A66G de MTRR y del alelo G para A2756G de MTR fueron 0.31, 0.30, 0.22 respectivamente para los sujetos casos. Los polimorfismos C677T, A66G y A2756G de los genes MTHFR, MTRR y MTR no tuvieron diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de casos con respecto al grupo control. Los polimorfismos estudiados no se relacionaron estadísticamente con la HHcy en los individuos en estudio. Conclusión: Sugerimos que HHcy confiere riesgo para ECV. En nuestro estudio encontramos evidencias de que la regulación de Hcy es poligénica.

Palabras claves: Hcy, polimorfismos, ECV, HHcy

C677T GENE POLYMORPHISM OF THE ENZYME N-METHYL-TETRAHYDROFOLATE REDUCTASE, A2756G GENE POLYMORPHISM OF THE ENZYME METHIONINE SYNTHASE AND A66G GENE POLYMORPHISM OF METHIONINE SYNTHASE REDUCTASE AND ITS RELATIONSHIP WITH HOMOCYSTEINE IN PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR DISEASE

SUMMARY

The Hiperhomocysteinemia (HHcy) is considered an independent risk factor for developing atherosclerosis and cardiovascular arterial disease (CAD). The polymorphisms of the enzymes involved in the regulation of homocysteine (Hcy) metabolism as the methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR), methionine synthase (MTR) and methionine synthase reductase (MTRR) may contribute to the elevation of Hcy in plasma. Aim: The main aim of this study was to investigate the association of genetic polymorphisms of the enzymes involved in remethylation of homocysteine: methionine synthase (MTR), N-methyl tetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR), with levels of Hcy in patients with CHF and healthy subjects. Population: 136 subjects of whom 90 had a diagnosis of cardiovascular disease (heart failure and stroke) and 46 were apparently healthy (controls). Results: The concentration of Hcy was significantly higher in patients with cardiovascular disease than compare with the control group ($P < 0.001$). HHcy ($> 15 \text{ mmol / L}$) conferred a relative risk (RR) of heart failure of 2.52 (95% CI: 1.4-4.4, $P < 0.001$) and stroke, RR of 1.88 (95% CI: 1.0-3.5, $P < 0.05$). The levels of vitamin B12 and folate was in the range of reference values in 86% of subjects. The frequency of the T allele of MTHFR C677T was 0,31, for the G allele of MTRR A66G was 0,30 and for the G allele for MTR A2756G was 0.22 for the subjects with heart failure and stroke referred as cases. C677T polymorphism, A66G and A2756G of the genes MTHFR, MTRR and MTR had no statistically significant difference between the case group compared to control group. The polymorphisms studied were not associated statistically with HHcy in the subjects of the study. Conclusion: We suggest that HHcy confers risk for CVD. In our study we found evidence that the regulation of Hcy is polygenic

Key words: Hcy, polymorphism, cardiovascular disease, HHcy.

Solicitar copia a: Dra. María Fatima Garcés Da Silva (mariafatimagarcés@hotmail.com)

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), son un asesino silencioso que está aumentando específicamente en la población urbana debido a los enormes cambios en sus hábitos y en la forma de vida. Así, cualquier intervención que pueda reducir los riesgos de las ECV podrían tener un enorme impacto en salud pública. Se han identificado varios factores de riesgo que se asocian con las ECV que, comúnmente cuando se combinan, interactúan creando un ambiente proaterogénico. Estos factores de riesgo son: edad avanzada, sexo masculino, fumar, hipertensión, antecedentes familiares positivos, hiperlipidemia, diabetes, y resistencia de insulina. A pesar de los continuos avances científicos, los factores de riesgo establecidos no explican completamente la ocurrencia de eventos cardiovasculares: cerca del 30% de las ECV no se pueden explicar por factores de riesgo convencionales.

La homocisteína (Hcy) se ha identificado como un factor de riesgo para la ECV. Varios estudios caso-control han demostrado que los pacientes con ECV tienen concentraciones de homocisteína 30% más elevadas que los sujetos controles (1)(2). En estudios con un diseño anticipado, la asociación de hiperhomocisteinemia (HHcy) con enfermedad vascular es más débil; sin embargo, es estadísticamente significativa en la mayoría de los casos. Sin embargo, actualmente, no se sabe si la homocisteína es una causa primaria de la aterosclerosis (3,4) o si es solamente un marcador secundario de la enfermedad vascular (5).

Los niveles de homocisteinemia están determinados por factores genéticos y/o adquiridos. El efecto directo de uno o varios de estos determinantes o la interacción entre los mismos puede provocar HHcy. Entre las causas genéticas que elevan los niveles plasmáticos de Hcy se han descrito algunas alteraciones moleculares en las enzimas involucradas en el metabolismo del aminoácido, fundamentalmente en el gen de la cistationina β -sintetasa (CBS), de la metionina sintasa reductasa (MTRR), de la metil-N tetrahidrofolato reductasa (MTHFR), y de la Metionina Sintasa (MTR) (6). Los principales factores adquiridos que regulan la homocisteinemia son el nivel vitamínico (ácido fólico, vitamina B12, B6 y B2), la presencia de algunas patologías (falla renal, enfermedades gastrointestinales, neoplasias, psoriasis, etc), uso de ciertas drogas (metotrexato, fenitoína, teofilina) y hábitos de vida tales como el consumo de cigarrillos, alcohol, café, etc. (7). Clásicamente el rango de referencia para la concentración plasmática de Hcy oscila entre 5 y 15 $\mu\text{mol/L}$ (8,9).

La Metil N- tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) es una enzima reguladora del metabolismo de la Hcy, la cual es necesaria tanto para el metabolismo del tetrahidrofolato como en la síntesis de las purinas, ADN y ARN. Esta

enzima cataliza la reducción del 5,10- Metil-N-tetrahidrofolato a 5- Metil tetrahidrofolato, esta última es la forma predominante en circulación del folato y además participa como donador de carbonos para la remetilación de homocisteína a metionina (10).

La Metionina sintasa reductasa (MTRR) es una enzima que mantiene los niveles adecuados de cobalamina activada, coenzima de la metionina sintasa (MTR), la cual actúa como intermediario de grupos metilo entre el metiltetrahidrofolato y la Hcy durante la remetilación catabolizada por la MTR de homocisteína a metionina. La MTRR cataliza la metilación reductiva de la cobalamina II a metil-cobalamina III, usando S-adenosilmetionina como donador de grupos metilo.

Una variante común de la MTRR, A66G, fue recientemente identificado por Gaughan y col en el 2001, en pacientes homocisteinúricos con deficiencia de esta enzima (11).

La Metionina sintasa (MTR), una enzima dependiente de vitamina B12, participa también en la vía metabólica de la homocisteína, catalizando la remetilación de homocisteína a metionina usando un grupo metil donado por 5-metiltetrahidrofolato.

Actualmente se sabe que existen polimorfismos genéticos asociados con este gen, el cual produce deficiencias moderadas de la actividad de la enzima MTR y que en conjunto con otros polimorfismos, como el C677T de la enzima MTHFR, con los niveles de folato y vitamina B12, influyen en los aumentos de la concentración de homocisteína y la relación con enfermedades cardiovasculares (12,13).

En esta investigación, medimos los niveles del Hcy y determinamos tres polimorfismos comunes: el polimorfismo C677T del gen de MTHFR, el polimorfismo A2756G del gen de MTR, y el polimorfismo de A66G del gen de MTRR con el objetivo de evaluar la posible relación entre los niveles de Hcy y la ECV para así determinar la importancia de la influencia genética de los niveles de Hcy y la ECV.

Materiales y Métodos

Población de Estudio.

La población estudiada estuvo conformada por 136 sujetos con edades comprendidas entre 18 y 80 años de edad, de ambos sexos, de estos, 46 fueron controles (asistieron al laboratorio de Ciencias Básicas y Aplicadas de la Escuela de Bioanálisis en la UCV) y 90 casos de los cuales 35 fueron diagnosticados de IAM y 55 con ACV en la Unidad de Cuidados Coronarios del Hospital Dr. Domingo Luciani y del Servicio de Neurología del Hospital Universitario Clínico en Caracas, Venezuela y conto con la previa aprobación del Comité de Ética

de dichos centros y el consentimiento informado de los participantes. Además, fueron recolectados datos personales, antecedentes familiares, hábitos y antecedentes personales e información terapéutica de cada sujeto.

Obtención de la muestra.

A cada individuo, después de 12 horas de ayuno, se le extrajo una muestra de sangre venosa, recolectada en un tubo sin anticoagulante y un tubo con anticoagulante (EDTA), con el fin de realizar determinaciones bioquímicas y estudios moleculares. Las muestras de sangre sin anticoagulante fueron centrifugadas a 3.000 rpm durante 15 min a 20°C para obtención de suero. Los sueros fueron almacenados a -70°C hasta su procesamiento.

Determinación de Homocisteína, Folato y Vitamina B12 en el suero.

La medición de la concentración de homocisteína se realizó por un kit de inmunoensayo ligado a enzima (Axys), las determinaciones de folato se realizaron por electroquimioluminiscencia (Modular Systems, Roche) y la vitamina B12 por quimioluminiscencia mediante una reacción de unión competitiva al factor intrínseco biotinilado (VITROS, Johnson & Johnson).

Análisis Genético.

Para el estudio genético realizado, se obtuvo ADN genómico utilizando el método de Bunce modificado, que utiliza lavados y centrifugaciones subsecuentes, además de precipitación con cloroformo y deshidrataciones con etanol, para luego resuspender el ADN en búfer TE. Posteriormente se cuantificó y se verificó la pureza del ADN extraído en un biofotómetro de eppendorf y se procedió a la amplificación de un fragmento de 198 pb del gen de MTHFR (Primer Forward: 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3' y Primer Reverse: 5'-AGGACGGTGCAGTGCAGAGTG-3'). (Frosst y col) (16), uno de 118 pb de gen de MTRR (Primer Forward: 5'-GCAAAGGCATCGCAGAAGACAT-3' y Primer Reverse: 5'-AAACGGTAAAATCCACTGTAACGGC-3') (Leclerd y col)(21) y otro de 265 pb del gen de MTR (Primer Forward:

5'-GGTGTGTTCCCAGCTGTTAGATG-3' y Primer Reverse:

5'-GACTGAAGACCTCTGATTTGAAC-3') (Wilson y col) (20) mediante reacción de cadena polimerasa (PCR) empleando el Termociclador modelo Lab Cycler de Senso Quest. El producto amplificado se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% el cual se tiñó con bromuro de etidio. Los fragmentos de ADN una vez amplificados fueron sometidos a una

reacción de digestión enzimática, empleando las enzimas Hinf I, Nsp I y Hae III (Promega) para los polimorfismos C677T de la enzima MTHFR, A66G de la enzima MTRR y A2756G de la enzima MTR respectivamente. La caracterización de los productos digeridos se llevó a cabo realizando una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% y posterior tinción con nitrato de plata.

Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como media \pm una desviación estándar ($X \pm DS$), se empleó el programa Excel 5.0 (Copyright MicrosoftOffice, Washington, USA) para estadística descriptiva. Las comparaciones entre variables se hicieron empleando la prueba "ANOVA", se consideró estadísticamente significativo valores de $p < 0,05$.

Se usaron tablas de contingencia simple, evaluando la asociación entre las variables en estudio y los alelos de MTHFR, MTRR y MTR por Chi2 y odds ratio. Se emplearon pruebas de ANOVA para determinar las relaciones entre alelos de los tres genes estudiados y la enfermedad. Significancia estadística fue aceptada al tener una $p < 0,05$. Los resultados son presentados en tablas con la distribución por genotipos de MTHFR, MTRR y MTR en los grupos estudiados.

Resultados

La tabla 1 muestra los niveles de homocisteína total, folato y vitamina B12. Un hallazgo importante es que la media de los valores de vitamina B12 y folato fue mayor en los individuos denominados casos que los controles. Los valores homocisteína de los individuos casos IAM y ACV fueron significativamente mayores que en los individuos controles ($p < 0,001$); al igual que los niveles de folato también fueron significativamente mayores en casos IAM y ACV ($p < 0,001$ y $p < 0,01$ respectivamente). Sin embargo los niveles de vitamina B12 fueron muy similares en los tres grupos.

Por otra parte, con respecto a los niveles de homocisteína, se obtuvo un Riesgo Relativo (RR) para los sujetos de los grupo casos IAM y ACV de 2,52 y 1,88 respectivamente en relación a los individuos controles demostrándose que la homocisteína es un factor de riesgo cardiovascular independiente para padecer EAC (Tabla 2).

Se realizó la genotificación de los distintos polimorfismos en los individuos en estudio, obteniéndose que los genotipos que presentaron susceptibilidad a producir EAC fueron TT y CT del gen de MTHFR, AA y AG del gen de MTRR y AA y AG del gen de MTR, aunque estos resultados no tienen significancia clínica (Tabla 3). Se observó

Tabla 1. Valores Bioquímicos de los individuos estudiados

	Casos IAM (n=35)	Casos ACV (n=55)	Controles (n=46)	Valor de Referencia
Homocisteína (µmol/L)	14,32 ± 8,66***	14,69 ± 9,17***	11,03 ± 3,56	0 – 15
Vitamina B12 (pg/mL)	461 ± 300	478 ± 294	446 ± 209	239 – 931
Folato (ng/mL)	5,83 ± 6,21***	5,45 ± 5,95**	4,08 ± 2,30	3,1 – 20,0

Tabla 2. Riesgo relativo (RR) de los sujetos Casos IAM y ACV en relación a los controles.

Grupo	HHcy	Normal Hcy	RR	Chi2	p
Casos IAM	23	12	2,52 (1,42 – 4,44)	12,720	<0,001
Casos ACV	27	28	1,88 (1,05-3,54)	5,592	0,018
Controles	12	34	0,46 (0,28 – 0,76)		<0,001

Tabla 3. Comparación de Genotipos de MTHFR C677T, MTRR A66G, MTR A2756G entre casos y controles.

GEN		Casos	Controles	OR (IC 95%)	Chi2	p
MTHFR	Genotipo TT	8	3	1,56 (0,33 – 8,30)	0,383	0,536
	Genotipo CT	38	16	1,39 (0,60 – 3,23)	0,703	0,402
	Genotipo CC	41	24	0,64 (0,12 – 3,05)		0,536
MTRR	Genotipo AA	39	14	2,32 (0,51 – 10,61)	1,582	0,208
	Genotipo AG	40	17	1,96 (0,44 – 8,70)	1,029	0,310
	Genotipo GG	6	5	0,431 (0,09 – 1,97)		
MTR	Genotipo AA	41	20	1,36 (0,14 – 11,32)	0,108	0,742
	Genotipo AG	24	14	1,14 (0,11 – 10,10)	0,019	0,891
	Genotipo GG	3	2	0,73 (0,09 – 6,90)		

Tabla 4. Comparación de valores de Homocisteína entre grupos casos vs controles según el genotipo de los genes de MTHFR, MTRR y MTR.

Genotipos		Valores de Hcy (X ± DS) µmol/L	
		Casos	Controles
MTHFR	CC	14,55 ± 9,15**	10,41 ± 3,31
	CT	14,46 ± 9,01*	10,96 ± 3,57
	TT	14,43 ± 9,12	10,26 ± 3,41
MTRR	GG	14,52 ± 9,37	10,58 ± 3,28
	AG	14,61 ± 9,12***	10,77 ± 3,59
	AA	14,34 ± 9,04	10,67 ± 3,47
MTR	GG	13,95 ± 8,35	10,31 ± 2,08
	AG	14,35 ± 8,78*	10,66 ± 3,44
	AA	14,32 ± 8,55*	10,57 ± 3,38

Las variables son presentadas como la media ± DS; * p < 0,05 comparado con el grupo control; ** p < 0,01 comparado con el grupo control; *** p < 0,001 comparado con el grupo control.

que los valores de homocisteína de los casos para cada genotipo de los polimorfismos estudiados en los individuos casos fue mayor en comparación con los individuos controles. Siendo significativos los valores de los genotipos CC y CT de la enzima MTHFR, AG de la enzima MTRR y AG y AA de la enzima MTR (Tabla 4). Las frecuencias alelicas que se obtuvieron en nuestro estudio fueron reportados en la Tabla 5.

Discusion

La homocisteína es un factor de riesgo cardiovascular con evidencias sustanciales provenientes de investigaciones remontadas desde hace ya varios años, donde se demuestra que es una variable de tipo independiente en relación a los otros factores de riesgo comunes, es decir, que el aumento de su concentración en suero es aceptado como una causa quizás no del total de los casos, pero

Tabla N°5. Frecuencia alélicas de los polimorfismos C677T, A66G y A2756G de los genes MTHFR, MTRR y MTR respectivamente en Casos y Controles.

Alelos	Casos (n=87)	Controles (n=43)
MTHFR C677T		
Alelo C	0,689	0,774
Alelo T	0,311	0,226
MTRR A66G		
Alelo A	0,694	0,625
Alelo G	0,306	0,375
MTR A2756G		
Alelo A	0,779	0,750
Alelo G	0,221	0,250

si en parte del desarrollo de algunos de ellos como en casos de enfermedad cardiovascular en pacientes donde existan dislipidemias, hipertensión u otros factores de riesgo comunes conocidos (10). Las variaciones en los niveles de dicho aminoácido están influenciadas por los niveles de folato, vitamina B2, B6 y B12 del individuo y/o por las mutaciones genéticas de las enzimas de la vía metabólica de la metionina como la MTHFR, MTRR y MTR. Además los factores dietéticos ya que son de gran importancia, debido a que la homocisteína proviene del metabolismo hepático de la metionina, y la principal fuente de metionina es la ingesta de proteínas de origen animal (14).

El polimorfismo C677T de la enzima MTHFR se ha descrito como un factor determinante en la concentración de homocisteína en sangre, por lo que también es influyente en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, siendo el alelo T el que se asocia con niveles elevados de homocisteína. En nuestro estudio se evidenció que el alelo T (representado por los genotipos TT y CT) se halló en mayor frecuencia en los sujetos casos en comparación con los sujetos controles lo cual indica que existe cierta susceptibilidad para el padecimiento de las EAC por la presencia de los genotipos nombrados anteriormente, aunque estos resultados no tuvieron significancia [OR = 1,6 (CI 95%: 0,3 – 8,3 (p>0,05)]. Resultados mucho más elevados han sido reportados para la mutación homocigota de la enzima MTHFR (Genotipo TT) en pacientes con enfermedad cardiovascular prematura, pero con una significancia clínica [OR = 3,1 (CI 95% 1,0 – 9,2)] (15).

También se encontró una susceptibilidad clínica del alelo T a la hiperhomocisteinemia, debido a que este alelo tuvo una mayor frecuencia de individuos con HHcy en comparación con los portadores del alelo C, [OR= 2,3

CI 95%: 0,3 – 19,2 (TT vs CC) p >0,05]. Estos resultados se asemejan a los obtenidos en otra investigación en la que demostraron que los individuos en el genotipo TT presentaron el doble de las concentraciones de homocisteína en comparación a individuos sanos (16).

En cuanto al polimorfismo A66G de la enzima MTRR, los genotipos AA y AG representan cierto grado de relación con el padecimiento de las enfermedades cardiovasculares estudiadas (ACV e IAM) ya que se obtuvo un OR de 2,3 (CI 95%: 0,5 – 10,6) y 1,96 (CI 95%: 0,4 – 8,7) en los individuos casos con el genotipo AA y AG respectivamente. Sin embargo estos valores no son estadísticamente significativos (p>0,05). Resultados similares fueron observados en otro estudio, en donde obtuvieron un OR de 1,92 (CI 95%: 1,3 – 2,9) en relación con padecer EAC (17).

En nuestro estudio, el polimorfismo A2756G de la enzima MTR la presencia del alelo G, pero únicamente en su forma homocigota (GG), se relaciono con niveles de homocisteína en la sangre elevados [OR=2,3 (CI 95%: 0,2 – 64,0)], aunque este valor no tuvo significación estadística. Estudios similares a nuestra investigación reportan al alelo G como causante de hiperhomocisteinemia (p= 0.008) (18,19).

La frecuencia en el polimorfismo C677T del gen de MTHFR para el alelo C y para el alelo T en la población sana (controles) fue de 0,774 y 0,226 respectivamente, comparable con la frecuencia alélica obtenida en otras investigaciones en sujetos de los países bajos (0,756 para el alelo C y 0,243 para el alelo T) (15). En cuanto al polimorfismo A66G de la enzima MTRR, los sujetos controles presentaron la siguiente frecuencia alélica: 0,625 para el alelo A y 0,375 del alelo G. En otras investigaciones se halló que la frecuencia del alelo G fue de 0,443 en población masculina de Irlanda del Norte (11). Los controles de nuestro estudio presentaron una frecuencia alélica de 0,750 para el alelo A del polimorfismo A2756G de la enzima MTR que al compararlo con otro estudios, fue menor, ya que ellos reportan una frecuencia del alelo A de 0,890 en población coreana sana y una frecuencia de 0,810 en la población americana (12).

Agradecimientos

El proyecto fue financiado por la Coordinación de Investigación, Medicina, UCV. Agradecemos al Laboratorio de Producción y Control de Calidad, Corpodiagnostica C.A., a Grupo Evo-Lab C.A. a Laboratorio Inmunofuturo XXI C.A., al Hospital Universitario de Caracas y al Hospital Domingo Luciani.

Referencias Bibliográficas.

1. Boushey C.J., Beresford S.A., Omenn G.S.,

- Motulsky A.G. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995;274:1049-1057.
2. Eikelboom J.W., Lonn E., Genest J., Hankey G., Yusuf S. Homocysteine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence *Ann Intern Med* 1999;131:363-375.
 3. Ford E.S., Smith S.J., Stroup D.F., Steinberg K.K., Mueller P.W., Thacker S.B. Homocysteine and cardiovascular disease: a systematic review of the evidence with special emphasis on case-control studies and nested case-control studies *Int J Epidemiol* 2002;31:59-70.
 4. Finkelstein JD. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Semin Thromb Hemost* 2000;26(3):219-25.
 5. Ueland P.M., Refsum H., Beresford S.A., Vollset S.E. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk *Am J Clin Nutr* 2000;72:324-332.
 6. Rozen R. Genetic modulation of homocysteinemia. *Semin Thromb Hemost* 2000;26 (3):255-261.
 7. Schneede J, Refsum H, Ueland PM. Biological and environmental determinants of plasma homocysteine. *Semin Thromb Hemost* 2000;26(23):263-279.
 8. Ueland PM, Refsum H, Stabler S, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: Methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993;39: 1764-1779.
 9. Undas A, Brozek J, Szczeklik A. Homocysteine and thrombosis: from basic science to clinical evidence. *Thromb Hemost* 2005;94:907-915.
 10. Bennouar N, Allami A, Azeddoug H, Bendris A, Laraqui A, El Jaffali A y col. Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism and Homocysteine Are Risk Factors for Coronary Artery Disease in Moroccan Population. *J of Biomed and Biotech* 2007;2007(1);80687-806896.
 11. Gaughan D, Kluijtmans L, Barbaux S, McMaster D, Young I, Yarnell J, Evans A, Whitehead A. The methionine synthase reductasa (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. *Atherosclerosis* 2001;157: 451-456.
 12. Kim O, Hong S, Ahn J. Influence of Combined Methionine Synthase (MTR 2756A>G) and Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR 677C>T) Polymorphisms to Plasma Homocysteine Levels in Korean Patients with Ischemic Stroke. *Yonsei Medical Journal.* 2007;48(2):201-209.
 13. Jemaa R, Achouri A, Kallel A. Association between the 2756A>G variant in the gene encoding methionine synthase and myocardial infarction in Tunisian patients. *Clin Chim Lab Med* 2008;46(10):1364-1368.
 14. Suárez I, Gómez J, Ríos J, Barbado F, Vázquez J. La homocisteína. ¿El factor de riesgo cardiovascular del próximo milenio? *An Med Interna* 2001;18:211-217.
 15. Frosst P, Blom H.J, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Pub Group* 1995;10:111-113.
 16. Kluijtsman L., Van den Heuvel L., Boers G., et al. Molecular Genetic Analysis in Mild Hyperhomocysteinemia: A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Genet* 1996;58:35-41.
 17. Lakshmi SV, Naushad SM, Rupasree Y, Seshagiri Rao D, Kutala VK. Interactions of 5'-UTR thymidylate synthase polymorphism with 677C → T methylene tetrahydrofolate reductase and 66A → G methyltetrahydrofolate homocysteine methyl-transferase reductase polymorphisms determine susceptibility to coronary artery disease. *J Atheroscler Thromb* 2011;18(1):56-64
 18. Laraqui A, Allami A, Carrié A, Coiffard AS, Benkouka F, Benjouad A, Bendriss A, Kadiri N, Bennouar N, Benomar A, Guedira A, Raisonnier A, Fellati S, Srairi JE, Benomar M. Influence of methionine synthase (A2756G) and methionine synthase reductase (A66G) polymorphisms on plasma homocysteine levels and relation to risk of coronary artery disease. *Acta Cardiol* 2006;61(1):51-61.
 19. Laraqui A, Allami A, Carrié A. Relation between plasma homocysteine, gene polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes, and angiographically proven coronary artery disease. *Eur J Intern Med* 2007;18(6):474-483
 20. Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, Gravel RA. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increase risk for spina bifida. *Mol genet Metab* 1999;67(4):317-332
 21. Leclerc D., Campeau E., Adjalla C. E., Christensen B., Ross M., Eydoux P., Rosenblatt D.S., Rozen R., and Gravel R.A., Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cbIG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Human Molecular genetics* 1997;5(12):1867-1874.

EVALUCION DE LA FLORA FUNGICA DEL AMBIENTE DEL ARCHIVO GENERAL DEL ESTADO SUCRE. VENEZUELA.

Josefa Díaz.^{1,2}

¹Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre. Dpto. de Bioanálisis. ²Hospital Universitario "Antonio P. de Alcalá". Estado Sucre.

Recibido para publicación Agosto 2012. Aprobado para publicación Noviembre 2012.

RESUMEN:

Los agentes fúngicos son capaces de descomponer materia orgánica como madera, papel, pintura, suelo, polvo, alimentos. Pueden ocasionar deterioro de material bibliográfico, textos, mobiliario, pinturas, igualmente causan enfermedades de tipo alérgico. El Archivo General del estado Sucre es un centro de consulta e investigación donde se encuentran documentos y otros textos que se han ido dañando a través del tiempo; las condiciones de almacenamiento en un área con deficiencias estructurales y ambientales, favorecen el desarrollo de hongos, causando el deterioro del material bibliográfico. Se realizó una investigación para evaluar la flora fúngica tanto del mobiliario como documentos y textos existentes, que servirá de base para un futuro plan de conservación y restauración. Utilizando el método de sedimentación en placa conteniendo Agar Sabouraud Dextrosa, se expusieron 60 placas durante 15 minutos en diferentes secciones del área de estudio, incubándose 10 días a temperatura ambiente. Se aislaron 86 colonias que se caracterizaron macro y microscópicamente. Los géneros aislados fueron: *Aspergillus* (38,46%), *Fusarium* (21,70%), *Curvularia* (16,76%), *Cladosporium* (12,76%), *Penicillium* (10,32%), los cuales han sido descritos como contaminantes habituales de libros o textos, mobiliarios, pinturas, además capaces de causar reacciones alérgicas de tipo respiratorio resultando un riesgo para el material bibliográfico, usuarios y personal de la institución.

Palabras claves: Hongos, contaminantes, alérgicas, riesgo.

EVALUATION OF THE FUNGIC FLORA OF THE ATMOSPHERE OF THE GENERAL ARCHIVES OF THE SUCRE STATES. VENEZUELA

SUMMARY

The fungies agents are able to disturb organics material as wood, paper,paint, ground, drust, foods they can produce deterioration of bibliographycal material, texts, house-hold goods, paintings, and equally they cause disease of allergic type. The general archives of Sucre state is a consulting center and investigation where it is found historic documents and another texts which have been damaging throuth the time, the conditions of storing in an area with estructural deficiencis and environment improve the development of fungies causing the depreciation of bibliographycal material. An investigation was done to evaluate the fingis flora as the house-hold godos, as the existen documents and texts, that it would serve the base to design the future plan of conservtion and restauration. Using the method of sedimentation in plaque containing Agar Sabouraud Dextrosa, 60 plaques were exposed during 15 minutes in different sections of study area, incubating 10 days at atmosphere temperatura. 86 colonies were isolated that were characterized macro and microscopy. The aislated fungic species were: *Aspergillus* (35,46%), *Fusarium*(21,70%), *Curvularia* (16,76%), (12,76%), *Penicillium* (10,32%), which have been described as usual contaminating of book o texts, house-hold godos, paintings, in addiction to this they are able to cuse allergic rections of respiratory type, resulting a risk to the bibliographycal material, usuaries and personal of the institution.

Key words: Fungus, contaminating, alergyc, risk.

Solicitar copia a: Josefa Diaz. diazvv@cantv.net

Introducción

El aire tiene en suspensión diferentes tipos de microorganismos, especialmente bacterias y hongos. La presencia de uno u otro tipo depende del origen, de la dirección e intensidad de las corrientes de aire y de la supervivencia del microorganismo. Algunos hongos se encuentran en forma de células vegetativas, pero lo más frecuente son las formas esporuladas, ya que las esporas son metabólicamente menos activas y sobreviven mejor en la atmósfera porque soportan la desecación(1-3).

El número de microorganismos de la atmósfera cambia según la altura (10-104 por m³), obteniéndose el más alto junto al suelo, sobre todo en los dos metros inferiores, que constituyen el microclima del hombre, disminuye hasta los 200 metros y luego se hacen más escasos hasta los 5000 metros. En las zonas pobladas este número depende de la actividad en la zona, tanto industrial como agrícola como de los seres vivos(4,5).

Gran número de infecciones humanas y animales se transmiten por el aire y causan enfermedades, principalmente, en el aparato respiratorio. Las enfermedades respiratorias tienen una gran importancia socio económica ya que se transmiten fácilmente a través de las actividades normales del hombre, son las más frecuentes en la comunidad y el motivo más importante del ausentismo laboral y escolar. Los microorganismos presentes en el aire también pueden contaminar los alimentos y materia orgánica (cueros, textiles, papel) produciendo su alteración (6,7).

Entre los géneros que se encuentran con mayor frecuencia en el aire y que son de considerable importancia por su capacidad de adaptar su fisiología al ambiente son: *Aspergillus sp*, *Penicillium sp*, *Fusarium sp*, *Cladosporium sp*, *Curvularia sp*, *Alternaria sp*, *Mucor sp*, *Rhizopus sp*, *Syncephallastrum sp*, *Levaduras sp* (7,8)

En los últimos años se ha incrementado el interés por los microorganismos que se transmiten por el aire, sobre todo los hongos, en diferentes ámbitos (sanitarios, urbanos, agrícolas, industriales), debido a la capacidad de estos microorganismos para producir efectos perjudiciales tanto en el medio ambiente como en la salud de las personas y animales cuando se exponen a bioaerosoles originados del aire exterior o en recintos cerrados, húmedos, como el ambiente del Archivo General del Estado Sucre, con las importantes consecuencias sanitarias y económicas (restauración de documentos y libros de consulta, enfermedad en usuarios y trabajadores) que esto acarrea y es lo que justifica esta investigación (9,10).

Materiales y Métodos

Con el objeto de evaluar la flora fúngica tanto del mobiliario como de documentos y textos existentes en el ambiente del archivo General del Estado Sucre, se realizó una investigación de tipo descriptiva, no experimental, utilizando el método de sedimentación en placas. Se expusieron 60 placas, conteniendo Agar Sabouraud Dextrosa, durante 15 minutos en diferentes secciones del área de estudio, incubándose a 25°C, examinadas al término de 48 horas y hasta 10 días. También se tomó muestra por raspado de hojas y caratulas de textos deteriorados.

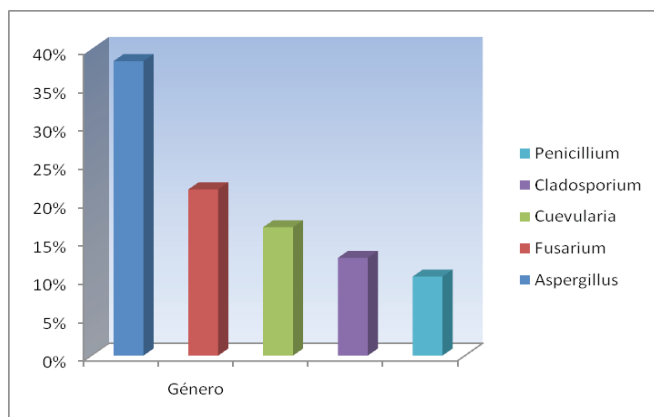
Resultados

En la Gráfico 1 se muestra la frecuencia de los diferentes Géneros aislados en el área de estudio. Se obtuvieron 86 colonias que se caracterizaron macro y microscópicamente. Los géneros aislados en orden de frecuencia fueron: *Aspergillus* (38,46%), *Fusarium* (21,70%), *Curvularia* (16,76%), *Cladosporium* (12,76%), *Penicillium* (10,32%), en relación con el Género *Aspergillus* predominó la especie *A. fumigatus*.

Tabla 1. Frecuencia de Géneros Fúngicos aislados en el área del Archivo General del Estado Sucre, Cumana, Venezuela

Géneros	Nº de Aislamientos	Frecuencia
<i>Aspergillus</i>	33	38,46%
<i>Fusarium</i>	19	21,70%
<i>Curvularia</i>	14	16,76%
<i>Cladosporium</i>	11	12,76%
<i>Penicillium</i>	9	10,32%
Total	86	100

Gráfico 1. Frecuencia de géneros aislados en el área del archivo general del Estado Sucre, Venezuela.



Discusión:

Se aislaron cinco Géneros que han sido descritos como contaminantes habituales de libros o textos, mobiliarios, pinturas, además capaces de causar reacciones alérgicas de tipo respiratorio (3). Estudios epidemiológicos han demostrado que las esporas de varios mohos causan reacciones de hipersensibilidad que puede ser: inmediata o alergia que afecta al aparato respiratorio superior causando rinitis y asma, producida por partículas de 30µm como las esporas de *Alternaria* y *Cladosporium*; y retardada que afecta al aparato respiratorio inferior produciendo alveolitis y neumonitis, debida a partículas menores de 5µm, principalmente esporas de *Aspergillus* y *Penicillium* (6). Entre los Géneros aerotransportados más comunes se ha descrito *Cladosporium* que puede colonizar casi cualquier tipo de superficie, sobre todo con mucha humedad: piscinas, saunas, maderas, paredes, suelos, es capaz de atacar celulosa, pectina, pudiendo destruir papel, oleos, entre otros. Esta especie aislada tiene gran importancia ya que se ha asociado principalmente con reacciones alérgicas, dolores de cabeza, picazón en los ojos, erupción y problemas respiratorios. *Aspergillus* es un hongos filamentoso, ampliamente distribuido en la naturaleza, se desarrolla en vegetales en descomposición, granos de cereal, tejidos de lana, siendo su medio ideal los ambientes húmedos y cerrados, podemos encontrar esporas en aparatos de aire acondicionado, edificios en construcción o remodelación. *Fusarium* es un género de distribución mundial, en ocasiones causa queratitis, onicomycosis, describiéndose cada vez más en pacientes inmunodeprimidos. Su marcada variabilidad en cuanto a características fisiológicas y morfológicas explica su capacidad para colonizar diversos nichos ecológicos

diseminados por todo el mundo. *Penicillium* es causa infrecuente de infección conjuntival, rinitis alérgica (7). El estudio de ambientes laborales se considera prioritario, ante la posibilidad de inhalación de las esporas de estos hongos dispersas en el ambiente sin ningún control oportuno, pudiendo comprometer la salud de los individuos.

Referencias Bibliográficas.

1. Arenas R. Micología Médica Ilustrada. 2º Edición. Mc Graw-Hill Interamericana S.A., México. 2003.
2. Rippon J. Tratado de Micología médica 3ºed. Nueva Editorial Interamericana. México pp. 1990
3. Sanchis V, Santamarina M, 1992. Micotoxina y Micotoxicosis (Riesgos para la salud). Revista Iberoamericana De Micología. pág.46-50.
4. Fitzpatrick, B.; Eisen, A.; Frudberg, I. Y Austin, Rf. Dermatología en Medicina General. Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 304. 1988.
5. Pumarola, A.; Rodríguez, A. Y Puchola, G. Microbiología y Parasitología Médica. Segunda Edición. Editorial Massare-Salvat Mediana. Barcelona.;908.1991.
6. Torres-Rodríguez, J.M. Nuevos Hongos patógenos oportunistas emergentes. Rev. Iberoam. Micol; 13:530-5-38. 1996.
7. Kennedy Mj, Sigler L.: Aspergillosis Fusarium, and other opportunistic moniliaceous fungi En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller Ma, Tenover FC, Tenover RH. Manual of Clinica Microbiology(6ºed). American Society for Microbiology Press, Washintong DC 1995,pp.765-791.
8. Bolívar V. A, Evaluación de la Flora Fúngica en el aire interno, textos y mobiliarios de la Biblioteca Ateneo de Carúpano. Estado Sucre. (2003-2004).
9. Rodríguez A. Evaluación de los hongos Atmosféricos en el Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá". Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná. Venezuela. 1999.
10. Ogaucá, H.; Summerbull, R.C.; Clemons, K.V.; Koga, T.; Ran, Y.P.; Rashid, A. et al. Dermatophytes and host defense in cutaneous mycosis. Med. Mycol. 36 (suppl 1): 166-73. 1998.

DIÁLOGO DE SABERES SOBRE EL BIOANÁLISIS EN VENEZUELA

Nathalia E. Cardona Ch. y Dagmarys C. Ortega Q.

Servicio Autónomo Centro Amazónico para la Investigación y Control de Enfermedades Tropicales "Simón Bolívar, SACAICET

Recibido para publicación abril 2012. Aprobado para publicación septiembre 2012.

RESUMEN:

La equidad de los servicios de salud es uno de los principios fundamentales del derecho a la salud de nuestra Carta Magna (Art.84), es por ello que al hacer una revisión de la situación de los servicios de Bioanálisis, en Venezuela y en especial en las zonas de frontera con población rural, indígena y dispersa, es donde se evidencia lo poco que se hace o hacemos como profesionales de la salud para cumplir con ese principio, plantearnos la necesidad de ejercer nuestra profesión donde más se necesite, zonas donde por el ejemplo la sola realización de algún examen microscópico (baciloscopias, diagnóstico de malaria, recuento diferencial, conteo de blancos) marca la diferencia entre la vida y la muerte, y las acciones de salud pública que se puedan aplicar para el control de enfermedades endémicas.

Si bien es cierto, el profesional del Bioanálisis posee la formación para desarrollar diferentes roles: analista, investigador, agente de cambio social y administrador, cuando hacemos una reflexión del papel que tradicionalmente se desarrolla, vemos que el mayor porcentaje de los egresados desempeña el rol de analista en cargos asistenciales, circunscribiéndose a ser ejecutores de técnicas y procedimientos analíticos, donde labora como un técnico operador de equipos semiautomatizados o automatizados productores de resultados. Deja entonces de lado, los roles más humanos de nuestra profesión, y el rol de crítico protagonista del equipo de salud. Esto trae como consecuencia que frecuentemente, cuando se nombran a los miembros del equipo de salud, el Bioanalista no figura como tal y si se hace, sólo se hace referencia al "paramédico", pues el trabajo se traduce sólo en una hoja de resultado firmada.

Hemos identificado algunos obstáculos que durante el ejercicio de nuestra profesión influyen en la generación de inequidades en salud, en particular en materia de acceso a los servicios de salud y a servicios de salud de igual calidad. Los hemos denominado FRONTERAS.

Palabras claves: Bioanálisis, fronteras, servicios de salud.

DIALOGUE OF KNOWLEDGE ON VENEZUELA BIOANALYSIS

SUMMARY

The equity of health services is one of the fundamental principles of the right to health of our Constitution (Art.84), when we do a review of the situation of Bioanalysis services in Venezuela and especially in the border areas with rural, Indians and/ or scattered population, we showed how little we do as health professionals to fulfill the need to accomplish our profession where most is needed, areas for example, where only doing a single microscopic examination (smear , malaria diagnosis , differential count , white count) makes the difference between life and death, and public health actions that can be applied for the control of endemic diseases.

Although, the professional trained like Bioanalysis has to develop different roles: analyst, researcher, social change agent and manager, when we see the role that we traditionally develop, we see that a highest percentage of bachelors play the role of analysts in healthcare hospitals, confined to be executing techniques and analytical procedures, where they work as a technical operator of semi-automated or automated equipment just producing tests results, leaving aside the human role in our profession, and the role of critical protagonist of the health team. The consequence is that often, when people refer to the members of the health team, the Bioanalyst is not shown as such, referring only to "paramedic", as the work is translated only into a signature result sheet.

We have identified some obstacles during the practice of our profession that influence the generation of health inequities, particularly in access to health services and health services of equal quality. We have called BORDERS.

Key words: Bioanalysis, borders, health services

Solicitar copia a: Nathalia E. Cardona Ch. natcard@hotmail.com

Fronteras Legales

La Ley del Ejercicio del Bioanálisis en su Art. 2, expresa que el Ejercicio del Bioanálisis es "... para suministrar datos al proceso de diagnóstico de enfermedades, su prevención y terapéutica". Este mismo artículo en su párrafo tercero, expresa que "Los análisis a que se refiere el presente artículo deberán ser ordenados por el profesional correspondiente, salvo en los casos de investigación científica". Este marco legal limita la capacidad de toma de decisiones y el papel activo del Licenciado en Bioanálisis dentro de las actividades que desempeñan los profesionales de la salud, ignorando la experticia que este profesional posee para, en un momento dado, orientar al resto del equipo de salud en la conducción del proceso diagnóstico, prevención, terapéutica y epidemiología de las enfermedades.

La Ley concibe al Licenciado en Bioanálisis sólo para suministrar datos en el proceso de diagnóstico clínico. Esta actuación de PRODUCTOR DE RESULTADOS debe ser sustituida o compartida con la de analítico de información clínica y epidemiológica, que aporte conocimientos al diagnóstico de casos clínicos ó epidemias.

Esta frontera legal históricamente ha limitado el desarrollo de otras áreas de ejercicio creando lo que reconocemos como la FRONTERA DEL EJERCICIO ASISTENCIAL.

Se hace necesario divulgar y multiplicar otra visión del ejercicio del Bioanálisis, todavía abordada de manera tímida:

Docencia:

El campo de la docencia se ha limitado en su mayoría sólo a las Escuelas de Bioanálisis, pudiendo perfectamente el Licenciado en Bioanálisis incurrir como docente en la formación de otros profesionales de la salud y las ciencias sociales, así como de la formación de Técnicos y Asistentes de laboratorio clínico y otro personal de salud no escolarizado como Agentes Comunitarios en Atención Primaria de Salud y Promotores de Salud.

Investigación:

En el plano de la investigación el profesional del Bioanálisis tiene la fortaleza de poseer las destrezas y capacidades técnicas del trabajo en laboratorio y la preparación académica necesaria para plantearse problemas, desarrollar procesos y analizar resultados,

destinados a responder a necesidades del conocimiento científico, a atender problemas de salud pública capaces de generar respuestas oportunas y consonas con las realidades propias del colectivo participante y beneficiario de la investigación.

Programas de control:

La coordinación y participación en actividades en programas de control está básicamente ocupada por profesionales de medicina, enfermería y promoción social. El Licenciado en Bioanálisis está capacitado para asumir estos roles, como se evidencia en el Programa de Control de Tuberculosis. Esto le ha dado al programa una visión integral a las soluciones de los problemas de diagnóstico y control, lo que sería de un gran valor en otros Programas.

Gerencia:

Laboramos en un Sistema de Salud medicocentrista, donde generalmente el profesional de la medicina es la primera y única opción para asumir cargos de dirección, gerencia y coordinaciones. Conocemos contados ejemplos de Licenciados en Bioanálisis que han comenzado a romper este paradigma que centra en el médico las responsabilidades de la administración de salud.

Vale mencionar dentro de esta frontera del ejercicio asistencial la forma en que la dirigencia gremial restringe las discusiones de beneficios laborales, solo a los Licenciados en Bioanálisis que ocupan cargos asistenciales con denominación de "Bioanalista", y se obvia completamente a Investigadores y Licenciados que ocupan cualquier otro cargo que no contemple esta denominación.

Frontera Del Ejercicio Rural

En un territorio de gran extensión geográfica (187.000 Km²), con pocos centros poblados, por tanto con pocos establecimientos de salud, cada uno con una extensa área de influencia de comunidades indígenas distribuidas en ejes fluviales, o de difícil acceso (aéreo o caminatas en selva). Con un área importante de fronteras con Colombia y Brasil, con las características propias de la vida en fronteras (migraciones, presencia militar, manejo de políticas binacionales), y con características particulares para la epidemiología de las enfermedades. Aunado a que se trata de un estado multiétnico y pluricultural, donde habitan 21 pueblos indígenas, por tanto 21 visiones distintas del proceso salud-enfermedad, donde

se requiere el abordaje de las comunidades considerando las características socioantropológicas de cada pueblo.

Hasta el año 1994, solo existía un laboratorio situado en el Hospital “Dr. José Gregorio Hernández”, ubicado en Puerto Ayacucho, capital del Estado. A partir de 1995 se crearon paulatinamente Servicios de Bioanálisis en cinco (5) Ambulatorios Urbanos de esta capital, sin embargo, el resto del territorio carecía del servicio, por tanto todo paciente que en un momento dado ameritaba de un análisis de laboratorio debía acudir a la capital. Esto representaba una saturación del servicio, poca accesibilidad e inadecuados registros por concentración en el municipio capital.

En aras de lograr la equidad y asegurar el acceso a servicios de salud, se inició a finales de los 90 la municipalización de los Servicios de Bioanálisis, lo cual constituyó un Proceso Político y Técnico hacia las Autoridades Sanitarias y Alcaldías, promoviendo el proyecto de la importancia para la salud pública de la presencia del Licenciado en Bioanálisis en el interior de Estado. Finalmente el trabajo dio sus frutos: el Ministerio de Salud realizó la dotación de equipos, materiales y reactivos de los Ambulatorios rurales tipo II del Estado, las Alcaldías de los Municipios Autana, Atabapo, Manapiare, Maroa y Río Negro, destinaron el recurso para la contratación del personal para los servicios del Bioanálisis, y se formaron Asistentes de laboratorio en cada localidad.

Logrado el objetivo, fue preciso dedicarse a la ardua tarea de la “Búsqueda de Licenciados en Bioanálisis” para el ejercicio en comunidades rurales, de difícil acceso, con una gran área de influencia, con limitaciones técnicas para la instalación de equipos, y el contacto con comunidades indígenas, enfrentando barreras lingüísticas y culturales.

Con satisfacción se logró tener el hospital tipo I de San Fernando de Atabapo y cuatro (4) Ambulatorios Rurales tipo II en las capitales de cuatro (4) Municipios, con laboratorios semi-automatizados funcionando con Licenciados en Bioanálisis egresados de las distintas Escuelas de Bioanálisis del País.

Sin embargo superadas las fronteras técnicas al lograr, en 2004, la automatización todos los laboratorios y las fronteras económicas al lograr, en todas las alcaldías los cargos para Licenciados en Bioanálisis con salarios y beneficios superiores al resto de la administración pública; tal logro no se ha podido mantener en el tiempo,

debido a la ausencia de los Licenciados en Bioanálisis. Hoy en día tenemos cinco (5) laboratorios rurales dotados, bien sea cerrados o prestando el servicio con personal de la Misión Médica Cubana, por falta de profesionales de Bioanálisis. Lo que nos mantiene en la situación inicial de saturación del servicio y poca accesibilidad.

En el año 2002, intentamos anticiparnos a esta situación, proponiendo en la XLII Convención Nacional de Bioanalistas la inclusión en la Ley de Ejercicio del Bioanálisis la obligatoriedad del Ejercicio Rural para el Licenciado en Bioanálisis recién egresado, propuesta que fue aprobada. Y aunque conocemos las dificultades de iniciar la tan necesitada reforma de la Ley de Ejercicio, la necesidad del ejercicio rural pudiera ser elevada a todos los Colegios de Bioanalistas del País a través de la Federación de Colegios de Bioanalistas de Venezuela (FECOBIOBE), pues la necesidad de que los servicios de Bioanálisis lleguen hasta donde los pueblos y comunidades lo necesitan no solo es una realidad del Estado Amazonas, como claramente se evidenció en dicha convención.

El Licenciado en Bioanálisis no solo tiene como campo de acción el laboratorio si no la comunidad, donde podemos actuar como agentes de cambio social, donde pongamos en evidencia el compromiso social de nuestra profesión, teniendo como norte la equidad de los Servicios de Bioanálisis. En Venezuela, las prioridades sanitarias nacionales declaradas son aumentar la equidad en salud, entendida la equidad como la igualdad de oportunidades en el uso de servicios de salud, incorporando la igualdad en el acceso y en la calidad del mismo.

Fronteras en la formación de Pregrado

Desde la disertación sobre el Bioanálisis del presente Milenio que realizamos en el año 2000, se ha visto un cambio en la actitud de nuestros estudiantes observándose un aumento en el interés hacia la investigación, sin embargo, siempre orientada al ensayo, adaptación o creación de nuevas metodologías fundamentalmente en la investigación básica. Nos parece vital la incorporación del profesional del Bioanálisis en esta área pero debemos efectuar investigación orientada a resolver problemas de salud pública y sus impactos en la población, el mejoramiento de las condiciones de vida, los sistemas de prevención de enfermedades y la asistencia médica universal, brindando herramientas para fortalecer el Sistema Público Nacional de Salud.

También hemos visto que tenemos cerca de 10 años que los estudiantes tienen la visión de centrar su ejercicio vinculado a las altas tecnologías y su poca disposición al ejercicio rural, siendo también esto una causa de que existan Servicios de Bioanálisis contruidos y dotados sin este personal profesional.

Vemos que lo planteado a lo largo de este texto, que abarca las fronteras del ejercicio asistencial y rural tiene como eje transversal esta frontera de la formación, es por ello que debemos reflexionar sobre la inclusión en la formación de los profesionales, desde las Escuelas de Bioanálisis, un enfoque dirigido a fomentar la participación activa dentro de:

- Diseño de políticas de salud desde el nivel normativo y rector,
- Impulso a la investigación operacional,
- Programas de Salud Pública,
- Promoción a la Atención Integral en Salud,
- Formación de recursos humanos,
- Redes de vigilancia epidemiológica,
- Constitución de equipos multidisciplinares para el control y evaluación de los problemas de salud.

Finalmente, un aspecto a destacar es la participación activa y comprometida de los Asistentes de Laboratorio quienes realizan actividades de docencia y técnicas de laboratorio de mediana complejidad, bajo la supervisión del Licenciado en Bioanálisis, lo que constituye un apoyo fundamental para la participación en otras actividades inherentes a la profesión.

Nos llama la atención la poca proyección que tiene la lucha contra el desplazamiento de los Licenciados en Bioanálisis de campos de acción propios de su competencia por otros profesionales y técnicos (Microbiólogos, Hematólogos, Toxicólogos, Inmunólogos, Hemoterapistas, Histotecnólogos, Citotecnólogos). Consideramos que contando con un personal auxiliar con una formación académica de tercer nivel como lo poseen los Radiólogos, Nutricionistas, Traumatólogos, Cardiólogos, Enfermeras, entre otros, los Licenciados en Bioanálisis podemos ampliar nuestro radio de acción fuera del rol de técnico operador productor de resultados.

Con un Asistente de laboratorio con formación de tercer nivel que comparta bajo la supervisión del Licenciado en Bioanálisis las actividades de orden técnico, el profesional podrá participar activamente en el proceso

de diagnóstico, prevención, terapéutica y epidemiología de las enfermedades. Esto se puede traducir en el reconocimiento del valor y protagonismo como integrantes del Equipo de Salud, y como profesionales capaces y de excelencia en el ámbito científico y docente.

Referencias Bibliográficas

1. MEMORIAS DE EL BIOANALISIS DEL PRESENTE MILENIO. Dirección de Investigación de la Universidad de Carabobo, Editoras: Antonieta Angulo y Yaniska Fránquiz, La Morita Junio 2000.
2. GOBERNABILIDAD, SALUD Y REFORMA, hacia la equidad y el nuevo universalismo en la salud y el desarrollo humano. Ponencia del Dr. Juan Antonio Casas, OPS/OMSIV Foro de la Salud en la Constituyente, Caracas Septiembre 1999.
3. Málaga H., Perdomo M., González A., Restrepo H. EQUIDAD EN MATERIA DE SALUD Y OPORTUNIDAD DE VIDA EN VENEZUELA Y COLOMBIA. Equity Health, 2001. Libdoc.who.int.

Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas, publica artículos originales, revisiones, cartas al editor y comunicaciones breves relacionadas con biología humana, bioanálisis y áreas afines, que contribuyan al avance de la investigación y difusión científica

Envío del Trabajo

El autor debe enviar un original del artículo, con una carta de presentación firmada por todos los autores como constancia escrita que han contribuido en el diseño, ejecución, análisis e interpretación de los datos, redacción del artículo y, en la revisión crítica del contenido del artículo original a ser publicado. Debe dejar constancia que el trabajo no ha sido publicado ni enviado a otra revista. También indicar el orden de los autores y el autor de correspondencia con su dirección y correo electrónico. Los autores cuando presentan el manuscrito, deben revelar todas las entidades financieras y las relaciones personales que puedan haber influido en el trabajo, es decir deben declarar explícitamente si existen o no conflicto de intereses.

La revista utiliza en forma preferencial el sistema electrónico, por lo tanto debe acompañar el envío de un CD, en "Word for Windows®", en cuya etiqueta se indique el nombre del autor principal.

Sistema de Arbitraje

Todos los artículos originales pasan por un proceso de arbitraje externo, realizado por tres árbitros con experticia en el tema específico. Las revisiones igualmente son evaluadas por especialistas. La decisión se tomará de acuerdo a la opinión de los árbitros aprobada por el Comité Editorial. La autoría del artículo y el arbitraje, son del dominio exclusivo del Comité Editorial. Los autores recibirán la opinión de los árbitros con las recomendaciones por parte del Comité en cuanto a modificaciones de forma y redacción. Las respuestas deben enviarse en un lapso prudencial, con una carta donde el autor señale las modificaciones realizadas y argumente aquellas que no considera adecuadas.

Normas Editoriales

Todas las partes del manuscrito deben estar escritas a doble espacio. Cada sección comenzará en página nueva, todas numeradas, con la siguiente secuencia: página del título, nombre completo de los autores (sin títulos profesionales), dirección de la(s) institución(es) donde fue realizado, y señalar con números consecutivos la que corresponde a cada autor.

Los artículos originales deben guardar la siguiente estructura:

Título en español e inglés (corto, no más de 15 palabras, 75 caracteres), Titulillo en español Resumen y Palabras Clave en español e inglés), Introducción, Metodología, Resultados, Discusión, Agradecimientos, Referencias. Cuadros e Ilustraciones. Cada sección debe comenzar en hoja aparte, así como también los cuadros e Ilustraciones con sus respectivos pies o epígrafe.

Resumen debe establecer los objetivos del estudio, los

procedimientos básicos (selección, métodos de observación y análisis) los hallazgos más importantes, proporcionar datos específicos y, significación estadística y las conclusiones principales sobre la base de los resultados del estudio. No debe contener referencias ni siglas que no estén identificadas. El límite máximo son 250 palabras y no debe ser estructurado. Al final del resumen deben estar 3 a 10 palabras clave, que incluyan descriptores en inglés, de la lista del "Medical Subject Headings (MeSH) y en español de la lista de "descriptores en Ciencias de la Salud" (DECS).

Introducción expresa el propósito del artículo, los antecedentes internacionales y nacionales, mediante referencias actualizadas. En el último párrafo de la introducción debe aparecer en forma clara y precisa el objetivo del estudio.

Metodología describa claramente como se seleccionaron los sujetos que participaron en el estudio, edad, sexo y otras características importantes. En los manuscritos de revisión se incluirá una sección en la que se describan los métodos utilizados para localizar, seleccionar o extraer los datos.

Los estudios con humanos deben dejar constancia escrita de la aprobación por parte del Comité de Ética de la institución donde se realizó la investigación, así como el consentimiento de los individuos que participaron y, evitar en todo momento que puedan ser identificados, tener especial cuidado con las fotografías. Cuando se trate de experimentos con animales, mencione si se cumplieron las normas de la institución acerca del cuidado y uso de animales en el laboratorio.

Describa los métodos estadísticos con detalle suficiente para que puedan verificarse los resultados. Defina los términos, las abreviaturas y los símbolos estadísticos. Cuando sea posible, cuantifique los resultados y preséntelos con indicadores apropiados de medición de error o incertidumbre (como intervalos de confianza).

Resultados. Presente los resultados en el texto, cuadros, ilustraciones y figuras en una secuencia lógica. No repita en el texto la información que contienen los cuadros y figuras, sólo destaque lo más importante. Utilice en esta sección el tiempo pretérito.

Discusión. Destaque los aspectos nuevos e importantes del estudio y las conclusiones que se derivan de los resultados. Cuidese de no repetir la información ya presentada en las secciones anteriores. Relacione las observaciones con la de otros estudios internacionales y nacionales, incorporando en la discusión el análisis de las referencias bibliográficas actualizada relacionadas con el estudio. Establezca el nexo entre las conclusiones y los objetivos del estudio, y cierre la discusión con la conclusión más importante del estudio o con la propuesta de nuevas hipótesis, cuando estén justificadas.

Las Revisiones pueden ser solicitadas por el Editor preferentemente a especialistas sobre un tema de importancia científica en la actualidad, pero también se aceptan revisiones de autores, las cuales seguirán el proceso de arbitraje externo.

En la revista también se publican reportes cortos de hallazgos de interés para el ámbito de la revista, así como casos clínicos cuya ocurrencia sea un verdadero hallazgo.

Las cartas al editor, por lo general están referidos a comentarios de artículos recientes publicados en la revista y su extensión no debe ser mayor a dos páginas.

Cuadros. Cada cuadro debe escribirse a doble espacio, sin líneas verticales ni horizontales internas y en hoja aparte. Numérelos consecutivamente con números arábigos y asigne un título breve en minúscula. Cada columna llevará un encabezamiento corto o abreviado. En las notas al pie se explicarán todas las abreviaturas no usuales empleadas en el cuadro. Si incluye datos publicados o inéditos o de otra fuente, obtenga la autorización para reproducirlos y conceda el reconocimiento al autor. No incluya más de 5 cuadros, máximo de 5 columnas y 8 filas.

Ilustraciones (Figuras) Las figuras deben estar dibujadas en forma profesional (archivos electrónicos de las figuras en formato JPEG o GIF). Se numeran en forma consecutiva con números arábigos. Las fotografías deben ser en blanco y negro, con buen contraste, en papel satinado con las siguientes medidas 127x173 mm, sin exceder 203x 254 mm. Ubicar una por página, título breve y una leyenda que facilite la comprensión del contenido.

Agradecimientos Aparecen al final del texto, allí se incluyen las colaboraciones que deben ser reconocidos pero que no justifican la autoría, ayuda técnica, apoyo financiero y material y las relaciones que puedan suscitar conflicto de intereses.

Referencias

Las referencias bibliográficas dan el soporte científico al estudio realizado, por lo tanto deben ser recientes, preferiblemente de los últimos cinco años. Las referencias internacionales y nacionales constituyen antecedentes del estudio que se está publicando, de esta manera, también reconocemos la labor de los investigadores venezolanos que han aportado al tema en estudio. Numere las referencias consecutivamente siguiendo el orden como se mencionan por primera vez en el texto. Cite cuidadosamente en el texto, cuadros y figuras todas las referencias con un número entre paréntesis. Cuide que la escritura reproduzca fielmente el artículo original y vigile la escritura en inglés, para evitar cometer errores al transcribir la información.

Las referencias bibliográficas en Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas, siguen el estilo de las normas de Vancouver. (<http://www.icmje.org>). Abrevie los títulos de las revistas de acuerdo con el estilo del Index Medicus y consulte la lista de revistas indizadas en (<http://www.nlm.nih.gov>). No se aceptan como referencias resúmenes. Los artículos aceptados pero que todavía no se han publicado, se indican como "en prensa", con la información de la revista donde fue aceptado.

Ejemplos de referencias:

Artículos de revista

Enumere los primeros seis autores y añada la expresión "et al"

1. Artículo de revista ordinario

Bremer AA, Byrd RS, Auinger P. Racial trends in sugar-sweetened beverage consumption among US adolescents: 1988-2004. *Int J Adolesc Med Health* 2011; 23(3):279-86.

Libros

2. Individuos como autor:

Casademunt J. *Sobrepeso y obesidad infantil*. Barcelona: Editorial Océano; 2005.

3. Editores como autor:

Alemán M, Bernabeu-Mestre JB, editores. *Bioética y Nutrición*. Alicante. Universidad de Alicante: Editorial Agua Clara; 2010.

4. Capítulo de libro:

López de Blanco M, Landaeta-Jiménez M. Los estudios de crecimiento y desarrollo físico en Venezuela. En: Fano V, Del Pino M, Cano S, compiladores.

Ensayo sobre crecimiento y desarrollo presentado al Dr. Horacio Lejarraga por sus colegas y discípulos. Buenos Aires: Paidós; 2011. p. 431-454.

Material electrónico

5. Artículo de revista en Internet:

Vázquez de la Torre MJ, Vázquez Castellanos JL, Crocker Sagastume R. Hipertensión arterial en niños escolares con sobrepeso y obesidad. *Respyn [Serie en Internet]* 2011 Jul-Sep [citada 5 nov 2011]; 12(3): [6 pantallas]. Se consigue en: URL: http://www.respyn.uanl.mx/xii/3/articulos/Hipertension_arterial.htm

Para otros ejemplos de formato de referencias bibliográficas, los autores deberían consultar la página web: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html. Para cualquier otro tipo de información se sugiere consultar: Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication Updated April 2010. <http://www.icmje.org>.

Antes de enviar el artículo, revise cuidadosamente las instrucciones a los autores y verifique si el artículo cumple con los requisitos editoriales de la revista Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas



Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

CONTENTS

Vol. 13, 14, 15

2010 - 2011 - 2012

Editorial	2
Profiles of LDH isoenzymes in Non- Hodgking`s lymphoma: Correlation with tumor markers. Priva Zabner de Oziel, Rosa Somoza, Valentina Wallis, Claudia Galicia, Jean Desenne, Ana Monzón de Orozco, Marina Gonzalez, Gretta Acquatella, Marisela Morales, Yasmin Ordoñez, Maria Alejandra Torres, Antonieta Natale, Aixa Müller	3
Molecular characterization of <i>Acanthamoeba Spp.</i> isolates Victoria Luongo C., Alejandra Ugarte-Pelayo S., Mónica Galindo, María Alejandra Vethencourt.....	27
Risk factors associated with metabolic syndrome in patients attending family clinical laboratory, valencia, carabobo state, venezuela, period december 2011 - march 2012. Beatriz Coelho y Ninoska González.....	34
Frequency of Sensitization for Food and Aero-Allergens in Patients Received in a Venezuelan Laboratory During 2010-2011 Period. Cristina Najm, Natacha Camacho, Jhonarly Guzmán, Nirsén García, Noel Silva.....	43
C677T gene polymorphism of the enzyme n-methyl-tetrahydrofolate reductase, A2756G gene polymorphism of the enzyme methionine Synthase and A66G gene polymorphism of methionine synthase reductase and its relationship with homocysteine in patients with cardiovascular disease M ^a Fátima Garcés, Hilda Stekman, Gustavo Martínez, Leonela Dokmaji, Adriana Rivas, Noel Silva, Mercedes Cerviño, Celsy Hernández, Francisco Hernández	49
Evaluation of the fungic flora of the atmosphere of the general archives of the Sucre States. Venezuela. Josefa Diaz.....	55
Dialogue of knowledge on Venezuela bioanalysis. Nathalia E. Cardona Ch. y Dagmarys C. Ortega Q.....	58

Diseño y diagramación: Ana María Reyes, digivi@gmail.com

Impresión: Operagrafica Publicidad, c.a., operapublicidad@gmail.com

Soporte Web: Nexus Radical, Altamar Pérez, aperez@estudiopro.com