



Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

Volumen 16 - No. 1

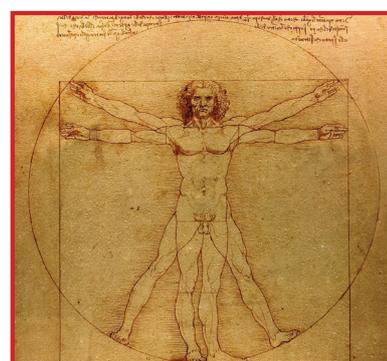
Año 2013

Organo Oficial de la SVBE

CONTENIDO

Editorial	2
Semblanza de la Dra. Ana Monzón de Orozco (1946-2013) Priva Zabner de Oziel y Noel Silva D.....	3
ARTÍCULOS ORIGINALES:	
Valor pronóstico de las isoenzimas de LDH en pacientes con Linfoma No Hodgkin. 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.....	6
Influencia de la dieta sobre las actividades fosforiladoras de glucosa en hígado e intestino de rata. Beatriz De La Torre.....	22
Polimorfismo Pro12Ala del gen <i>PPARγ2</i>, Ala54Thr del gen <i>FABP2</i> y polimorfismos del gen de <i>Apolipoproteína E</i> en habitantes del Sector "Los Eucaliptos" de la Parroquia San Juan, Municipio Libertador Delimar Recio, Esther Révai, Mercedes Cerviño, Hilda Stekman, Isidro Piedra, María Fátima Garcés.....	28
ARTÍCULOS DE REVISIÓN:	
Diagnóstico precoz del cáncer de cuello uterino asociado a la Infección por Virus Papiloma Humano Morelva Toro de Méndez, Antonio Ferrández Izquierdo, Antonio LLombart Bosch	41
ARTÍCULOS DE HISTORIA:	
Testigos de la historia: Proceso de la calidad hematológica (hematimetría) en Venezuela Amadita López, Yadira Pazo.....	54
Información para Autores.....	58

Revista arbitrada e indizada
LILACS (BIREME)
Depósito Legal 199202DF899
ISSN 1315-1746
Miembro ASEREME



Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

Volumen 16. No 1.
Año 2013



2013-2014

Consejo Directivo

Editora

Dra. María Fatima Garcés

Gerencia Editorial

Dra. María Fatima Garcés

MSc. Mercedes Cerviño

Gerencia Administrativa

MSc. Yacelli Bustamante

Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

(S.V.B.E.)

Junta Directiva

Presidenta

MSc. Yaniska Franquiz

Dirección General

Dra. María Fatima Garcés

Dirección Científica

Esp Shasbleidy Diaz

Dirección Administrativa

MSc. Yacelli Bustamante

Dirección de Proyectos y Divulgación Científica

Esp Valmore Rodriguez

Comisión evaluadora de credenciales:

MSc Yacelli Bustamante

Esp. Valmore Rodríguez

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,

Lic. Giuseppe Ferrara, Dra. Marlyn Vivenes,

Lic. Celsy Hernández, MSc Hilda Stekman.

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

LILACS (BIREME)

MIEMBRO ASEREME

Publicación Semestral de la SVBE



Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

CONTENIDO

Vol. 16	2013
Editorial	2
Semblanza de la Dra. Ana Monzón de Orozco (1946-2013) Priva Zabner de Oziel y Noel Silva D.....	3
ARTÍCULOS ORIGINALES:	
Valor pronóstico de las isoenzimas de LDH en pacientes con Linfoma No Hodgkin. Priva Zabner de Oziel, Rosa Somoza, Valentina Wallis, Claudia Galicia, Jean Desenne, Ana Monzón de Orozco, Marina González, Gretta Acquatella, Marisela Morales, Yasmín Ordoñez, María Alejandra Torres, Antonieta Natale, Aixa Müller.....	6
Influencia de la dieta sobre las actividades fosforiladoras de glucosa en hígado e intestino de rata. Beatriz De La Torre.....	22
Polimorfismo Pro12Ala del gen <i>PPARγ2</i>, Ala54Thr del gen <i>FABP2</i> y polimorfismos del gen de <i>Apolipoproteína E</i> en habitantes del Sector "Los Eucaliptos" de la Parroquia San Juan, Municipio Libertador Delimar Recio, Esther Révai, Mercedes Cerviño, Hilda Stekman, Isidro Piedra, María Fátima Garcés.....	28
ARTÍCULOS DE REVISIÓN:	
Diagnóstico precoz del cáncer de cuello uterino asociado a la Infección por Virus Papiloma Humano Morelva Toro de Méndez, Antonio Ferrández Izquierdo, Antonio LLombart Bosch	41
ARTÍCULOS DE HISTORIA:	
Testigos de la historia: Proceso de la calidad hematológica (hematimetría) en Venezuela Amadita López, Yadira Pazo.....	54
Información para Autores	58



Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

CONTENTS

Vol. 16

2013

Editorial2

Biography of Dra. Ana Monzón de Orozco (1946-2013)

Priva Zabner de Oziel y Noel Silva D.....3

ORIGINAL ARTICLES:

Prognostic values of LDH isoenzymes in patients with Non-Hodgkin's Lymphoma

Priva Zabner de Oziel, Rosa Somoza, Valentina Wallis, Claudia Galicia, Jean Desenne,
Ana Monzón de Orozco, Marina González, Gretta Acquatella, Marisela Morales,
Yasmín Ordoñez, María Alejandra Torres, Antonieta Natale, Aixa Müller.....6

**Influence of diet on glucose phosphorylating activity
of rat liver and small intestine**

Beatriz De La Torre.....22

**Pro12Ala Polymorphism Of The *PPAR* γ 2 Gene, Ala54thr Polymorphism
Of The *FABP2* Gene And Polymorphisms Of The *Apolipoprotein E* Gene
In The Population Of "Eucaliptos" Of The Parroquia San Juan, Municipio Libertador**

Delimar Recio, Esther Révai, Mercedes Cerviño, Hilda Stekman, Isidro Piedra, María Fátima Garcés.....28

REVIEW ARTICLE:

Early Diagnosis Of Cervical Cancer Associated To Human Papillomavirus

Morelva Toro de Méndez, Antonio Ferrández Izquierdo, Antonio LLombart Bosch41

HISTORY ARTICLE:

Hematology quality process (hemogram) in Venezuela.

Amadita López, Yadira Pazo.....54

Information for Authors.....58

EDITORIAL

El ACTA CIENTÍFICA es el canal formal de comunicación de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas (SVBE), que tiene como objetivo la difusión del conocimiento generado en las investigaciones científico-tecnológicas de nuestros investigadores asociados. El mencionado objetivo fue cumplido con brillantes, por la doctora Ana Monzón de Orozco (†) quien, gracias al impulso, esfuerzo y soporte fue pilar fundamental en nuestra revista y en el ejercicio de sus funciones como presidenta de la SVBE donde con sus sapiencias guió, enriqueció y enalteció el gremio de Bioanalistas.

En reconocimiento a su destacada labor docente, como investigadora, gremial se presenta en este volumen la semblanza en su memoria. Siempre estará en nuestros corazones y sus enseñanzas guiarán nuestros pasos.

En esta nueva etapa, la revista seguirá cumpliendo su labor, mediante un proceso de mejora continua de la gestión editorial a partir del trabajo cooperativo de las personas que conforman el Comité Editorial; con base a los saberes inculcados por quien cariñosamente llamamos Anita; con criterios de calidad científica a fin de mejorar la visibilidad a la comunidad de lectores y autores interesados.

Atentamente,

Dra. María Fatima Garcés
Comité Editorial

Semblanza de la Dra. Ana Monzón de Orozco. (1946-2013)

Priva Zabner de Oziel y Noel Silva D.

“...Hay en el mundo un lenguaje que todos comprenden: es el lenguaje del entusiasmo, de las cosas hechas con amor y con voluntad, en busca de aquello que se desea o en lo que se cree...”

Paulo Coelho

Las personas van caminando por la vida dejando la fragancia de su ser impregnada en sus obras y palabras, pudiendo ser este aroma perceptible aún después de que transcurre este breve espacio que llamamos vida y que todos compartimos en un momento determinado.

Hay seres especiales, únicos, entrañables, necesarios, cuyo bálsamo impregna de una energía creadora, renovadora y maravillosa a todos los que en algún momento tuvieron el privilegio de conocerlos, permeando incluso lenta pero inexorablemente a quienes no tuvieron contacto directo con ellos.

Ana Monzón de Orozco, nuestra Anita, hoy en día no es solamente de quienes compartimos directamente con ella, trascendió y se convirtió en la Ana de todos aquellos que aman a nuestra digna profesión del Bioanálisis en el Mundo, en especial de nuestra América Latina, para la cual su legado emana y nos indica un ejemplo a seguir, de voluntad, de amor, de muchos sueños convertidos en realidad, y de otros tantos por realizar para las actuales y futuras generaciones.



Para una vida dedicada al Bioanálisis, quisimos hacer una semblanza enmarcada en los denominados Roles del Bioanalista, a saber: Analista, Investigador, Administrador, y Agente de Cambio Social, ya que sin la menor duda, la vida y trayectoria de la Dra. Ana Monzón de Orozco es un ejemplo del cumplimiento cabal de cada una de esas características inspiradas en el Sabio Rafael Rangel, Padre del Bioanálisis en Venezuela. (nota de los autores: No fue tarea fácil poder segregar sus actividades en dichos roles, ya que como podrán los lectores evidenciar en los siguientes párrafos, la Dra. Ana Monzón tenía la facultad extraordinaria de poder integrar estos cuatro roles en todas sus múltiples actividades).

Hechos vitales:

Ana Monzón de Orozco nació en Caracas, Venezuela, el 27 de diciembre de 1946. Cursó estudios de secundaria en el liceo “Agustín Acevedo” y de educación superior en la Universidad Central de Venezuela (UCV), Facultad de Medicina, Escuela de Bioanálisis, de donde egresa en el año de 1968. Durante los años 1979-1981 realizó el postgrado de Inmunología Experimental e Inmunodiagnóstico en el Instituto de Inmunología de la UCV y en el año de 2004 obtuvo el título de Doctor en Bioanálisis, mención Inmunología, de la UCV. Posteriormente en el año 2011 realizó el Diplomado en Gestión de la Calidad en el Laboratorio Clínico dictado por la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas (SVBE).

Madre entrañable de dos hijos, Oliver y Daniel, ya adultos hoy en día.

Su inesperada partida aconteció un 27 de febrero de 2013 en la Ciudad de Caracas.

Investigadora (Docente):

La inmunología se convirtió en la pasión científica de la Dra. Monzón. Como especialista e investigadora sus publicaciones científicas y trabajos presentados en congresos se relacionaron con las enfermedades

autoinmunes, alergia, infección por VIH-SIDA y cáncer, haciéndola merecedora de premios científicos. En 1984 obtuvo el Premio “Alejandro Calvo Lairé” otorgado por la Sociedad Anticancerosa de Venezuela, en 1985 el Premio de la Sociedad Venezolana de Alergia e Inmunología, en 1987 el Premio “Ana Monques de Cadenas” otorgado por el Colegio de Médicos del Distrito Federal y Estado Miranda, Medalla “Louis Pasteur” al mérito científico otorgado por la Embajada de Francia (1995), Premio Laboratorio Metropolitano (1995) y Premio Trabajo Científico SVBE (2012).

Su vocación docente se proyectó durante más de treinta y cuatro años participando en numerosos congresos y Jornadas Científicas como conferencista y coordinadora de cursos, jornadas y congresos.

Destaca su excepcional participación como una de los creadores de los cursos de Postgrado de Inmunología de Laboratorio e Inmunología Clínica y de Laboratorio de la Facultad de Medicina - UCV (1996), siendo profesora, coordinadora y a partir de 1999 directora del Postgrado de Inmunología de Laboratorio -UCV, además de docente ad-honorem en la cátedra de Inmunología de la Escuela de Bioanálisis, en septiembre del 2009 ingresó como Miembro del Comité Académico del Programa de Estudios Individualizados de Maestría y Doctorado de la Facultad de Medicina de la UCV. Esta vocación pedagógica además se volcó en la formación de jóvenes bioanalistas e investigadores mediante la dirección de tesis de postgrado y pregrado, así como jurado de numerosas tesis y premios de trabajos científicos.

Agente de Cambio Social:

La Dra. Ana Monzón de Orozco se destacó por su actividad gremial-científica en el Colegio de Bioanalistas del Distrito Federal y Estado Miranda, en la Federación de Colegios de Bioanalistas de Venezuela (FECOBIOVE), y de la SVBE de la cual fue miembro fundador, ocupando diferentes cargos de la Junta Directiva siendo Presidenta durante varios períodos (1989-1991, 1991-1993, 2008-2013).

Como precursora de la divulgación científica fue fundadora y Editora de la revista “Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas” desde su creación hasta la fecha de su partida, también fue miembro de la Junta Directiva de la Asociación de Editores de Revistas Biomédicas Venezolanas (ASEREME), miembro de la Asociación Mundial de Editores Médicos (WAME), Sociedad Venezolana de Alergia e Inmunología, Sociedad Venezolana de Microbiología, Sociedad Venezolana de Hematología, Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia (ASOVAC) y miembro de la International AIDS Society.

La destacada e infatigable entrega al trabajo, vocación investigadora, docencia y actividad gremial de la Dra. Monzón, la hizo merecedora de distinciones honoríficas: Diploma de Honor otorgado por el Colegio de Bioanalistas del distrito Federal y Estado Miranda (1980,1981,1982,1983,1984,1986,1987,1989,1995), placa de reconocimiento otorgada por la SVBE 1994 y la Condecoración “Rafael Rangel en Segunda Clase (1992) y Primera Clase (1996) otorgadas por el Instituto de Previsión Social del Bioanalista (INPREBIO).

Administradora:

Desde el punto de vista administrativo, quisiéramos hacer mención acerca de su incursión emprendedora dentro del entorno empresarial, (paralelamente a todas sus múltiples actividades), la cual además de exitosa, fue muy interesante; entre sus proyectos más destacados y recientes se conocen los Laboratorios Clínicos Especializados Biocell y Biocell Molecular, ambos pioneros en el área de la citometría de flujo, autoinmunidad, inmunodeficiencias, oncogenes, entre otros.

La Dra. Monzón se destacaba por su capacidad natural de encontrar nichos de mercado, estrategias promocionales, incorporación de técnicas novedosas, manejo de los inventarios, relación con los proveedores, gestión financiera y otras actividades administrativas.

En el aspecto laboral, además de mantener duraderas relaciones laborales con sus empleados, procuraba siempre su mejoramiento continuo y profesional, particularidad que siempre estuvo presente en todas sus actividades.

Consolidó y fortaleció los recursos financieros de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

durante su último período como Presidenta de la misma, tras la creación de Diplomados y diversos cursos para la educación continua y actualización de los bioanalistas, otro espacio en donde se combinaban perfectamente sus múltiples roles e ideas, siempre a favor del desarrollo académico de la profesión que tanto amó.

Analista:

La Dra. Ana Monzón estuvo al servicio de las instituciones públicas durante los 46 años de su actividad profesional destacándose en las áreas asistenciales, docentes e investigación. Se desempeñó como bioanalista del Laboratorio Maternidad Concepción Palacios (1967-1987), Jefe de Laboratorio del Centro Médico Pedro Felipe Calatrava (1977-1978), Adjunto al servicio de Bioanálisis del Hospital Domingo Luciani, El Llanito (1988-1994), Investigador del Laboratorio de Inmunología del Instituto de Oncología y Hematología desde 1981 y ejerciendo la jefatura desde 1996 hasta su desaparición.

Amiga:

Al escribir sobre Ana Monzón de Orozco se impone una mujer inspiradora de nuevos caminos. Su mente, ideas, proyectos y sueños viajaban a una velocidad mayor que el movimiento de su cuerpo. Siempre a la vanguardia de los avances de la ciencia, dispuesta a colaborar con agrado sin esperar nada a cambio, creadora inagotable y fiel amiga. Se dedicó apasionadamente por realizar sus sueños, sus hijos fueron la razón de su existencia y convirtió los obstáculos en desafíos hasta el último suspiro de su vida.

Desde sus actividades docentes dejó un gran número de discípulos, que la continuarán admirando como un “maestro que dejó huellas imborrables” de conocimiento, consejos y hasta regaños a sabiendas de que sus exigencias tendrán fruto en el futuro la excelencia profesional.

Ana tenía a Dios en su vida y corazón, veló por su familia, pero además su prioridad fue más amplia y su visión de largo alcance, siendo su motivación enaltecer la actividad científica del gremio de los Bioanalistas.

PREMIO SOCIEDAD VENEZOLANA DE BIOANALISTAS ESPECIALISTAS (2DA PARTE)
**VALOR PRONÓSTICO DE LAS ISOENZIMAS DE LDH
EN PACIENTES CON LINFOMA NO HODGKIN.**

Priva Zabner de Oziel¹, Rosa Somoza¹, Valentina Wallis¹, Claudia Galicia¹, Jean Desenne¹, Ana Monzón de Orozco^{1†}, Marina González¹, Gretta Acquatella¹, Marisela Morales¹, Yasmín Ordoñez¹, María Alejandra Torres¹, Antonieta Natale¹, Aixa Müller¹. Instituto de Oncología y Hematología (IOH). Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS), Universidad Central de Venezuela (UCV)

Recibido para publicación abril 2013. Aprobado para publicación junio 2013.

RESUMEN:

Introducción: La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) es un factor pronóstico en Linfoma No Hodgkin (LNH). El objetivo del trabajo consistió en evaluar prospectivamente el valor pronóstico de las isoenzimas de LDH en pacientes con LNH. **Métodos:** Se estudiaron 67 pacientes de primera consulta con diagnóstico de LNH, sin tratamiento previo, VIH negativo y sin otras enfermedades, tiempo promedio de seguimiento 30 meses (rango 3-48 meses). Las muestras de suero se recolectaron previas al tratamiento. La LDH total (LDHT) e isoenzimas de LDH se determinaron respectivamente por método cinético y electroforesis de proteínas en gel de agarosa. Se procesaron muestras de 122 controles sanos para establecer los valores de referencia de las isoenzimas de LDH. **Resultados:** 49(73%) LNH agresivos y 18(27%) LNH indolentes y según el Índice Pronóstico Internacional (IPI), 60 (90%) bajo riesgo y 7(10%) alto riesgo. Las isoenzimas LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 y LDH5 presentaron niveles absolutos significativamente elevados en 25 (37%), 29 (43%), 32 (48%), 20 (39%) y 11 (16%) de los casos respectivamente ($p < 0,0001$). La actividad porcentual de LDH4 en los pacientes con LNH agresivos fue significativamente superior respecto al grupo de LNH indolentes ($p=0,01$). En el análisis univariado, valores absolutos elevados de LDH1 se asociaron significativamente con una sobrevida global disminuida ($p=0,0064$) en el grupo total de pacientes. LDH1 conservó su valor pronóstico aún en el grupo de pacientes con valores normales de LDHT ($p=0,04$). En pacientes con LNH agresivos, valores elevados de LDHT e IPI alto riesgo se asociaron significativamente con una menor sobrevida global ($p < 0,05$). En el análisis multivariado la LDHT e IPI resultaron factores pronósticos independientes de la sobrevida. **Conclusiones:** Alteraciones específicas del patrón de isoenzimas de LDH sugieren la relación de LDH4 con la biología del tumor y su actividad proliferativa en LNH agresivos y el valor pronóstico de LDH1 como factor adverso de la sobrevida en el análisis univariado. Se confirmó el valor pronóstico independiente de LDHT sérica y la utilidad del IPI. El estudio de las alteraciones en el perfil de las isoenzimas de LDH podría complementar el valor pronóstico de la LDHT sérica en pacientes con LNH.

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

**PROGNOSTIC VALUES OF LDH ISOENZYMES
IN PATIENTS WITH NON-HODGKIN'S LYMPHOMA**

SUMMARY

Introduction: Lactate dehydrogenase (LDH) is a prognostic factor in non-Hodgkin lymphoma (NHL). Our objective was to evaluate prospectively the prognostic value of LDH isoenzymes in patients with NHL. **Methods:** We studied 67 newly diagnosed NHL patients, previously untreated, HIV-negative and free from other disease, median follow-up of 30 month (range 3-48 month). Before starting treatment serum samples were collected for the determination of total LDH (LDHT) and LDH isoenzymes that were respectively assayed by kinetic method and protein electrophoresis in agarose gel. In order to set reference values of LDH isoenzymes samples from 122 healthy controls were processed. **Results:** 49(73%) of the patients were aggressive NHL and 18(27%) indolent NHL and according to the International Prognostic Index (IPI), 60(90%) low risk and 7(10%) high risk. 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 ($p < 0,0001$). The percentage value of LDH4 activity in aggressive NHL patients was significantly higher compared to indolent NHL group ($p=0,01$). In univariate analysis increased LDH1 absolute values were significantly associated with decreased overall survival in the total group of patients ($p = 0.0064$). LDH1 remained a prognostic factor for survival even when considering the group of patients with normal serum LDHT values ($p = 0.04$). In patients with aggressive NHL increased values of LDHT and high risk IPI were significantly associated with decreased overall survival ($p < 0.05$). In a multivariate analysis LDHT and IPI score were independent prognostic factor for survival. **Conclusions:** Specific alterations in the LDH isoenzyme pattern suggest the relationship of LDH4 with the biology of the tumor and its proliferative activity in aggressive NHL and the LDH1 value as an adverse prognostic factor for survival in univariate analysis. We confirmed the independent prognostic value of serum LDHT and the utility of IPI. The study of the changes in the profile of LDH isoenzymes could complement the prognostic value of serum LDHT in patients with NHL.

Keywords: LDH, LDH isoenzymes, Non Hodgkin Lymphoma

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

Introducción

Los linfomas No Hodgkin resultan de la expansión clonal de linfocitos B, T ó NK que son transformados en diferentes sitios o etapas durante el proceso de diferenciación y maduración celular, originando los diferentes subtipos de linfomas, los cuales comprenden un grupo heterogéneo de neoplasias linfoides que difieren en sus características clínicas, biológicas, celulares y moleculares(1-4).

Con fines prácticos clínicos, los LNH se clasifican en dos categorías o tipos pronósticos, en base a sus características morfológicas y a la velocidad de crecimiento y diseminación del tumor: Los linfomas agresivos, que incluyen los linfomas de intermedio y alto grado de malignidad de células B y T/ NK, con tendencia a un rápido crecimiento y diseminación y los linfomas indolentes, definidos histológicamente de bajo grado de malignidad y de crecimiento lento (1-4).

El sistema más ampliamente utilizado para la categorización de los pacientes con LNH ha sido el Índice Pronóstico Internacional (IPI), desarrollado en el año 1993 por el Proyecto Internacional de Factores Pronósticos para LNH (5), válido para todos los grados de malignidad(6). EL IPI consta de cinco factores pronósticos estadísticamente independientes de la evolución clínica, a saber: edad (≤ 60 años vs. > 60 años), estadio clínico (I-II vs. III- IV), niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) sérica (<100 % del valor normal vs. >100 % del valor normal), estado funcional escala ECOG (0-1 vs. 2-4) o escala Karnofsky ($>70\%$ vs. $<70\%$) y número de sitios extra nodales (≤ 1 vs. >1).

La utilidad de las características clínico-patológicas como factores pronósticos depende de la eficacia de un tratamiento específico. El IPI ha ganado aceptación internacional como modelo pronóstico en el manejo de pacientes con LNH tratados con cyclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona (CHOP). A partir del año 2004, a raíz del desarrollo del Rituximab (anticuerpo monoclonal anti CD20) y su adición a la quimioterapia CHOP, surge el Índice Pronóstico Internacional Revisado (R-IPI)(7).

En pacientes con LNH, la enzima lactato deshidrogenasa constituye uno de los componentes del IPI y es considerada como un factor pronóstico adverso de la sobrevida (5-12).

La LDH está conformada por cinco isoenzimas

y desde su descripción se ha suscitado un gran interés respecto a su asociación con una variedad de tumores (mama, colon, próstata, pulmón, testículo), así como en malignidades hematológicas (mieloma múltiple, leucemias y linfoma) (12-18).

Las isoenzimas de LDH comprenden una familia de 2-hidroxiácido-oxidoreductasas que simultánea y esteroespecíficamente interconvierten piruvato a lactato y NADH a NAD⁺, favoreciendo el equilibrio de la reacción y la reversibilidad de la misma (14-18).

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. 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 y está presente predominantemente en los tejidos anaeróbicos, tales como el músculo esquelético e hígado y la forma H corresponde al gen B humano, predominante en tejidos aeróbicos tal como el músculo cardíaco. Las formas M y H presentan una identidad en la secuencia de aminoácidos del 75%, pero son significativamente diferentes en sus propiedades cinéticas y a pesar de las diferencias estructurales entre las isoformas M y H, son lo suficientemente similares para permitir la mezcla o hibridación de ambas, para formar tetrámeros híbridos o isoenzimas (15-17). Las subunidades M y H son producidas en la misma célula y están destinadas para la misma función general, no obstante, presentan diferencias entre sí y son reguladas independientemente. Las isoenzimas se derivan de genes individuales, los cuales son traducidos en proteínas con secuencias y actividades similares, pero cada una con distintas propiedades cinéticas y regulatorias. Las variaciones en la relación de M y H son evidencias directas de la síntesis diferencial de estas proteínas, siendo probable que los efectos producidos por la embriogénesis, hormonas, enfermedades y cambios en la tensión de oxígeno, sobre la síntesis de las subunidades, sean expresiones de la regulación diferencial de los genes (15,19). La

combinación de las diferentes subunidades en tetrámeros híbridos o mezclados conforman las cinco isoenzimas de LDH: H4, MH3, M2H2, M3H y M4, con una estructura altamente conservada y designadas respectivamente LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 y LDH5, de acuerdo a su movilidad electroforética de ánodo a cátodo (18).

La actividad de las isoenzimas de LDH ha sido estudiada en malignidades hematológicas observándose cambios en el patrón en pacientes con LNH, sin observar cambios significativos en los casos de leucemia linfocítica crónica y linfoma de Hodgkin (20). Rotenberg y col. (21) 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,.

Ricerca y col (22) evaluaron el patrón sérico de las isoenzimas de LDH y su asociación con factores clinicopatológicos en pacientes con LNH, al momento del diagnóstico, en recaída y remisión completa, sugiriendo a la isoenzima LDH3 como un marcador confiable de la presencia de enfermedad, mientras que la LDH total estaría más relacionada con la expansión de la misma.

Los estudios de Dumontet y col. (23) indicaron que los pacientes con LNH con incrementos de LDH sérica al momento del diagnóstico, presentaron porcentajes y valores absolutos significativamente elevados de LDH2 y LDH3 respectivamente, asociados significativamente con una sobrevida libre de progresión y sobrevida global más corta. La isoenzima LDH3 se mantuvo como un factor pronóstico de sobrevida cuando se consideraron solo los pacientes con LDH total sérica elevada al momento del diagnóstico.

Otros investigadores (24,25) analizaron el perfil de las isoenzimas de LDH y su valor pronóstico en pacientes con diferentes malignidades hematológicas. Los pacientes con LNH mostraron niveles elevados de la isoenzima LDH3 y porcentajes de LDH2 como factores pronósticos de una menor sobrevida global. En el análisis multivariado, el incremento de los valores de LDH3, los altos porcentajes de LDH2 y el estado funcional, pero no la LDH total, fueron factores independientes de la sobrevida. Los valores aumentados de la isoenzima 3 fueron predictivos de muerte temprana en los pacientes con LNH.

El análisis del perfil de isoenzimas de LDH mostró porcentajes incrementados de LDH2 en los pacientes con LNH, leucemia linfocítica crónica y síndromes mieloproliferativos, pero no en los pacientes con mieloma múltiple o enfermedad de Hodgkin.

Por otra parte, los estudios in vitro sobre la actividad del perfil de las isoenzimas de LDH en linfocitos humanos B y T, en reposo y activados, indicaron una mayor relación con el estado de activación celular que al fenotipo(26) y los cambios en la actividad intracelular de la LDH y sus isotipos (H y M) se asociaron con la inducción de apoptosis y alteración de la membrana celular en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con linfoma, mostrando la actividad de las isoenzimas de LDH como indicador de alteraciones celulares y metabólicas, así como de marcador pronóstico (26-29).

Los estudios sobre la actividad de las isoenzimas de LDH en LNH son escasos, de allí surge nuestro interés en evaluar su utilidad pronóstica aplicada a población venezolana.

Materiales y Métodos

Población a estudiar

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). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del IOH.

Los factores pronósticos clínico-patológicos comprendieron: sexo, edad, histología del tumor (Clasificación OMS)(30), estadio clínico (Clasificación ANN ARBOR modificada en Costwolds)(31), síntomas B (fiebre, sudoración nocturna y pérdida de peso), estado funcional escala Karnofsky(32), número de regiones ganglionares, afectación extraganglionar, enfermedad voluminosa, compromiso de médula ósea, compromiso abdominal, actividad de LDH sérica y grupos de riesgo de acuerdo al IPI(5). Con fines pronósticos se clasificaron en linfomas agresivos y linfomas indolentes (1-4).

- Criterios de inclusión: Pacientes con

diagnóstico de LNH, confirmado clínica e histopatológicamente, que no hayan recibido tratamiento previo para la enfermedad, VIH negativo.

- Criterios de exclusión: Pacientes con enfermedades asociadas tipo diabetes, insuficiencia renal y otras.

Tratamiento y evolución clínica

Los pacientes se trataron con esquemas de primera línea establecidos internacionalmente para LNH (31,33) 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.

Muestras

Se realizó una sola toma por paciente al momento del diagnóstico, antes de iniciar el tratamiento. Las muestras de sangre sin anticoagulante se obtuvieron por punción venosa y se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos a 20°C para la obtención del suero respectivo. 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.

Lactato deshidrogenasa (LDH):

Método LDH-L cinético UV (Invelab Catálogo N° 89289). Valores de referencia: 80-285 U/L

Isoenzimas de LDH:

La determinación cualitativa y cuantitativa de las isoenzimas de LDH se realizó aplicando el método de electroforesis en gel de agarosa, según el procedimiento del sistema Helena Titán 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 es detectada colorimétricamente, mediante la reducción de la sal tetrazolium con la formación de una coloración formasan. 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 sérica 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: La Tabla 1 presenta los rangos referenciales correspondientes al patrón de isoenzimas de LDH, expresados en valores absolutos y porcentuales, determinados en el grupo de controles sanos (n=122), con edades comprendidas entre 18-74 años, de los cuales 60 (49%) fueron de sexo femenino y 62 (51%) de sexo masculino.

Tabla 1. Valores de referencia de los niveles séricos de las isoenzimas de LDH en el grupo de controles sanos.

Variables (n = 122)	Rango U/L	Rango (%)
LDH Total	80 - 285	
Isoenzimas LDH		
LDH1	18.4 - 71.7	18.6 - 47.7
LDH2	28.1 - 90.1	26.2 - 47.9
LDH3	14 - 47.5	11.6 - 27.2
LDH4	3.1 - 19.2	2.8 - 13.5
LDH5	2.3 - 17.2	2.0 - 12.5

LDH: Lactato Deshidrogenasa

Análisis estadístico

Se aplicaron los programas estadísticos Statgraphics Statistical, Graphics Systems Versión

6 y Graphpad Software V2 05^a Basic Statistics. Se estableció el nivel de significancia $p=0,05$.

Se realizaron los siguientes análisis estadísticos.

- Análisis exploratorio de los datos (EDA): Histograma de frecuencia para evaluar la distribución de la normalidad de los datos.
- 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.
- Análisis univariado de la sobrevida: Prueba de Log Rank
- Curva de sobrevida: Método de Kaplan Meier
- Análisis multivariado: Regresión de Cox.

Resultados

Características clínico-patológicas y biológicas de los pacientes con LNH

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). Las Tablas 2 y 3 presentan las características clínico-patológicas de los pacientes al momento del diagnóstico, antes de iniciar el tratamiento. Según los factores pronósticos adversos, la enfermedad incidió en 39(58%) pacientes del sexo masculino y 21(31%) mayores de 60 años. De acuerdo a las categorías pronósticas, 49(73%) presentaron LNH agresivos, que comprenden histológicamente a los linfomas de intermedio y alto grado de malignidad, (difuso de células grandes tipo B, células del manto, parecido al Burkitt, células grandes anaplásicas T, células T periféricas e inmunoblástico) y 18(27%) correspondieron a LNH indolentes, histológicamente de bajo grado de malignidad y crecimiento lento (folicular, linfocítico pequeño, tipo maltoma y micosis fungoides). De la población estudiada, 40(60%) presentaron estadio clínico III - IV (enfermedad avanzada), 6(9%) estado funcional alterado (Karnofsky <70%), 44(66%) enfermedad extranodal en más de un área y enfermedad voluminosa > de 10 cm. y 20(30%) presentaron más de 4 áreas ganglionares. La presencia de síntomas B, el compromiso de médula ósea y la enfermedad abdominal se detectaron en 29(43%), 14(21%) y 40(59%) de los pacientes respectivamente.

Tabla 2. Características clínico-patológicas de los pacientes con Linfoma no Hodgkin

Características	N	(%)
Edad (mediana 55, rango 18-79 años)		
≤ 60 años	46	(67)
> 60 años	21	(33)
Sexo		
Masculino	39	(58)
Femenino	28	(42)
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		
Ausente	38	(57)
Presente	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		
Ausente	53	(79)
Presente	14	(21)
Enfermedad abdominal		
Ausente	27	(41)
Presente	40	(59)
Índice Pronóstico Internacional (IPI)		
Bajo riesgo	60	(90)
Alto riesgo	7	(10)
Nº Total	67	(100)

Tabla 3. Clasificación de los pacientes con LNH de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud.

VARIABLES	Nº de pacientes	(%)
Histología (OMS)		
Difuso de células grandes	40	(60)
Células del Manto	1	(1)
Parecido al 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 fungoides	2	(3)
Nº Total	67	(100)

LNH: Linfoma No Hodgkin

OMS: Organización Mundial de la Salud

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.

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, el resto de los subtipos comprendieron el 28% de la población estudiada.

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 (80-285 U/L), de acuerdo a lo establecido en el IPI (5) para los pacientes con LNH.

Los pacientes presentaron valores absolutos de las isoenzimas LDH1, LDH2, LDH3, LDH4, LDH5 significativamente elevados en 25(37%), 29(43%), 32(48%), 20(39%) y 11(16%) de los casos respectivamente en base a los valores de referencia obtenidos (Tabla 4).

Patrón de las isoenzimas de LDH de acuerdo a las categorías pronósticas en los pacientes con LNH

Tabla 4. 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)	<0.0001
> 570	9	(13)	879	(580-1371)	
LDH1 (U/L)					
≤ 71.7	42	(63)	43	(4.5-65)	<0.0001
> 71.7	25	(37)	95	(76.9-596)	
LDH2 (U/L)					
≤ 90.1	38	(57)	55	(24.1-87)	<0.0001
> 90.1	29	(43)	163	(106.9-535)	
LDH3 (U/L)					
≤ 47.5	35	(52)	29	(16.1-44.1)	<0.0001
> 47.5	32	(48)	87	(47.6-394.2)	
LDH4 (U/L)					
≤ 19.2	41	(61)	11	(4.2-19.0)	<0.0001
> 19.2	20	(39)	31	(20.5-260.6)	
LDH5 (U/L)					
≤ 17.2	56	(84)	8.4	(3.9-16.1)	<0.0001
>17.2	11	(16)	22	(18-86.5)	

M: Mediana N: n° de pacientes (%) : Frecuencia
 p significativa = 0,05 LNH: Linfoma No Hodgkin
 p*: U Mann-Whitney LDH: Lactato deshidrogenasa

Se comparó la actividad de la LDH total y las isoenzimas de LDH entre los grupos de pacientes con LNH agresivos y LNH indolentes (Tabla 5). No se obtuvieron diferencias significativas en la actividad tanto para la LDH total como para el patrón de las isoenzimas expresada en valores absolutos (U/L) entre los tipos de linfomas. En valores porcentuales la distribución de la isoenzima LDH4 fue significativamente superior (p= 0.01) en el grupo de pacientes con linfomas agresivos en comparación con el grupo de los linfomas indolentes.

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 y se registró una respuesta global (RC+RP) de 56(84%) de los casos. La progresión de la enfermedad se registró en 11(16%) de los casos y 24(36%) fallecieron.

Análisis de la sobrevida de los pacientes con LNH en relación al perfil de las isoenzimas de LDH

Aplicamos el análisis univariado de la sobrevida en relación al perfil de las isoenzimas de LDH tanto al grupo total de los pacientes como a las categorías pronósticas (Tabla 6). En el grupo total observamos una disminución significativa de la sobrevida global asociada a valores absolutos elevados de LDH1 (>71.7U/L) comparados con el grupo de pacientes que presentaron actividad normal de la isoenzima (≤71.7U/L) (Figura 1). Posteriormente, se investigó el valor pronóstico de las isoenzimas de LDH en el grupo de los pacientes que presentaron valores normales de LDH total (≤570 U/L), según el criterio del IPI. Los resultados obtenidos (Figura 2) mostraron que en presencia de niveles normales de LDH total, los pacientes con valores absolutos elevados de LDH1 (>71.7 U/L) presentaron significativamente una menor probabilidad de sobrevida que el grupo

Tabla 5. Niveles séricos de LDH Total e Isoenzimas de LDH de acuerdo a las Categorías Pronósticas en pacientes con LNH.

Variables	LNH Indolentes N=18		LNH Agresivos N=49		*p
	(M)	Rango	(M)	Rango	
LDHT U/L	244	(121-1371)	203	(83-1217)	0.74
LDH1 U/L	55	(29.3-596)	54	(4.5-251)	0.60
%	27	(7.6-47.7)	23	(9.3-37.7)	0.12
LDH2 U/L	79	(43.5-535)	78	(24.1-432)	0.84
%	39	(24.8-45.5)	40	(26.50.2)	0.34
LDH3 U/L	40	(17.9-362)	48	(16.5-352)	0.64
%	13	(4.6-62.4)	15	(4.6-28.8)	0.55
LDH4 U/L	16	(5.5 -36.5)	16	(4.2-261)	0.31
%	5	(4.2-12.2)	7	(4-21.4)	0.01
LDH5 U/L	8	(4.2-31.5)	9	(4-86.5)	0.23
%	3.8	(0.8-9.4)	4.3	(1.8-20.5)	0.35

p significativa = 0,05

LNH: Linfoma No Hodgkin

U/L: Unidades en valor absoluto

* p : Prueba U Mann-Whitney

M: Mediana

%: Valores porcentuales

Tabla 6. Análisis univariado de la sobrevida global de acuerdo a los niveles de las isoenzimas de LDH en pacientes con LNH.

Variables	Valor Referencia	GRUPO TOTAL (n =67) SG p*	LNH AGRESIVOS (n=49) SG p*	LNH INDOLENTES (n= 18) SG p*
LDH1 U/L	≤71.7 vs.>71.7	0.0064	0.7	0.27
LDH2 U/L	≤90.1 vs.>90.1	0.13	0.9	0.32
LDH3 U/L	≤47.5 vs.>47.5	0.8	0.85	0.36
LDH4 U/L	≤19.2 vs.>19.2	0.7	0.9	0.75
LDH5 U/L	≤17.9 vs.>17.9	0.2	0.25	0.57

LDH: Lactato Deshidrogenasa

p significativa = 0.05

SG: sobrevida global

LNH: Linfoma No Hodgkin

p*: Prueba Log Rank

de pacientes con valores normales de LDH1 (≤ 71.7 U/L) ($p=0,04$), sin obtener resultados significativos para el resto de las isoenzimas (datos no mostrados).

Los pacientes con LNH agresivos presentaron una significativa disminución de la SG ($p=0,048$) asociada con niveles elevados de LDH total (Figura 3). En la Figura 4 observamos que los pacientes con LNH agresivos con IPI de alto riesgo presentaron una menor probabilidad de sobrevida global en comparación con los de IPI bajo riesgo ($p=0,0013$).

Respecto a los pacientes con LNH indolente, los niveles elevados de LDH total se asociaron significativamente con una sobrevida global más corta, no obstante, el tamaño de la muestra ($n=18$) le restó significancia a los resultados (datos no mostrados).

La distribución de los datos (vivos y fallecidos) no permitió realizar el análisis univariado para la SLE.

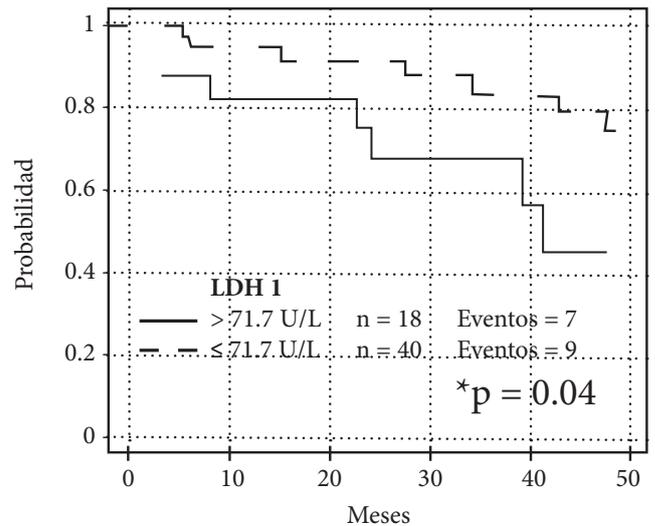


Figura 2. Curva de sobrevida global de acuerdo a los niveles de la isoenzima LDH1 (U/L) en pacientes con valores normales de LDHT (≤ 570 U/L).

Método Kaplan Meier
 *p: Análisis univariado Prueba Log Rank
 Tiempo de seguimiento: 3 a 48 meses
 LDH: Lactato deshidrogenasa
 LNH: Linfoma No Hodgkin

p significativa = 0.05
 N: Número pacientes
 Eventos: Fallecidos

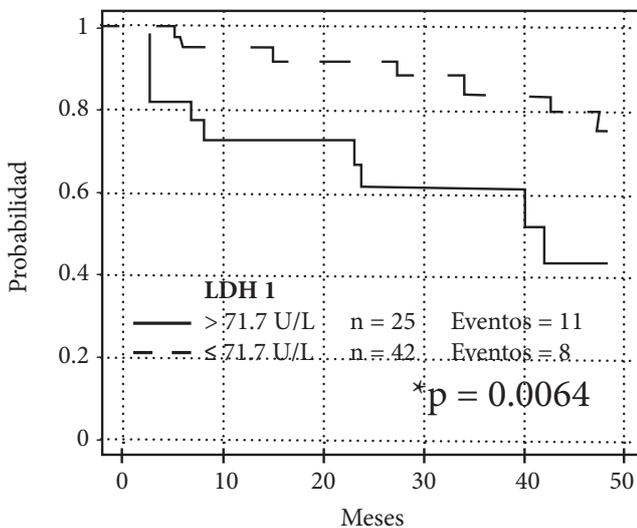


Figura 1. Curva de sobrevida global de acuerdo a los niveles séricos (U/L) de la isoenzima.

LDH1 en el grupo total de pacientes con LNH
 *p: Análisis univariado Prueba Log Rank
 Tiempo de seguimiento: 3 a 48 meses
 LDH: Lactato deshidrogenasa
 LNH: Linfoma No Hodgkin

Método Kaplan Meier
 p significativa = 0.05
 N: Número pacientes
 Eventos: Fallecidos

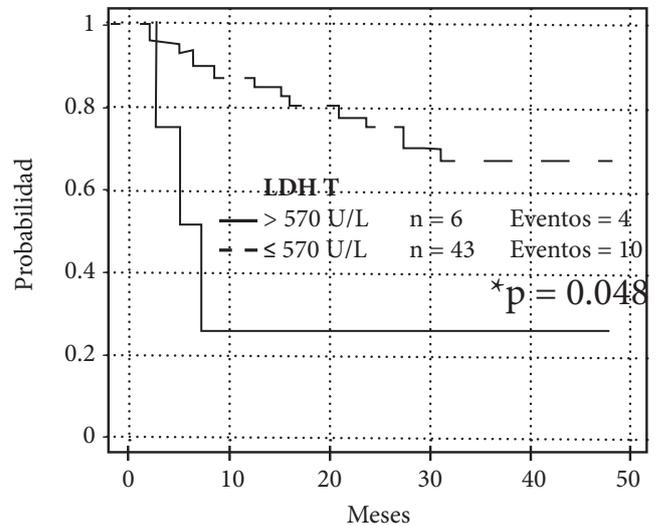


Figura 3. Curva de la sobrevida global de acuerdo a los niveles de LDH Total en pacientes con LNH agresivos.

LDH1 en el grupo total de pacientes con LNH
 *p: Análisis univariado Prueba Log Rank
 Tiempo de seguimiento: 3 a 48 meses
 LDH: Lactato deshidrogenasa
 LNH: Linfoma No Hodgkin

Método Kaplan Meier
 p significativa = 0.05
 N: Número pacientes
 Eventos: Fallecidos

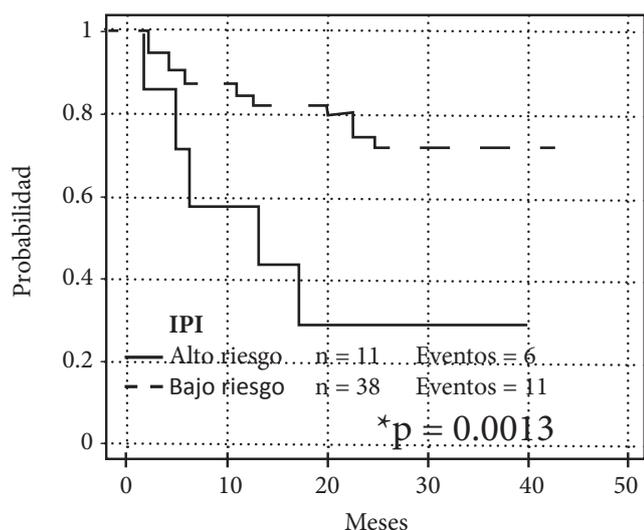


Figura 4. Curva de la Sobrevida global de acuerdo al IPI en pacientes con LNH agresivos.

IPI: Índice Pronóstico Internacional. Método Kaplan Meier
 *p: Análisis univariado Prueba Log Rank p significativa = 0.05
 Tiempo de seguimiento: 3 a 48 meses N: Número pacientes
 LDH: Lactato deshidrogenasa Eventos: Fallecidos
 LNH: Linfoma No Hodgkin

En el análisis multivariado, tanto la significancia pronóstica de la LDH total (p= 0.04) como la del IPI (p= 0.008), demostraron ser estadísticamente independientes de la sobrevida (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis multivariado de la sobrevida global en pacientes con LNH agresivos

Variables	Condición	SG (p*)
LDHT	≤570 U/L vs. >570 U/L	0.04
IPI	Bajo riesgo vs. Alto riesgo	0.008

p significativa = 0.05 p*: Regresión de Cox.
 LDH: Lactato Deshidrogenasa SG: Sobrevida global
 LNH: Linfoma No Hodgkin IPI: Índice Pronóstico Internacional

Discusión

En el presente estudio se evaluaron 67 pacientes con LNH, de primera consulta, siguiendo las pautas internacionales establecidas para el abordaje de la enfermedad. Se determinaron los marcadores pronósticos clinicopatológicos y biológicos al

momento del diagnóstico, antes de iniciar el tratamiento y se categorizaron en grupos de riesgo según el IPI para la aplicación del tratamiento.

En relación a los factores clínico-patológicos adversos, nuestros resultados coinciden con los reportes internacionales (1-4, 31,33). En este sentido, se observó una mayor incidencia en el sexo masculino, el tipo histológico más frecuente fue el LDCGB, el más común de los linfomas agresivos, seguido del linfoma folicular, el más común de los linfomas indolentes. De acuerdo a las categorías pronósticas predominaron los linfomas agresivos sobre los indolentes. No obstante, respecto a la edad, en nuestro estudio la mayor frecuencia de la enfermedad incidió en el grupo etario menor de 60 años, a diferencia de lo reportado en la literatura, según la cual la incidencia incrementa con la edad y representa un factor pronóstico independiente e importante ya que va asociado con una mayor morbimortalidad (1-5,8), en tal sentido el tamaño de la muestra ha podido influir en la incidencia etaria.

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 (5,6) y más recientemente a partir del año 2004, se ha propuesto la aplicación del FLIPI para los linfomas foliculares (34) y el R-IPI para los linfomas agresivos (35). 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 60(90%) correspondió al grupo de bajo riesgo (riesgo bajo e intermedio bajo) y solo 7(10%) de alto riesgo (intermedio alto y alto riesgo).

El valor sérico de la LDH es uno de los factores pronósticos independientes que mayor información aporta en los diferentes tipos de LNH, hasta el punto que actualmente es considerado como dato imprescindible para definir el pronóstico de un paciente. El 13% de los pacientes cursaron con alteración de la actividad de LDH (> 570 U/L), en base a una actividad enzimática mayor del 100% del valor superior del rango de referencia según el criterio establecido en el IPI(5), este bajo porcentaje pudiera estar influenciado por el tamaño de la población estudiada.

En la práctica clínica los LNH se clasifican en

linfomas agresivos y linfomas indolentes. Esta categorización está basada en las características histomorfológicas del tumor, así como la velocidad del crecimiento tumoral, determinando las diferencias en cuanto a la evolución de los pacientes y en la toma de decisiones terapéuticas (36). Cuando comparamos el perfil de isoenzimas de LDH entre las categorías pronósticas solo detectamos cambios significativos en el patrón de LDH4, cuyo porcentaje elevado se asoció con los linfomas agresivos, coincidiendo con los resultados de Riccerca y col. (22). Dumontet y col. (23) reportaron una mayor frecuencia de niveles incrementados de la isoenzima LDH3 asociados con los linfomas agresivos. Las alteraciones en el patrón de expresión de la LDH4 han sido asociadas más frecuentemente a patologías malignas y nos indicaría una tendencia hacia una actividad metabólica anaeróbica del tumor, aun cuando la LDH3 sea la de mayor frecuencia en los órganos linfoides (19). Por otra parte, los anteriores autores (23) compararon los valores de frecuencia y en nuestro caso comparamos la actividad enzimática, tanto en valor absoluto como en porcentaje. Los estudios de Jurisic y col. (26) sobre las alteraciones de la actividad de la LDH total y su perfil isotípico en CMSP de pacientes con LH y LNH, señalaron un incremento de la LDH intracelular y del isotipo M, así como la asociación de los valores de la LDH liberada espontáneamente con la progresión de la enfermedad y el grado de malignidad tumoral en los pacientes con LNH. La elevación de la actividad de la LDH se debió al predominio de la forma isotípica M más que la H. También demostraron una correlación positiva entre la actividad de la LDH total liberada espontáneamente por las células y el nivel de la LDH total sérica, siendo que la elevación de la LDH espontánea precede al incremento de la LDH total sérica en ambas enfermedades. Estos autores evidenciaron alteraciones intracelulares metabólicas en las CMSP de los pacientes con LNH. El aumento de la LDH estaría asociado a una cascada de activación programada durante el proceso de la activación linfocitaria. Además de las alteraciones intracelulares, la actividad isotípica y la LDH total liberada espontáneamente fueron dependientes del grado de malignidad histológica y de la expansión tumoral en los pacientes con LNH. Recientemente, en otro trabajo se evidenció que la liberación espontánea de la LDH se produce previamente al incremento de la LDH sérica y

los niveles de la LDH liberada espontáneamente fueron significativamente superiores en los LNH tanto en estadios tempranos como en los avanzados respecto a los controles sanos(28).

En el presente trabajo nuestro principal hallazgo refleja las alteraciones del comportamiento del perfil de las isoenzimas de LDH en los pacientes con LNH al momento del diagnóstico y su significancia pronóstica. Valores absolutos incrementados de la isoenzima LDH1 (>71.7U/L) resultaron predictivos de una sobrevida global más corta en el grupo total de los pacientes con LNH, no obstante perdió la significancia cuando el análisis se realizó para las categorías pronósticas, esto probablemente influenciado por la heterogeneidad histológica del tumor y el tamaño de la muestra. Por otro lado, también observamos que la distribución del perfil de las isoenzimas entre las dos categorías tampoco mostró diferencias significativas.

Es también interesante observar que la LDH1 mantuvo su valor pronóstico aun cuando se consideró el grupo de pacientes con los valores normales de LDH total considerados en el estudio (≤ 570 U/L). A diferencia de nuestros resultados, Dumontet y col. (23) y Bouaifa y col (24) reportaron los incrementos en el porcentaje de LDH2 y el valor absoluto de LDH3 asociados a una menor sobrevida global, sugiriendo la posibilidad de que el incremento de los valores de la LDH3 reflejen la masa tumoral en pacientes con LNH y la LDH2 bien pudiera ser producida por el propio tumor o como respuesta del paciente frente a la enfermedad. En relación al análisis univariado para la SLE, la distribución de la muestra y el número limitado de pacientes, fueron limitantes para su determinación, incidiendo tanto para la LDH total como para las isoenzimas de LDH.

La literatura es consistente sobre la aplicación de la isoenzima LDH1 como marcador tumoral en los tumores de células germinales, siendo su utilidad en el estadiaje, predicción del pronóstico y monitoreo en pacientes con cáncer testicular. A su vez la clasificación de sus niveles en tres rangos de valores (normales, elevados y muy elevados) tiene implicaciones pronósticas para los pacientes con tumores metastásicos de células germinales del testículo. Una serie de reportes sugieren su preferencia sobre la LDH total como marcador de rutina, no obstante, aún no se han establecido los lineamientos sobre el uso rutinario de la

LDH1 como marcador tumoral en los pacientes con este tipo de tumor (37,38). Las diferencias en el patrón de isoenzimas de LDH pueden ser explicadas debido a las aberraciones genéticas en la transformación maligna de las células germinales del testículo. El incremento de la LDH1 sérica en los pacientes con esta neoplasia se ha asociado con el número elevado de copias del brazo corto del cromosoma 12 (12p). La relación entre 12p y LDH1 sérica en los tumores de células germinales de testículo explicaría su significancia pronóstica, a diferencia de la LDH5 sérica que no presenta alteraciones (38).

Recientemente otros autores han reportado niveles séricos de LDH-B (H) en pacientes con cáncer de pulmón (no de células pequeñas). Los niveles de LDH-B se determinaron por ELISA y resultaron significativamente elevados en comparación con los pacientes que presentaron enfermedades benignas del pulmón, controles sanos y otros tipos de cáncer (prostático, esófago y laringe) y, además, sus niveles se incrementaron progresivamente con el estadio clínico, sugiriendo que los niveles de LDH-B pudieran asociarse con el cáncer de pulmón (39).

En LNH no se han descrito alteraciones cromosómicas asociadas con las isoenzimas de LDH. Por otra parte, se ha descrito la modulación de las isoenzimas de LDH por efecto de la base modificada queuina en tejidos de ratones normales y cancerosos con tumor ascítico de linfoma de Dalton (DLA) que corresponde a un linfoma de células T. El tratamiento con queuina produce una disminución de las isoenzimas anaeróbicas A4 (M4) de LDH, sugiriendo que la queuina suprime la vía glucolítica anaeróbica conduciendo a la supresión tumoral en los ratones DLA (40). En los mamíferos la base libre q o Q-tRNA podría estar involucrada en la regulación adaptativa del metabolismo glicolítico en condiciones anaeróbicas o aeróbicas. El incremento de la expresión de LDH-A (M) regulada por C-Myc ha sido bien documentada en una variedad de células tumorales incluyendo fibroblastos y linfoma de Burkitt. La elevación en la actividad de LDH y los niveles de los productos de los oncogenes c-Myc y c-Fos pudieran conducir a la promoción de malignidad, así se observó que en los ratones DLA la actividad de LDH y los niveles de c-Myc y c-Fos fueron regulados negativamente por la base

modificada queuina (41).

Por su parte, Pan y col. (42) proveen evidencias de una significativa asociación entre el incremento de la actividad celular de las isoenzimas de LDH y la actividad proliferativa celular, examinando la expresión de las isoenzimas de LDH tipo H y M por métodos inmunohistoquímicos en células linfoides en reposo y activadas, representando diferentes estadios del ciclo celular, así como la expresión de las isoenzimas en una variedad de células linfoides. Al determinar la expresión de los isotipos H y M observaron que las células provenientes de las leucemias linfocítica y prolinfocítica, morfológicamente similares a los linfocitos normales, mostraron un patrón similar al de los linfocitos B en reposo, mientras que los linfoblastos de la leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B de alto grado y líneas celulares transformadas, mostraron un patrón similar al de linfocitos T o B activados. Estos resultados demuestran una significativa correlación entre la expresión de LDH y la actividad proliferativa de las células y pudieran explicar por qué la actividad de la LDH sérica en pacientes con malignidades es útil para la predicción de la extensión de la enfermedad y la respuesta a la terapia.

Otros estudios in vitro, reportaron una actividad elevada de LDH-M en CMSP de pacientes con LNH, previo a la administración de quimioterapia, la cual no disminuyó después del tratamiento de estas células con TNF- α , mostrando efectos opuestos en comparación con las CMSP de controles sanos. La determinación del isotipo de LDH pudiera ser un parámetro de utilidad para la diferenciación o activación celular. En células neoplásicas o células linfoides transformadas, la LDH-H ha sido reportada como un marcador de diferenciación progresivamente expresado durante la maduración de células T y de la diferenciación terminal de líneas celulares mieloides, pero más relacionado a la proliferación celular que a la especificidad con algún tipo de malignidad (28).

En el presente trabajo la elevada actividad de la isoenzima LDH1 se expresó como un factor pronóstico adverso de la supervivencia global, probablemente como expresión de una elevada actividad proliferativa del tumor. Así, ya hemos mencionado que el patrón LDH1>LDH2 puede también observarse en pacientes con cáncer y las isoenzimas LDH1, LDH2 y LDH3

podrían ser marcadores importantes en discrasias hematológicas y otras malignidades (14). Las elevaciones de LDH en los desórdenes hematológicos se relacionan primariamente con la capacidad proliferativa del tumor, probablemente siendo el origen de la enzima proveniente de los propios leucocitos neoplásicos y del tejido circundante (28). La LDH refleja la disrupción de la membrana celular de una importante fracción de células malignas en división, siendo posible que la LDH liberada espontáneamente de las CMSP también contribuyan al nivel sérico de la misma, esto soportado por la hipótesis de que la LDH pudiera provenir de fuentes no tumorales (29). La regulación de las subunidades de LDH es multifactorial (hipoxia, proteínas-quinasa, hormonas, factores de crecimiento, nucleótidos), siendo probable también la participación de las citoquinas inflamatorias (16,23).

Los resultados obtenidos respecto al valor pronóstico de los niveles séricos de la LDH en el análisis de la supervivencia global son consistentes con la literatura (5,12,31,33) ya que se asociaron con una menor probabilidad de supervivencia global, tanto en los pacientes con LNH agresivo como indolente, a pesar del bajo número de pacientes en la categoría indolente e igualmente, se confirmó su significancia como marcador pronóstico independiente en el análisis multivariado de la supervivencia.

Respecto al IPI, confirmamos su valor pronóstico establecido en la literatura como modelo predictivo para los LNH agresivos (5,12) y se categorizaron cuatro grupos de riesgo que luego se agruparon en bajo riesgo y alto riesgo para poder reunir un mayor número de pacientes en los análisis estadísticos. Así observamos las diferencias significativas en el análisis univariado de la supervivencia global entre los grupos de bajo riesgo y alto riesgo y también su valor pronóstico independiente en el análisis multivariado de la supervivencia en el grupo de los pacientes con LNH agresivos. Si bien el IPI es válido para todos los subtipos de LNH (6), en nuestro estudio el análisis de la SG en los pacientes con LNH indolentes no mostró significancia pronóstica, probablemente influenciado por el tamaño de la muestra (datos no mostrados).

El IPI ha sido de utilidad en la predicción de la

evolución de los pacientes tanto con linfomas agresivos como los de bajo grado de malignidad (10). Desde 1970, el tratamiento estándar para el linfoma difuso de células B ha sido el CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona) y basados en el IPI se clasificaron los cuatro grupos de riesgo con su respectiva supervivencia (5). Con el advenimiento de nuevas estrategias de tratamiento, como lo es la adición de rituximab (anti CD 20) al CHOP, se ha mejorado la supervivencia de los pacientes, planteando la necesidad de reevaluar la relevancia de los factores pronósticos utilizados para el IPI, ya que la utilidad de las características clínicas como factores pronósticos es dependiente de la eficacia de un tratamiento específico (35).

Respecto a las isoenzimas, la interpretación de los resultados en valores porcentuales o valor absoluto 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 cuando se comparan los resultados con otros trabajos reportados en la literatura.

Las isoenzimas de LDH podrían ser marcadores importantes en discrasias hematológicas y otras malignidades, no obstante, la interpretación de sus valores debe hacerse con el entendimiento de que algunas isoenzimas sean indicadores de alteraciones celulares y metabólicas, mientras que otras estén asociadas al pronóstico de la enfermedad (43).

Conclusiones

En el presente trabajo se detectaron alteraciones específicas en el patrón de isoenzimas de LDH que sugieren la relación de la isoenzima LDH4 con la biología del tumor y su actividad proliferativa en LNH agresivos y el valor pronóstico de la LDH1 como factor adverso de la supervivencia en el análisis univariado en el grupo total de los pacientes. Se confirmó el valor pronóstico independiente de la LDH total sérica y la utilidad del IPI.

Es recomendable evaluar las alteraciones del patrón de las isoenzimas de LDH que pudieran complementar el valor pronóstico de la LDH total sérica, considerando poblaciones de mayor tamaño y desarrollar estudios longitudinales asociados

con la respuesta de los pacientes al tratamiento, tanto en LNH como en otras malignidades.

Agradecimientos

Al Profesor Leovigildo García (Profesor Jubilado de la UCV) por la asesoría estadística.

A la Fundación Badán por la colaboración en el financiamiento del estudio estadístico.

Al Grupo Evo-Lab C.A por la donación de los reactivos para 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 Rosenberg. 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. Vose JM, Chiu BC, Cheson BD, Dancey J, Wright J. Update on Epidemiology and Therapeutics for Non-Hodgkin's Lymphoma. Hematology. 2002(1): 241-45.
4. Chiu B, Weisen B. An update of epidemiology of Non Hodgkin's Lymphoma. Clin Lymphoma. 2003; 4(3): 161-68.
5. 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.
6. 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.
7. Sehn LH, Berry B, Chhanbhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. Blood. 2007;109:1857-61.
8. Nicolaidis C, Dimou S, Pavlidis N. Prognostic factors in aggressive Non-hodgkin's Lymphomas. The Oncologist. 1998; 3: 189-97.
9. 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.
10. Moore DF, Cabanillas F. Overview of prognostic factors in Non-Hodgkin's lymphoma. Oncology 1998; 12 (10 suppl 8): 17-24.
11. Morra E. The biological markers of Non-Hodgkin's Lymphomas: Their role in diagnosis, prognostic assessment and therapeutic strategy. The International Journal of Biological Markers. 1999; 14 (3): 149-53.
12. Montserrat E. Prognostic factors in aggressive lymphoma. The contribution of novel markers. Ann Hematol. 2001; 80: B42 - B44.
13. 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.
14. Schwartz M. Lactic dehydrogenase. An old enzyme reborn as a cancer marker? A.J.C.P. 1991; 96 (4): 441- 43.
15. Dawson DM, Goodfriend ThL, Kaplan N. Lactic dehydrogenases: function of the two types. Science. 1964; 43:929-33.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.

20. Paule B, Frnacoual J, Lindenbaum C, Derrieux C, Russo C, Gerbet D, et al. Lactate dehydrogenase isoenzyme activity in malignant haematological diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 1984;38:62-65.
21. 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.
22. 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.
23. Dumontet C, Drai 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. *Leukaemia* 1999; 13 (65):811-17.
24. Bouafia F, Drai 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.
25. Coiffier B, Bastion Y, Berger F, Felma p, Bryon PA. Prognostic factors in follicular lymphoma. *Sem Oncol.* 1993; 20: 89-95.
26. 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.
27. Jurisic V. Estimation of cell membrane alteration after drug treatment by LDH release. *Blood* 2003;101(7):2894
28. 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. *Medical Oncology* 2004; 21(2): 179-85.
29. 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.
30. 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.
31. Feldman AL, Pittaluga S, Jaffe ES. Clasification and Histopatology of the lymphomas. En: Canellos GP, Lister TA, Young B, editors. *The Lymphomas. Second Edition.* Saunders Elsevier; 2006. p. 2-38.
32. Schag CC, Heinrich RL, Ganz PA. Karnofsky performance status revisited: Reliability, validity and guidelines. *J Clin Oncol.* : 1984; 2:187-193.
33. Evans LS, Hancock BW. Non Hodgkin lymphoma. *Lancet* 2003; 382:139-46
34. 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.
35. 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. *Leukaemia & Lymphoma.* 2008; 49(3):462-69.
36. Armitage JO. Staging Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer J Clin.* 2005; 55:368-76.
37. Von Eyben FE. A systematic review of lactate dehydrogenase isoenzyme 1 and germ cell tumors. *Clinical Biochemistry* 2001; 34: 441-54.
38. Von Eyben FE. Serum lactate dehydrogenase isoenzyme 1 and relapse in patients with nonseminomatous testicular germ cell tumors clinical stage I. *Acta Oncologica* 2001, 40(4): 536-40.
39. Chen Y, Zhang H, Xu A, Li N, Liu J, Liu Ch, et al. Elevation of serum L-lactate dehydrogenase B correlated with the clinical stage of lung cancer. *Lung Cancer* 2006; 54:95-102.
40. Pathak Ch, Vinayak M. Modulation of lactate dehydrogenase isozymes by modified base queine. *Molecular Biology Reports* 2005; 32:191-96.
41. 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 Biology & Therapy* 2008; 7(1):85-91.
42. 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.
43. 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.

INFLUENCIA DE LA DIETA SOBRE LAS ACTIVIDADES FOSFORILADORAS DE GLUCOSA EN HÍGADO E INTESTINO DE RATA

Beatriz De La Torre

Laboratorio de Bioquímica Nutricional y Metabolismo, Centro de Biología Celular
Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela

Recibido para publicación mayo 2013. Aprobado para publicación julio 2013.

RESUMEN:

La fosforilación de la glucosa en los mamíferos, es catalizada por una familia de isoenzimas (hexoquinasa I-IV; HQ) de diferente K_m para el azúcar. En los hepatocitos y células b-pancreáticas se encuentra la glucoquinasa (GQ; HQ IV) de K_m elevado (12-20 mM). Hemos observado que GQ está presente en el intestino delgado y podría contribuir a la producción de lactato durante la absorción del azúcar. En este trabajo se determinó el efecto de la dieta (ratarina R; 60% de glucosa G; sacarosa S; almidón A; caseína C), suministrada ad libitum, sobre las actividades de HQ y GQ en homogenatos de hígado y mucosa intestinal de rata. El suministro de glucosa (5%) en el agua de beber (SG) también fue evaluado en las dietas con R y G. Las actividades de HQ (Glucosa 1 mM) y la capacidad fosforilativa total (CFT: Glucosa = 100 mM) se determinaron enzimáticamente. GQ se estimó por diferencia. En el grupo control (R) y en S, A y C, la GQ hepática fue un 85% de la CFT, mientras que en G, GSG y RSG un 66%. La HQ intestinal alcanzó en los grupos R, GSG, A y C un 87% y en RSG un 30% de la CFT. La GQ en G, S, aumentó, pero una menor magnitud. La presencia de GQ en el intestino delgado y su expresión diferencial de acuerdo a la dieta, abren la posibilidad de que dicho órgano contribuya al metabolismo inicial de la glucosa procedente de la dieta y provea al hígado de un precursor (lactato) muy eficaz para sus procesos anabólicos.

Palabras claves: Intestino delgado, glucoquinasa hepática, glucoquinasa intestinal, dieta.

INFLUENCE OF DIET ON GLUCOSE PHOSPHORYLATING ACTIVITY OF RAT LIVER AND SMALL INTESTINE

SUMMARY

Glucose phosphorylation in mammals, is catalyzed by a family of isoenzymes (hexokinases I- IV; HQ) of different K_m for the sugar. In hepatocytes and pancreatic b- cells are glucokinase (GQ ; HQ IV) of high K_m (12-20 mM). We observed that GQ is present in the small intestine and may contribute to the production of lactate during the absorption of sugar. In this work, the effect of diet (ratarina R, G 60 % glucose, sucrose S; starch A; casein C) provided ad libitum , on the activities of HQ and GQ in liver homogenates of rat intestinal mucosa . The supply of glucose (5%) in the drinking water (SG) was also evaluated in the diets with R and G. HQ activities (Glucose 1 mM) and phosphorylating full capacity (CFT : Glucose = 100 mM) were determined enzymatically . GQ was estimated by difference. In the control group (R) and S, A and C, the GQ liver was about 85% of CFT, whereas G, GSG and RSG 66%. The intestinal HQ reached in the R groups, GSG, A and C by 87 % and 30% RSG the CFT. The GQ in G, S , increased , but a lower magnitude. the presence of glucokinase in the small intestine and its differential expression according to diet, open the possibility that this structure contributes to initial metabolism of glucose and provide to the liver a precursor (lactate) very effective for their anabolic processes.

Keywords: Small intestine, liver glucokinase, intestinal glucokinase, diet.

Introducción

Los carbohidratos son los principales componentes de la dieta. Entre ellos, los almidones y el azúcar de mesa son los más importantes para los humanos. Así, un hombre de 70 Kg de peso debe digerir y asimilar 350-400 g de carbohidratos al día. Durante la digestión, los carbohidratos de la dieta son convertidos en glucosa, la cual se absorbe en la zona distal del ileon y en el yeyuno. Tradicionalmente se ha considerado que, después

de la absorción, el monosacárido es translocado, intacto, a través de la mucosa intestinal, hasta la sangre, quedando disponible para ser usada, por el hígado y otros órganos, como fuente de energía y como precursor para la síntesis de glucógeno y ácidos grasos (1-2).

Múltiples reportes señalan que los enterocitos, además de la maquinaria para absorber y translocar al plasma el azúcar de la dieta, poseen el complemento completo de enzimas glucolíticas

Solicitar copia a: Beatriz de la Torre (beatorre@hotmail.com)

(3). En consecuencia, durante la asimilación de la glucosa ocurre la partición del azúcar que ingresa a los enterocitos (Figura 1) entre su transporte al plasma (con participación del transportador GLUT 2) o su conversión a lactato (maquinaria glucolítica) (2,4).

Aunque el escenario planteado en la Figura 1 es ampliamente aceptado, existe discrepancia en relación con la proporción del azúcar que es metabolizada a lactato, reportándose desde valores insignificantes hasta otros superiores al 75%. Parte de esta discrepancia se ha atribuido a deficiencias en la oxigenación del tejido (2), llegándose, en ocasiones, a diseños experimentales que enfatizan un estado de hiperoxigenación (5) que puede carecer de sentido fisiológico.

Se ha determinado que el hígado posee una limitada capacidad para utilizar la glucosa de la sangre, prefiriendo a los sustratos gluconeogénicos (piruvato, alanina, glutamina y glicerol) para la síntesis del glucógeno y los ácidos grasos. Se ha estimado que, al menos, 2/3 de la glucosa proveniente de la dieta debe transformarse en un intermediario de 3 carbonos, presumiblemente el lactato, antes de que se la pueda incorporar en el glucógeno (6,7,8).

Un problema por resolver de la “teoría de la ruta indirecta de síntesis del glucógeno” es el sitio, o sitios, dónde ocurre la transformación inicial de la glucosa en lactato. El intestino delgado aparece como un lugar de alto potencial, ya que posee todo el complemento enzimático de la glucólisis y muestra una elevada tasa de producción de lactato,

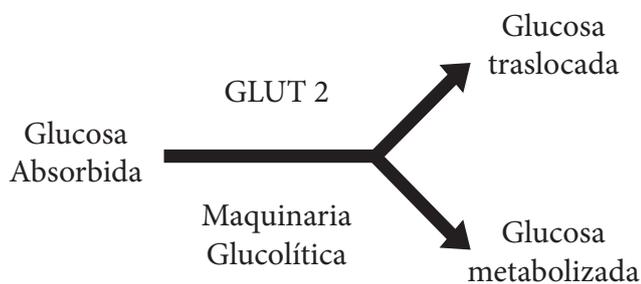


Figura 1. Partición de la glucosa absorbida en el enterocito.

bajo condiciones aeróbicas, durante la absorción de la glucosa y su translocación a la sangre.

La hipótesis central de este estudio considera la posibilidad de que el intestino delgado contribuya al metabolismo inicial de la glucosa procedente de la dieta y provea al hígado de un precursor como el lactato, utilizado con alta eficiencia para el anabolismo hepático.

Materiales y Métodos

Animales:

En los experimentos se utilizaron ratas macho de la cepa *Sprague-Dawley*, con un peso inicial cercano a los 125 g provenientes del bioterio del Instituto de Medicina Experimental de la Universidad Central de Venezuela o del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”.

Dietas:

En relación con las dietas, el carbohidrato a probar (glucosa, almidón, sacarosa o una dieta sin carbohidratos a base de caseína) se utilizó en una cantidad igual al 60%, junto con almidón: 13.6%, caseína (libre de vitaminas): 15%, aceite de maíz: 5%, mezcla de minerales: 5% (Mineral Mix, AIN-76 # 170915), 0.3% de DL-metionina y mezcla de vitaminas (Vitamin Mix A.O.A.C. # 40055). Se tuvo un grupo control el cual fue alimentado con dieta comercial no purificada, ratarina (Purina; Valencia, Venezuela). Todos los grupos experimentales fueron mantenidos a temperatura ambiente, en jaulas individuales en el bioterio del Instituto de Medicina Experimental de la U.C.V. El período de luz fue de 12 horas. Los mismos se mantuvieron alimentados por un tiempo mínimo de 21 días, con libre acceso al alimento (*ad libitum*) y al agua de beber. En algunos experimentos, al agua de beber se le añadió 5% de glucosa.

Obtención de homogenato hepático y mucosa intestinal:

Antes de ser sacrificadas las ratas se anestesiaron con éter dietílico, por medio de gasas impregnadas con este compuesto y colocadas en un desecador completamente cerrado, dentro del cual se encontraba el animal.

La obtención del homogenato hepático se hizo extirpando el hígado del animal, se pesó y posteriormente se pasó por un molino mecánico manual. El material obtenido fue diluido en el buffer de extracción, utilizando una relación $\frac{1}{4}$

(p/v), y colocado en un homogenizador tipo Potter Eveljhem, para homogeneizarlo con 8 a 10 pases en frío. El homogenato obtenido se centrifugo a una velocidad de 15.000 x g por un tiempo de 30 min (4°C) (9). Finalizada esta etapa, se procedió a eliminar la capa sobrenadante de naturaleza lipídica y se tomó el resto del sobrenadante para realizar las determinaciones enzimáticas. Para la obtención de la mucosa intestinal, se procedió a tomar un segmento del intestino representativo del yeyuno, el cual fue abierto longitudinalmente, procediendo a obtener la mucosa por raspado con un portaobjeto.

Determinación de la actividad in vitro de la glucoquinasa y hexoquinasa:

El sobrenadante post-mitocondrial de mucosa intestinal e hígado se usó para determinar, espectrofotométricamente, la actividad de hexoquinasa (H) y la capacidad fosforilativa total (hexoquinasa + glucoquinasa) (CFT); la actividad de glucoquinasa (G) se estimó por diferencia.

Las mezclas de reacción contenían en un volumen final de 1.036 mL los siguientes componentes: glucosa (1 mM para la hexoquinasa ó 100 mM para la capacidad fosforilativa total = hexoquinasa + glucoquinasa), ATP (5 mM), MgCl₂ (10mM), NAD (1 mM), glucosa 6-P deshidrogenasa (NAD dependiente) (5 U) y buffer Tris (0.1 M, pH 7.2). Para los ensayos se añadieron a las cubetas 0.1 mL de los respectivos sobrenadantes a 15.000 x g, diluidos apropiadamente (10,11).

Las reacciones se iniciaron con la adición de la glucosa, realizándose las lecturas a 340 nm. La actividad de glucoquinasa se estimó substrayendo la actividad de hexoquinasa de la capacidad fosforilativa total.

Una unidad de hexoquinasa o de glucoquinasa corresponde a la fosforilación de 1 μmol de glucosa por minuto a 37°C, determinado a través de la reducción de 1 μmol de NAD en la reacción de la glucosa-6-P deshidrogenasa de *L. mesenteroides*.

Resultados

Efecto de la dieta sobre las actividades de fosforilación de glucosa hepáticas e intestinales

En las células de mamíferos la fosforilación de la glucosa es catalizada por una familia de isoenzimas, denominadas hexoquinasas (HQ; ATP:D-hexosa-

6-transferasa; EC 2.7.1.1). La fosforilación del azúcar es una reacción termodinámicamente desfavorable, en la que el grupo fosfato procedente del ATP es transferido al grupo hidroxilo libre del carbono 6. Las hexoquinasas difieren en muchas de sus propiedades catalíticas y exhiben además una variada distribución tanto a nivel intracelular como tisular (12). En mamíferos, se han caracterizado cuatro isoenzimas: las hexoquinasas I, II, III y IV de acuerdo a su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida (13); la hexoquinasa IV es comúnmente conocida como glucoquinasa (GQ).

A diferencia de las otras HQ, GQ presenta una baja afinidad por la glucosa, una curva de saturación sigmoidal para este sustrato, con un coeficiente de Hill de aproximadamente 1.5 y es inhibida por una proteína reguladora, así como también por acyl-CoAs de cadena larga (11, 12,13).

Estudios realizados en mucosa del yeyuno de rata (14) evidenciaron la existencia de las cuatro isoenzimas en este tejido; señalándose que la HQ IV ó GQ tenía un comportamiento electroforético similar a la enzima hepática. No obstante, los grupos que, utilizando metodologías más modernas, han estudiado la distribución tisular de GQ, la reportan sólo en el hígado y páncreas (11,15). Hasta la fecha no se ha determinado si la actividad de GQ de la mucosa intestinal tiene un comportamiento cinético similar a la del hígado; de ser así, los enterocitos tendrían en común con los hepatocitos y las células β del páncreas, la expresión de los genes que codifican para GQ (16) y el transportador GLUT 2 (17), dos componentes de la maquinaria enzimática del metabolismo de los carbohidratos a los cuales se les asigna una relevancia especial en el control de la glicemia.

En general (Tabla 1), para todas las dietas la CFT del intestino fue mayor que la del hígado, con excepción de la dieta de glucosa. La GQ es la enzima que hace la mayor contribución a la CFT hepática, fluctuando entre el 66% (Glucosa) y el 93% (Sacarosa). En contraste, en el intestino, la HQ hace la mayor contribución a la CFT, mientras que GQ tuvo una contribución menor que fluctuó entre el 2% (Ratarina) y el 23% (Sacarosa). Los más bajos niveles de CFT, HQ y GQ, tanto en el intestino como en el hígado, se encontraron en los animales alimentados con la dieta a base de caseína (75%). Ello sugiere que altos niveles de carbohidratos en la dieta inducen a las enzimas de fosforilación de

Tabla 1. Efecto de la dieta sobre las actividades de fosforilación de la glucosa en intestino e hígado de rata.

Tejido	Dieta	CFT	HQ	GQ
Intestino	Ratarina	5.82	1.04	5.70
		0.51	0.12	0.08
	Glucosa	4.62	0.45	3.83
		0.38	0.79	0.20
	Sacarosa	2.86	0.20	2.21
		0.11	0.65	0.08
	Almidón	3.15	0.15	2.76
		0.14	0.39	0.04
	Caseína	1.55	0.22	1.20
		0.17	0.35	0.02
Hígado	Ratarina	1.97	0.47	0.40
		0.05	1.57	0.21
	Glucosa	4.52	0.70	1.45
		0.17	3.07	0.49
	Sacarosa	1.96	0.18	0.12
		0.03	1.84	0.18
	Almidón	2.1	0.21	0.42
		0.07	1.68	0.22
	Caseína	1.44	0.04	0.19
		0.02	1.25	0.22

Las actividades se expresaron como nmol de glc/mg prot./min. Los valores en cada celda corresponden a la media ± error estándar (n=4). CFT: Capacidad fosforilativa, HQ: Hexoquinasa, G: Glucoquinasa

la glucosa. El hecho de que el mencionado efecto de la caseína se haya manifestado en el intestino es una evidencia indirecta de que este órgano puede jugar un papel importante en el metabolismo inicial de la glucosa proveniente de la dieta.

Igualmente sugestiva resulta la respuesta tisular en los animales alimentados con sacarosa. Este tratamiento produjo los mayores valores relativos para la actividad de GQ: 94% en el hígado y 23% en el intestino. A manera de especulación, podría pensarse que, la fructosa derivada del disacárido promueve, a través de su interacción con la proteína reguladora de la GQ, el incremento de esta isoenzima en el citoplasma de los hepatocitos y los enterocitos. Se ha reportado que la proteína reguladora secuestra a la GQ en el núcleo, liberándola cuando aumenta la concentración intracelular de Fructosa -1P (18). Así, si la GQ intestinal muestra propiedades similares a la del hígado, ello pudiese explicar porqué se observan

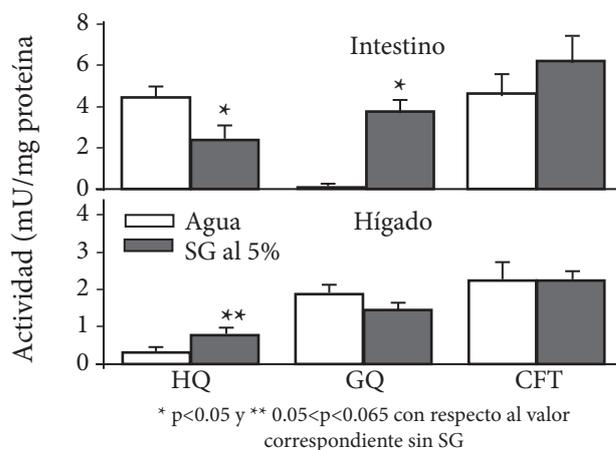
valores elevados de lactato en la vena porta de animales realimentados con sacarosa (19) y porqué dicha dieta tiene un muy elevado potencial lipogénico en el hígado (20).

Efecto diferencial de la adición de glucosa al agua de beber sobre las enzimas fosforiladoras de glucosa.

Se sabe, que el balance en la partición de la glucosa absorbida entre la translocación al lado seroso o su metabolismo a lactato en segmentos intestinales, puede ser modificado por las condiciones nutricionales o de incubación in vitro. Particularmente, la translocación de glucosa al medio seroso disminuye drásticamente cuando se suministra ratarina conjuntamente con solución de glucosa al 5% (SG) (6). Se quiso, así, evaluar el efecto del mencionado tratamiento sobre las actividades fosforiladoras de glucosa.

En los animales alimentados con ratarina, la administración de SG produjo un marcado incremento en la actividad de GQ en el intestino, llegando a representar un 63% de la CFT. Asimismo, se observó una disminución significativa de la HQ y un incremento de la CFT. En contraste, en el hígado la CFT no se modifico, se observó un incremento de la HQ y una ligera disminución de GQ (Figura 2).

Figura 2. Efecto del suministro de SG al 5% sobre las actividades fosforiladoras de glucosa en ratas alimentadas con una dieta a base de ratarina.

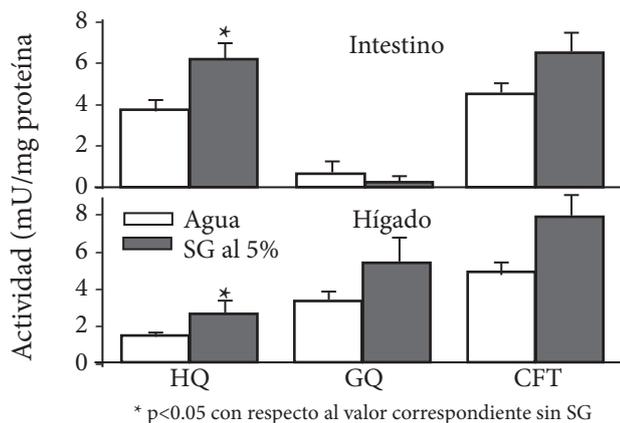


*p <0.05 y **0.05<p<0.065 con respecto al valor correspondiente sin SG. Las barras representan el promedio ± error estándar de 6 animales. C.F.T.= Capacidad fosforilativa total.

Si los animales se alimentan con la dieta a base de glucosa, y además reciben SG, en el intestino se produce un aumento diferencial de HQ y una disminución de GQ (Figura 3). En el hígado se observó un aumento diferencial de todas las actividades de fosforilación, aunque en términos relativos el mayor efecto se vio para la HQ.

Los resultados de las Figuras 2 y 3 sugieren que, a nivel hepático, se manifiesta un efecto sinérgico cuando la glucosa se suministra en forma sólida como líquida. En contraste, para el intestino la forma de administración del azúcar tiene efectos diferentes. La explicación de este fenómeno quizás resida en el hecho de que cuando la glucosa proviene de la dieta sólida, está se encuentra presente en el lapso de las comidas (12 horas del período de oscuridad), mientras que la que se suministra en forma líquida está presente de manera continua, como si se tratara de una "inundación" con el metabolito, pues el animal bebe SG, no porque tenga hambre, sino cuando tiene sed. De hecho, el consumo de líquido cuando se suministró SG fue mucho mayor que cuando se suministró sólo agua.

Figura 3. Efecto del suministro de SG al 5% sobre las actividades fosforiladoras de glucosa en ratas alimentadas con una dieta a base de glucosa.



*p < 0.05 significativamente diferente del valor correspondiente sin SG (solución de glucosa al 5%). Las barras representan el promedio \pm error estándar de 6 animales C.F.T.= Capacidad fosforilativa total.

Conclusiones

Desde una perspectiva global, pareciera que cuando aumenta la producción intestinal de lactato (animales que reciben Glucosa, Ratarina + SG y Sacarosa) también se observa un aumento en la actividad de GQ intestinal. Ello fortalece la hipótesis de trabajo sobre el papel del intestino en el metabolismo inicial de la glucosa, proceso en el cual la GQ estaría involucrada.

Teniendo en cuenta la alta capacidad que posee la mucosa intestinal de realizar glucólisis, de la modificación en la partición de la glucosa absorbida en respuesta a diversos tratamientos, y la inducción diferencial de GQ, el intestino delgado se perfila como el principal surtidor de lactato para el anabolismo hepático.

Agradecimientos

Se agradece el financiamiento a través del proyecto CDCH UCV, 09-12-4451-02

Referencias

1. Katz, J. y McGarry, D. The glucose paradox. Is glucose a substrate for liver metabolism? *J Clin Invest* 1984; 74:1901-1909.
2. Carmona, A. Metabolic cooperation between intestine and liver. Implications in relation to fat and glycogen synthesis. *Arch Lat Nutr* 1995; 45(Suppl. 1):284S-288S.
3. Srivastava, L.M. y Hubscher, G. Glucose metabolism in the mucosa of the small intestine. Glycolysis in subcellular preparations from the cat and rat. *Biochem J* 1966; 100:458-466.
4. Silverman, M. Structure and function of hexose transporters. *Ann. Rev. Biochem* 1991; 60:757-794.
5. Windmueller, H.G, y Spaeth, A.E. Intestinal metabolism of glutamine and glutamate from the lumen as compared to glutamine from blood. *Arch Biochem Biophys* 1975; 171:662-673.
6. Carmona, A. A simple in vitro perfusion system to measure intestinal nutrient uptake. *J Nutr Biochem* 1998;9:52-57.
7. Tseung, C-W. y Carmona, A. Comparative study of phosphofructokinase from rat small intestine and liver. Control by fructose-2,6-bisphosphate and other effectors. *Acta Cient Venez* 1990; 41:311-316.
8. Carmona, A. Drogas, inhibidores y otras historias. De la quimioterapia a la toxicología

- nutricional. *Acta Cient Venez* 1999;50:210-219.
9. Wood W. A. Carbohydrate Metabolism. *Methods in Enzymology*. 1975, Vol XLII
 10. Middleton R. J. Hexokinases and glucokinases. *Biochemical Society Transactions*. 1989;18:180-183
 11. Van Schaftingen E. A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose 6-phosphate and fructose 1-phosphate. *Eur J Biochem* 1989;179:179-184
 12. Printz R. L., Magnuson M. A., y Granner D. K. Mammalian Glucokinase. *Annu Rev Nutr* 1993; 13:463-496
 13. Van Schaftingen E., Detheux M., y Veiga D. M. Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein. *Faseb J* 1994;8:414-419
 14. Zhong Xu L., Weber I., Harrison R.W., Gigh-Jain M., y Pilkis S. Sugar specificity of human β -cell glucokinase: Correlation of molecular models with kinetic measurements. *Biochemistry* 1995;34:6083-6092
 15. Anderson, J.W y Tyrrel, J.B. Hexokinase activity of rat intestinal mucosa: Demonstration of four isozymes and changes in subcellular distribution with fasting and refeeding. *Gastroenterology* 1973;65:69-76
 16. Miwa I, Mitsuyama S., Toyoda Y., Murata T. y Okuda J. High-Yield purification of glucokinase from rat liver. *Preparative Biochemistry* 1990;20(2):163-178
 17. Boyd, M.E., Albright, E.B., Foster, D.W. y McGarry, J.D. In vitro reversal of fasting state of liver metabolism in the rat. *J Clin Invest* 1981;68:142-152
 18. Silverman, M. Structure and function of hexose transporters. *Ann Rev Biochem* 1991;60:757-94
 19. Mohammed, M., Stubbs M., Agius L. Evidence for glucose and sorbitol-induced nuclear export of glucokinase regulatory protein in hepatocytes. *Febs Letters* 1999;462:453-458
 20. Carmona, A. Nishina, P. Avery, E. y Freedland Time course changes in glycogen accretion, 6-phosphogluconate, fructose-2, 6-bisphosphate and lipogenesis upon refeeding a high sucrose diet to starved rats. *Int J Biochem* 1991;23:455-460

POLIMORFISMO PRO12ALA DEL GEN *PPAR* γ 2, ALA54THR DEL GEN *FABP*2 Y POLIMORFISMOS DEL GEN DE *APOLIPOPROTEÍNA E* EN HABITANTES DEL SECTOR “LOS EUCALIPTOS” DE LA PARROQUIA SAN JUAN, MUNICIPIO LIBERTADOR

Delimar Recio¹; Esther Révai¹; Mercedes Cerviño²; Hilda Stekman¹; Isidro Piedra¹; María Fátima Garcés¹

¹Facultad de Medicina. Escuela de Bioanálisis, Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas, Universidad Central de Venezuela, Caracas. ²Facultad de Medicina. Escuela de Enfermería, Universidad Central de Venezuela, Caracas.

Recibido para publicación abril 2013. Aprobado para publicación junio 2013.

RESUMEN:

Las enfermedades cardiovasculares y el síndrome metabólico son patologías que afectan a gran parte de la población mundial, de etiología poligénica y multifactorial, resultado de la interacción entre factores genéticos, ambientales, sociales y culturales. Los principales genes candidatos a estudiar son aquellos relacionados con la regulación de la homeostasis de la glucosa, del metabolismo lipídico y/o de la secreción y acción de la insulina, como son el gen de los Receptores de los Proliferadores Perioxomales Activados gamma 2 (*PPAR* γ 2), la Proteína Enlazante de Ácidos Grasos Intestinal (*FABP*2) y la *Apolipoproteína E* (*ApoE*). Objetivo: Evaluar la relación entre los polimorfismos Pro12Ala del gen *PPAR* γ 2, Ala54Thr del gen *FABP*2 y del gen de *ApoE* en habitantes del Sector “Los Eucaliptos” de la Parroquia San Juan. Población: 308 individuos de dicha comunidad, 98 hombres y 210 mujeres, clasificados en hipercolesterolémicos, hipertriglicéridémicos, resistentes a la insulina y controles de acuerdo a sus niveles de colesterol total, triglicéridos e índice HOMA. Métodos: Extracción de 10 mL de sangre venosa para la determinación de química sanguínea y extracción de ADN, amplificación mediante PCR de un fragmento de 102pb del gen de *PPAR* γ 2, uno de 180pb del gen de *FABP*2 y otro de 244pb del gen de *ApoE*, y posterior RFLP. Resultados: Se encontró una frecuencia alélica de 0,91 para el alelo Pro y 0,09 para el Ala del gen de *PPAR* γ 2; 0,70 para el alelo Ala del gen *FABP*2 y 0,30 para el Thr, mientras que para los alelos del gen de *ApoE* la frecuencia fue de ϵ 2=0,05, ϵ 3=0,80 y ϵ 4=0,15. Conclusiones: Se encontró relación entre el alelo ϵ 4 de *ApoE* y la hipercolesterolemia, además del alelo ϵ 2 como factor protector ante el desarrollo de hipercolesterolemia, hipertriglicéridemia y resistencia a la insulina, no encontrándose asociación alguna entre los polimorfismos de los restantes genes y las patologías mencionadas.

Palabras claves: hipercolesterolemia, hipertriglicéridemia, resistencia a la insulina, polimorfismos, *PPAR* γ 2, *FABP*2, *ApoE*.

PRO12ALA POLYMORPHISM OF THE *PPAR* γ 2 GENE, ALA54THR POLYMORPHISM OF THE *FABP*2 GENE AND POLYMORPHISMS OF THE *APOLIPOPROTEIN E* GENE IN THE POPULATION OF “EUCALIPTOS” OF THE PARROQUIA SAN JUAN, MUNICIPIO LIBERTADOR

SUMMARY

Cardiovascular disease and metabolic syndrome are diseases that affect worldwide, with multiple genetic and environmental components contributing to susceptibility. The main candidate genes to study are those related to the regulation of glucose homeostasis, lipid metabolism, insulin secretion and action and obesity, these include the genes for Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 (*PPAR* γ 2), fatty acid-binding protein 2 (*FABP*2) and Apolipoprotein E (*Apo E*). The aim of this study was to investigate the relationship between polymorphisms of Pro12Ala *PPAR* γ 2 gene, Ala54Thr *FABP*2 gene and the *ApoE* gene in residents from the “The Eucaliptus” of the “Parroquia San Juan”. Population: 308 subjects, 98 men and 210 women, classified as hypercholesterolemic, hypertriglyceridemic, insulin resistant and controls according to their levels of total cholesterol, triglycerides and HOMA index. Methods: Extraction of 10 mL whole blood for determination of chemistry and DNA extraction, PCR amplification of a 102 bp fragment *PPAR* γ 2 gene, a 180 bp *FABP*2 gene and a 244 bp of *ApoE* gene, and subsequent RFLP. Results: an allele frequency for allele Pro 0.91 and 0.09 for gene *PPAR* γ 2 Ala and 0.70 for the allele of the gene *FABP*2 Ala and 0.30 for Thr, while for the different alleles of *ApoE* gene frequency was ϵ 2=0.05, ϵ 3=0.80 and ϵ 4=0.15. Conclusions: We found a relationship between the *ApoE* ϵ 4 allele and hypercholesterolemia, in the other hand, *Apo E* ϵ 2 allele was found as a protective factor against the development of hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia and insulin resistance, we did not found association between polymorphisms of the other genes and the pathologies mentioned above.

Keywords: hypercholesterolemic, hypertriglyceridemic, insulin resistant, *PPAR* γ 2, *FABP*2, *ApoE*

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

Introducción

La prevalencia de las enfermedades metabólicas ha ido aumentando peligrosamente a lo largo de los años y con ella, la necesidad de desarrollar tratamientos efectivos y medidas de prevención. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera la obesidad como una enfermedad crónica que puede prevenirse y cuya importancia radica en que es un factor de riesgo para desarrollar enfermedades crónicas no transmisibles como hipertensión arterial (HTA), diabetes tipo 2 (DT2), aterosclerosis, coronariopatía, síndrome metabólico (SM), las cuales son importantes causas de morbilidad, disminución de la capacidad laboral, ausentismo laboral e invalidez; ello se traduce en costos elevados en salud pública, tanto para los individuos como para el estado y por lo tanto, disminución de la calidad de vida de estos y de la sociedad en conjunto (1).

El SM es una entidad clínica de etiología multifactorial, en la que intervienen diversos factores ambientales, genéticos y sociales. Este síndrome suele considerarse consecuencia directa de la obesidad y de la resistencia a la insulina (RI), puede ser prevenido al actuar oportunamente los factores de riesgo que predisponen al individuo a desarrollar la enfermedad.

La prevalencia y magnitud de los trastornos metabólicos asociados al sobrepeso se correlacionan directamente con el mayor desarrollo del tejido graso. En población infantil, se ha determinado que alrededor del 30% de la grasa corporal es un punto de corte crítico para el riesgo de presentar hipercolesterolemia, valores elevados de presión arterial e hiperinsulinismo, es decir, un indicador más de la existencia de SM. Tal riesgo es explicado fisiopatológicamente a partir de la mayor disponibilidad de ácidos grasos libres que generan un desbalance metabólico con aumento del estrés oxidativo y disrupción de los mecanismos de regulación hormonal (2).

La concentración de lípidos plasmáticos depende no sólo de la ingesta alimentaria, sino también de la síntesis y metabolismo de las lipoproteínas, que a su vez están condicionadas por la actividad de diversos productos de la expresión génica. Dada la importancia y la gran diversidad de las lipoproteínas que participan en el transporte y metabolismo de lípidos, las variaciones genéticas de los genes codificantes y/o reguladores de las lipoproteínas constituyen condicionantes genéticos que pueden ser asociados con la aparición de dislipidemias bien definidas (3) y en consecuencia, al desarrollo de enfermedades como la obesidad, RI y SM.

Los productos de la expresión de los genes

PPAR γ 2, FABP2 y ApoE, afectan el equilibrio de los carbohidratos y/o de los lípidos y presentan polimorfismos asociados a las manifestaciones fenotípicas diferentes desde el punto de vista bioquímico y clínico.

Los PPARs, (Peroxisome proliferator-activated receptors) son factores de transcripción activados por ligandos que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Se han identificado tres subtipos de PPARs (PPAR α , PPAR β y PPAR γ). Estos modifican la expresión de numerosos genes, entre los que se encuentran los reguladores del metabolismo de los lípidos, la homeostasis de glucosa, el control del ciclo celular, la inflamación y la respuesta inmune (4, 5).

Estudios epidemiológicos han sugerido la existencia de una asociación entre el polimorfismo Pro12Ala en el exón B2 del receptor PPAR γ 2, C/G en el codón 12, con obesidad y otras alteraciones metabólicas relacionadas con el SM (6, 7), pero los resultados no han sido siempre concordantes en las diversas poblaciones estudiadas ni concluyentes con las hipótesis planteadas.

Por otra parte, la FABP2 (Proteína Enlazante de Ácidos Grasos Intestinal) está íntimamente ligada al metabolismo de los triglicéridos provenientes de la dieta, interviene en la absorción intestinal de las grasas, facilitando el ingreso de los ácidos grasos de cadena larga desde la luz intestinal al enterocito, para luego ser esterificados y formar triacilglicéridos que serán transportados en los quilomicrones (8, 9). Asimismo, tiene una participación directa en la modulación de la expresión de ciertos genes, entre ellos la superfamilia de los PPARs, ya que los ácidos grasos absorbidos actúan como señales de transducción en el núcleo de diversas células (9, 10, 11).

El gen de la FABP2 presenta varios polimorfismos, siendo el más estudiado el Ala54Thr, G/A en el codón 54 del exón 2, originando el cambio de un residuo de alanina por uno de treonina. Estudios han demostrado que esta variación aumenta al doble la afinidad de la FABP2 por los ácidos grasos de cadena larga y hace que se secreten ésteres de colesterol y triacilglicéridos a la circulación de manera más eficiente que la forma nativa (12); por lo que se ha asociado a niveles elevados de triglicéridos plasmáticos (12, 13, 14, 15), especialmente en individuos homocigotos para el alelo 54Thr, lo que se puede asociar con el desarrollo de hipertrigliceridemia y RI (12), aumentando el riesgo del individuo a desarrollar trastornos metabólicos como obesidad, DT2 y SM, trayendo consecuencias negativas para el individuo.

Finalmente, la Apolipoproteína E (ApoE), proteína

de 299 residuos de aminoácidos, es uno de los componentes principales de los quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Su función principal es el aclaramiento hepático de quilomicrones y VLDL, mediante su papel de ligando de los receptores hepáticos y la regulación de la producción de VLDL, así como la lipólisis de las mismas por la lipoproteín lipasa (LPL). En condiciones normales, los quilomicrones y las VLDL son removidos rápidamente de la circulación por endocitosis mediada por receptores hepáticos (16).

El gen codificante de la *Apo E* es polimórfico con tres alelos codominantes: E2, E3 y E4 (ϵ 2, ϵ 3 y ϵ 4), los cuales difieren en los aminoácidos 112 y 158 (16, 17). La combinación de los tres alelos da origen a seis genotipos posibles: E2/E2, E3/E2, E3/E3, E3/E4, E4/E4, E4/E2 (16, 18). Estudios realizados en poblaciones caucásicas demostraron que la ApoE3 es la isoforma de la proteína más común, con una frecuencia de 77-81%; *ApoE2*, posee la frecuencia más baja (8%-11%) mientras que ApoE4 se presenta en 12-15% (17). Asimismo, los polimorfismos de ApoE se asocian con variaciones en los niveles plasmáticos de colesterol, los individuos con el alelo ϵ 2 presentan niveles un 10% menores que el valor promedio, mientras que los que expresan el alelo ϵ 4 exhiben valores de colesterol un 10% por encima del promedio de individuos homocigotos para ϵ 3 (18).

Es por ello que conocer si existe una asociación de los polimorfismos de los genes de *PPAR γ 2*, *FABP2* y *ApoE* con trastornos en los niveles de insulina y glucosa, dislipidemias, obesidad y SM, permitirá considerarlos como marcadores de riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas, además de desarrollar planes para realizar un diagnóstico temprano, disminución del riesgo de aparición de las enfermedades y estrategias para mejorar el estilo de vida de los individuos que tienen predisposición genética.

Aunque los marcadores genéticos no se han introducido como herramienta diagnóstica de rutina en el laboratorio clínico, en algunos países se están utilizando para la estimación de gradientes fenotípicos de riesgo individual y a nivel de poblaciones, con la esperanza de intervenir oportunamente en el estilo de vida de las poblaciones de riesgo y alcanzar estrategias terapéuticas adecuadas para cada genotipo (3).

Este estudio tuvo como objetivo evaluar la relación entre los polimorfismos Pro12Ala del gen *PPAR γ 2*, Ala54Thr del gen *FABP2* y del gen de *ApoE* con

factores de riesgos cardiometabólicos: insulina (RI), hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia en habitantes del Sector Los Eucaliptos de La Parroquia San Juan.

Materiales y Métodos

Se estudiaron 308 individuos, 98 hombres y 210 mujeres, con edades comprendidas desde los 15 hasta los 87 años del sector "Los Eucaliptos" de la Parroquia San Juan, Municipio Libertador, bajo normas de bioética y con un consentimiento informado escrito y firmado por todos los participantes, el cual fue leído y explicado a cada uno de los individuos, y se aclararon las posibles dudas que surgieron al momento de su lectura. Las muestras fueron tomadas en el período comprendido entre Mayo de 2009 y Agosto de 2010, excluyéndose niños muy pequeños debido a la dificultad que representa para ellos realizar un ayuno de 12 horas para la determinación de glicemia, triglicéridos, colesterol y sus fracciones. Los individuos fueron clasificados en: grupo de individuos hipercolesterolémicos (niveles plasmáticos de colesterol > 200 mg/dL), grupo de individuos hipertrigliceridémicos (valores de triglicéridos plasmáticos > 150 mg/dL), grupo de individuos resistentes a la insulina (HOMA > 2,6) y grupo de individuos aparentemente sanos o controles (que no presenten hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperglicemia en ayunas ni RI), de acuerdo a los valores obtenidos para los niveles de colesterol total, triglicéridos y HOMA.

A cada uno se les tomó 10 mL de sangre venosa en ayunas (10-12 horas aproximadamente), colectada en un tubo sin anticoagulante y un tubo con anticoagulante (EDTA), con el fin de realizar determinaciones bioquímicas y estudios moleculares.

A partir del suero obtenido por centrifugación a 3.000 rpm durante 15 min se determinaron los niveles de glicemia, triglicéridos y colesterol total en un equipo analizador automático de química sanguínea (Modular Analytics de Roche Diagnostics) bajo el principio potenciométrico (ISE); además se realizó electroforesis de colesterol para la separación de las lipoproteínas en suero empleando un gel de agarosa (Kit SAS-I Nivel de Colesterol-12), en el equipo automatizado de Helena Laboratories SAS-1 y posterior integración de los datos obtenidos con el programa QuickScan 2000 Win. Finalmente se realizó la determinación de insulina en suero empleando la técnica de ELISA con el kit Insulin ELISA tipo sándwich de la casa DRG Diagnostics.

La resistencia a la insulina se determinó a través

del modelo de registro homeostático (HOMA) propuesto por Matthews y col. (19), utilizando la siguiente fórmula para realizar su cálculo:

$$\text{HOMA (RI)} = \frac{(\text{Insulina (mU/L)} * \text{Glicemia (mmo/L)})}{22,5}$$

El diagnóstico resistencia a la insulina fue asignado a sujetos con un HOMA mayor a 2,6

Para la identificación de los genotipos de PPAR γ 2, FABP2 y ApoE se realizó extracción y purificación del ADN por el método de Bunce modificado (20) y se resuspendió en buffer TE. Se cuantificó la cantidad de ADN extraído, y se realizó reacción de PCR empleando el Termociclador modelo Lab Cycler de Senso Quest. El producto amplificado se evaluó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Posteriormente se cuantificó la cantidad y calidad del ADN extraído y se procedió a la amplificación de los genes estudiado mediante reacción de cadena polimerasa (PCR). La tabla 1 muestra los primers empleados, el tamaño del fragmento amplificado y la temperatura de alineamiento. Las condiciones generales de la PCR empleada fueron las siguientes: Buffer green 1X (Promega), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,2 mM de cada primer, 0,25 U de la enzima Taq-Polimerasa (Promega) y agua tridestilada hasta completar un volumen final de 20mL. Se utilizaron 5 ml de ADN genómico (aproximadamente 100ng), para un volumen total de reacción de 25ml. La PCR fue realizada empleando el Termociclador modelo Lab Cycler de Senso Quest; la mezcla de reacción se sometió a una desnaturalización inicial a 94° C durante 5 minutos seguida de 35 ciclos

compuestos por desnaturalización de 1 minuto a 94° C, alineamiento por 1 minuto a diferentes temperaturas (Tabla 1), extensión de 1 minuto a 72° C, seguidos de una extensión final de 10 minutos a 72° C.

La calidad del producto de amplificación se verificó realizando una electroforesis, en la cual se agrega 8 μ l del producto de PCR en el gel de agarosa al 2% coloreado con SYBR® SAFE, se incluyó un ADN ladder de 25pb como marcador de peso molecular y un control negativo (mezcla de PCR + agua destilada en lugar del ADN genómico).

Para la identificación de los diferentes polimorfismos se utilizó la técnica de RFLP con la enzima de restricción HhaI, posteriormente se realiza electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% y finalmente tinción con nitrato de plata.

Para el análisis estadístico se recogieron los datos obtenidos en hojas de cálculo de Microsoft Excel 2010. Se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas por contaje directo. Se utilizó una prueba de chi-cuadrado con el programa MAXLIK, para evaluar el equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W). Se utilizaron tablas de contingencia simple, evaluando la asociación entre las variables del estudio y los diferentes alelos de PPAR γ 2, FABP2 y ApoE mediante pruebas de ANOVA, regresiones, Chi² y odds ratio, considerándose como significativo un valor p < 0,05.

Resultados

De los 308 pacientes, 64 se clasificaron como hipercolesterolémicos o HC (21%), 61 como hipertriglicéridémicos o HT (20%), 61 con resistencia a la insulina o RI (20%) y 122 como

Tabla 1. Primers y condiciones generales para la identificación de los polimorfismos estudiados.

Gen	Primers	Tamaño	Temperatura de alineamiento (°C)
PPAR γ 2	5'-TCTGGGAGATTCTCCTATTGGC-3' 5'-CCCAATAGCCGTATCTGGAAGG-3'	102pb	52
FABP 2	5'-ACAGGTGGTAATATAGTGAAAAG-3' 5'-TACCCTGAGTTCAGTTCCGTC-3'	180pb	52
ApoE	5'-ACAGAATCGCCCCGGCCTGGTACAC-3' 5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3'	244pb	65

Tabla 2. Características fenotípicas de los sujetos en estudio por grupo.

Parámetro	HC	HT	RI	Controles
Glicemia (mg/dL)	96 \pm 36 ***	97 \pm 34 ***	104 \pm 33 ***	82 \pm 8
Insulina (mU/L)	10,3 \pm 5,7	10,4 \pm 8,4	22,2 \pm 15,4 ***	7,2 \pm 3,0
Colesterol Total (mg/dL)	223 \pm 44 ***	199 \pm 56 ***	184 \pm 55 ***	141 \pm 22
HDL-C (mg/dL)	42 \pm 18 *	31 \pm 15 ***	36 \pm 15 ***	43 \pm 9
LDL-C (mg/dL)	141 \pm 24 ***	120 \pm 33 ***	107 \pm 29 ***	83 \pm 19
Triglicéridos (mg/dL)	184 \pm 101 ***	254 \pm 184 ***	174 \pm 119 ***	70 \pm 25

* p < 0,050 con respecto al grupo Control

** p < 0,005 con respecto al grupo Control

*** p < 0,001 con respecto al grupo Control

controles (39%).

Todos los grupos presentaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de glicemia, colesterol total, HDL-c, LDL-c y triglicéridos con respecto al grupo control; mientras que únicamente los valores de insulina del grupo de resistentes a la insulina (RI) fueron estadísticamente significativos con respecto al grupo control, tal como se observa en la Tabla 2.

En la Tabla 3 se muestra la frecuencia alélica del gen PPAR γ 2, con respecto a este gen no se encontró una diferencia significativa entre éstas y los diferentes grupos estudiados. Asimismo, en la Tabla 4 se presentan las frecuencias de los alelos del gen de FABP2, mostrándose que no existe relación entre las mismas con los grupos en estudio pues no se encontró diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control.

Por otro lado, la distribución alélica del gen de ApoE se muestra en la Tabla 5, observándose una distribución similar en la frecuencia alélica del polimorfismo ϵ 3 entre los grupos estudiados; sin embargo, la frecuencia del alelo ϵ 2 del grupo de los dislipidémicos y resistentes a la insulina es menor estadísticamente significativa con respecto al grupo control (presentándose con una frecuencia de aparición 4 veces superior a la de los tres restantes). Asimismo, la frecuencia de aparición del alelo ϵ 4 en el grupo de hipercolesterolémicos presenta una mayor diferencia significativa con respecto a los controles, observándose la primera el doble de la segunda. Esto corrobora el hecho que la presencia del alelo ϵ 2 confiere cierta protección al individuo a desarrollar dislipidemias y RI,

Tabla 3. Frecuencia de aparición de los alelos del gen PPAR γ 2 en los grupos estudiados

Alelo	HC	HT	RI	Control	Total
Pro	0,92	0,91	0,90	0,91	0,91
Ala	0,08	0,09	0,10	0,09	0,09

Tabla 4. Frecuencia de aparición de los alelos del gen FABP2 en los grupos estudiados.

Alelo	HC	HT	RI	Control	Total
Ala	0,69	0,66	0,68	0,73	0,70
Thr	0,31	0,34	0,32	0,27	0,30

Tabla 5. Frecuencia de aparición de los alelos del gen ApoE en los grupos estudiados

Alelo	HC	HT	RI	Control	Total
ϵ 2	0,02 *	0,02 *	0,02 *	0,09	0,05
ϵ 3	0,76	0,82	0,81	0,80	0,80
ϵ 4	0,22 *	0,16	0,17	0,11	0,15

* p < 0,050 con respecto al grupo Control

mientras que el ϵ 4 condiciona al desarrollo de hipercolesterolemia.

Al evaluar una posible asociación entre diferentes genotipos de PPAR γ 2 con las alteraciones estudiadas, a través del odds ratio (OR), se estableció

que los individuos con hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y RI con el polimorfismo Pro/Ala no presentan riesgo a desarrollar dichas enfermedades, como se puede observar en la Tabla 6.

Al buscar una asociación entre los diferentes genotipos de FABP2 y dislipidemias como hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia o RI (Tabla 7), se obtiene un OR cercano a 1,00 y un p valor > 0,05 para los tres grupos, indicando que no existe una probabilidad de desarrollar dichas patologías por el hecho de poseer al menos un alelo Thr.

Al comparar los niveles promedio de los analitos del perfil lipídico de los individuos que presentan cada uno de los diferentes genotipos de ApoE (Tabla 8), se observa que los valores de los portadores del ϵ 2 son estadísticamente diferentes a los de los portadores de ϵ 3 y ϵ 4, notándose que los primeros se encuentran claramente disminuidos en comparación con los otros grupos. Por otro lado, no se observó diferencia estadísticamente significativa al comparar los analitos del perfil lipídico en los portadores del genotipo ϵ 4 y los individuos homocigotos para el alelo ϵ 3. Por último, no se encontró relación entre los valores de glucosa e insulina y los diferentes polimorfismos

Tabla 6. Asociación entre los diferentes genotipos de PPAR γ 2 con la Hipercolesterolemia (HC), Hipertrigliceridemia (HT) y Resistencia a la Insulina (RI).

Genotipo	HC		HT		RI	
	OR	p	OR	p	OR	p
Pro/Pro	0,84		0,83		1,11	
Pro/Ala	(0,34 – 2,03)	0,838	(0,36 – 2,16)	0,839	(0,43 – 2,59)	0,841

Tabla 7. Asociación entre los diferentes genotipos de FABP2 con la Hipercolesterolemia, Hipertrigliceridemia y Resistencia a la Insulina.

Genotipo	HC		HT		RI	
	OR	p	OR	p	OR	p
Ala/Ala						
Thr/Ala +	1,10	0,877	1,30	0,436	1,07	0,876
Thr/Thr	(0,57 – 2,11)		(0,67 – 2,53)		(0,55 – 2,07)	

Tabla 8. Valores de Colesterol Total y sus fracciones, Triglicéridos, Glucosa e Insulina de acuerdo a los genotipos de ApoE.

	ϵ 2	ϵ 3	ϵ 4
Colesterol (mg/dL)	146 \pm 32 ***	181 \pm 60	189 \pm 36 *
HDL-c (mg/dL)	48 \pm 17 **	39 \pm 14	38 \pm 15
LDL-c (mg/dL)	81 \pm 27 ***	106 \pm 32	112 \pm 37
TAG (mg/dL)	101 \pm 87 **	167 \pm 89	150 \pm 103
Glucosa (mg/dL)	83 \pm 8	94 \pm 35	89 \pm 13
Insulina (mU/L)	10,3 \pm 9,6	12,3 \pm 10,2	11,4 \pm 9,8

ϵ 2 (genotipo ϵ 3/ ϵ 2)

ϵ 3 (genotipo ϵ 3/ ϵ 3)

ϵ 4 (genotipos ϵ 4/ ϵ 4 y ϵ 3/ ϵ 4)

* p < 0,05 con respecto al genotipo ϵ 3

** p < 0,005 con respecto al genotipo ϵ 3

*** p < 0,001 con respecto al genotipo ϵ 3

Tabla 9. Asociación entre los diferentes polimorfismos de ApoE con la Hipercolesterolemia, Hipertrigliceridemia y RI.

Grupo	HC		HT		RI	
	OR	p	OR	p	OR	p
ϵ 2	0,2 (0,1 – 0,9)	0,017	0,2 (1,1 – 3,0)	0,020	0,16 (0,03 – 0,76)	0,008
ϵ 3	0,8 (0,4 – 1,5)	0,445	1,3 (0,6 – 2,5)	0,454	1,11 (0,56 – 2,21)	0,872
ϵ 4	2,0 (1,0 – 4,1)	0,042	1,4 (0,6 – 3,0)	0,370	1,80 (0,86 – 3,79)	0,105

del gen de ApoE.

Los análisis estadísticos indican que sí existe una asociación entre el polimorfismo ϵ 4 del gen de ApoE con la hipercolesterolemia al obtenerse un OR mayor a 1,00 y un p valor $< 0,05$, lo que indica que hay una mayor probabilidad de desarrollar la patología al presentar dicho alelo en el genotipo, hecho que no ocurre con la hipertrigliceridemia o la RI, ya que se obtuvo un OR cercano a 1,00 y un p valor $> 0,05$ para ambos. En el caso del alelo ϵ 2, se obtuvo un OR $< 1,00$ junto con un p valor $< 0,05$ para las tres patologías, indicando que la presencia de dicho alelo podría actuar como un factor protector contra el desarrollo de dichas alteraciones (Tabla 9).

Discusión

Las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de muerte en el mundo y se han vuelto cada vez más frecuentes en nuestro país. Según la OMS, éstas son responsables de 32 millones de eventos coronarios y accidentes cerebrovasculares, de los cuales entre el 40-70% son fatales en países desarrollados (1). Se estima que este problema es mucho mayor en países en vías de desarrollo y se considera que millones de personas presentan los factores de riesgo de desarrollar eventos coronarios.

Por otro lado, el síndrome metabólico (SM) se define como el conjunto de problemas de salud causados por la combinación de factores genéticos y factores asociados al estilo de vida, especialmente la sobrealimentación y la ausencia de actividad física. Este síndrome comprende un conjunto de signos y síntomas como la hipertensión arterial (HTA), la hipercolesterolemia, la obesidad abdominal y la resistencia a la insulina (RI),

factor que se ve favorecido por la presencia de exceso de grasa corporal (abdominal) y la inactividad, estando algunos individuos predispuestos genéticamente a desarrollar algunas de estas alteraciones (21, 22, 23). Y como ya se ha mencionado, estas alteraciones metabólicas son factores de riesgo para la aparición de eventos cardiovasculares (1, 3).

En Venezuela, se ha reportado alrededor de un 30% de prevalencia de SM en los adultos (24, 25), mientras que en niños y adolescentes se ha encontrado hasta un 17% que reúnen criterios de presentar dicho síndrome (26).

En el presente trabajo se estudiaron 308 individuos del sector "Los Eucaliptos" de la Parroquia San Juan, Municipio Libertador, de los cuales 64 (21%) presentaban hipercolesterolemia, 61 (20%) hipertrigliceridemia, 61 (20%) individuos resistentes a la insulina y 122 (39%) fueron clasificados como controles al ser individuos aparentemente sanos (al no presentar ninguna de las alteraciones anteriormente mencionadas).

Al determinar la química sanguínea, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de glicemia, colesterol total y sus fracciones y triglicéridos entre los grupos en estudio y el grupo control, mientras que en el caso de la insulina, esta diferencia significativa sólo se observó entre el grupo con RI y el control (Tabla 3).

Varias investigaciones sobre estudios de familia y poblacionales muestran que el SM está influenciado por un fuerte componente genético, con una gran variabilidad entre diferentes poblaciones. De hecho, se ha demostrado que el 45% de los familiares de primer grado de

pacientes con diabetes tipo 2, incluso con niveles de glucosa normales, presentan RI (27, 28). Dicha predisposición genética está modulada por factores ambientales relacionados con los hábitos de vida, tales como la dieta rica en calorías y grasas saturada y baja en fibras, sedentarismo, consumo excesivo de alcohol y tabaquismo.

Al mismo tiempo, se ha demostrado que el efecto de la interacción entre factores genéticos y ambientales es mayor que el de estos dos componentes por separado. La búsqueda de los efectos de interacciones entre genes y ambiente en estudios epidemiológicos es esencial para comprender las variaciones individuales y poblacionales de incidencia del SM, pero su interpretación requiere un planteamiento adecuado sobre las bases de un tamaño muestral apropiado y de una metodología bien definida (29).

Por lo anteriormente expuesto, es de vital importancia establecer lineamientos para la definición e identificación temprana de los factores de riesgo cardiometabólicos en sus etapas incipientes, para la intervención precoz que permitan la prevención de su progresión y la aparición de complicaciones (30). Por otro lado, los factores genéticos son importantes en el comportamiento de la grasa corporal en respuesta a alteraciones crónicas en el balance energético y una variedad de genes que regulan el metabolismo en los adipocitos pueden predisponer al sujeto al desarrollo de la obesidad, uno de los componentes del SM. Entre los genes relacionados con la obesidad destaca el gen *PPAR γ 2*. Éste es expresado preferencialmente en los adipocitos diferenciados y media la expresión de genes específicos de células adiposas, los cuales codifican proteínas directamente relacionadas con las vías lipogénicas. Entre los principales ligandos de este gen se encuentran los ácidos grasos poliinsaturados.

El polimorfismo Pro12Ala del gen *PPAR γ 2*, ha sido asociado con la reducción en el índice de masa corporal (IMC). Así, el cambio en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados de la dieta podría aumentar la lipogénesis en sujetos que no presentan la variante en el gen *PPAR γ 2*. Diferentes estudios realizados con individuos obesos y de peso normal mostraron resultados diferentes al considerarse la relación entre la variante del gen *PPAR γ 2* y la obesidad, puesto que algunos demuestran aumento

significativo en el índice de masa corporal y en la circunferencia de la cintura en individuos con la variante Pro/Ala, mientras otros relatan que la variante está asociada con menor IMC (29, 32). Asimismo, polimorfismos en el gen *PPAR γ 2* se han asociado con RI, hipertensión y alteración el metabolismo de lípidos (29).

En un estudio realizado en Venezuela, la frecuencia para el alelo Pro fue de 0,88 y para el Ala fue de 0,12. Cuando se clasificaron de acuerdo con la presencia o ausencia de SM, se observó que en los sujetos con SM la frecuencia del alelo Pro fue de 0,930 y para el Ala fue de 0,068; en los sujetos sin SM fue de 0,839 y 0,160 para el alelo Pro y Ala, respectivamente. También en dicho estudio se encontró una asociación entre el polimorfismo y los elementos que definen el SM, observándose que los individuos con y sin SM con el alelo Ala presentaron los niveles más bajos de triglicéridos y HDL-c más alto, cuando se los comparó con los sujetos con el alelo Pro, encontrándose que no hubo significancia estadística (33).

En otras investigaciones se reportó que en un grupo pequeño de pacientes caucásicos hay una asociación entre la presencia de la mutación y la diabetes tipo 2 (34); posterior a ello se demostró que dicha mutación está asociada con un aumento del IMC y de peso, con un incremento en la predisposición al desarrollo de obesidad; sin embargo, no hallaron asociación entre la presencia del polimorfismo y los niveles elevados de insulina y glucosa en dichos pacientes (6). Un hecho similar ocurre en el presente estudio, donde no existen diferencias significativas en cuanto a los niveles de lípidos sanguíneos, glucosa e insulina dependientes del genotipo presentado (Tabla 6). Por otro lado, recientemente se ha descrito una asociación entre el alelo Ala12 y una mejora en la sensibilidad a la insulina con tolerancia normal a la glucosa (35); además, otros estudios observaron que los adultos con IMC elevado que portan el genotipo Pro/Pro fueron más resistentes a la insulina que los sujetos que portan al menos un alelo Ala (36), contrastando con lo establecido en las investigaciones anteriores.

En nuestro estudio, la frecuencia para el alelo Pro fue de 0,91 y para el Ala fue de 0,09 (Tabla 3), no encontrándose una diferencia estadísticamente significativa en la distribución de los diferentes

grupos en estudio. Esta frecuencia presenta un patrón ligeramente diferente a lo reportado con anterioridad en Venezuela (37) lo cual puede deberse a las diferencias poblacionales.

En base al presente estudio, una vez establecido el porcentaje de aparición de dicho genotipo en la población y la evaluación de una posible relación entre el polimorfismo Pro12Ala con la aparición de hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y RI mediante el índice odds ratio con su intervalo de confianza y Chi², se encontró que no existe asociación la presencia del polimorfismo Pro12Ala y las dislipidemias o RI en la muestra estudiada (Tabla 7).

Otro de los genes candidatos al desarrollo de la obesidad y SM es el que codifica la FABP2, proteína expresada únicamente en el epitelio absortivo cilíndrico simple del intestino delgado (9) e influye directamente en los niveles de triglicéridos circulantes, al estar involucrada en el proceso de absorción de ácidos grasos a nivel intestinal y secreción de ésteres de colesterol y triglicéridos a la circulación (12), además de modular la expresión de otros genes, tales como los PPARs (9, 11).

El polimorfismo más estudiado del gen FABP2 es el Ala54Thr, generado debido a la sustitución, en la posición 54, de un residuo de alanina por uno de treonina, y ha sido asociado a un aumento de la afinidad de la proteína por los ácidos grasos de cadena larga y una secreción más eficiente de colesterol esterificado y triglicéridos a la circulación, además de un aumento en los niveles de triglicéridos tanto en ayunas como postprandiales, elementos que podrían llevar al individuo al desarrollo de hipertrigliceridemia y RI (12, 13, 14, 38).

Estudios con diferentes poblaciones indican que existen variaciones en la frecuencia de aparición de los alelos Ala y Thr, siendo de aproximadamente 0,73 y 0,27 respectivamente en egipcios, indios, europeos, argentinos y americanos afrodescendientes, al igual que el grupo control de este estudio (Tabla 4). Por otro lado, investigaciones realizadas en población asiática (Japón, China y Corea) arrojan resultados similares a los obtenidos para el total de los pacientes y los que presentan dislipidemias y RI del presente estudio, siendo de alrededor de 0,68

para el alelo Ala y 0,32 para el Thr (13, 15, 39, 40, 41). Es llamativo que los individuos con mayor frecuencia de aparición del alelo Thr sean los hipertrigliceridémicos y resistentes a la insulina (0,34 y 0,32 respectivamente) (Tabla 4), es decir, aquellos que se ven más afectados por un aumento en la afinidad de la proteína por los ácidos grasos de cadena larga y una mayor eficiencia en la secreción de triglicéridos y ésteres de colesterol a la circulación, aunque no hay una verdadera significancia en cuanto a la aparición de estos alelos en estos grupos, ni en la diferencia entre los niveles de lípidos sanguíneos, glucosa e insulina de acuerdo a los diferentes alelos.

Ante esta situación, se evaluó la posible relación entre el polimorfismo Ala54Thr y el desarrollo de RI o dislipidemias como la hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia a través de análisis de Chi² y el índice odds ratio junto con su intervalo de confianza, mas no se encontró relación alguna entre el polimorfismo y dichas patologías, ya que se obtiene un p valor > 0,05 y un OR muy cercano a 1,00 que se encuentra dentro del intervalo de confianza (Tabla 7). Estos resultados concuerdan con otras investigaciones realizadas, donde no se describe asociación alguna entre el polimorfismo Ala54Thr y el desarrollo de dislipidemias o RI (40, 42, 43), pero no son del todo concluyentes, ya que existen estudios a nivel mundial donde sí se encontró una clara asociación entre las dos variables y se afirma la hipótesis de que la presencia del alelo Thr condiciona al individuo a desarrollar obesidad y enfermedades cardiovasculares (13, 40, 43).

Es por estas discrepancias entre los diferentes estudios realizados sobre el polimorfismo Ala54Thr del gen de FABP2 y las diferentes alteraciones metabólicas (39, 40) que se hace necesario continuar las investigaciones, ya sea aumentando el tamaño de la muestra o estudiando diferentes poblaciones para dilucidar esta interrogante.

Siguiendo la misma línea de investigación de los factores de riesgo de enfermedades cardiometabólicas, el gen de ApoE, al igual que los dos anteriores, ha sido seleccionado como uno de los genes que predisponen al establecimiento del SM ya que el polimorfismo que este presenta es un factor genético determinante de los niveles de colesterol total y colesterol en las lipoproteínas

de baja densidad (LDL-c) en plasma y, por lo tanto, un factor determinante de las enfermedades cardiovasculares (3, 17, 45, 46), siendo el alelo ϵ 4 el que se asocia con niveles elevados de colesterol y LDL-c (44, 47). En este mismo orden de ideas, es posible observar con nuestros resultados que los sujetos que poseen el alelo ϵ 4 en su genotipo presentan niveles más elevados de colesterol total, mientras que los portadores del alelo ϵ 2 presentan niveles sanguíneos más bajos de este y los restantes analitos al compararlos con los valores del alelo silvestre (Tabla 8), estableciéndose gracias a los análisis estadísticos que existe una significancia en dichas diferencias.

A nivel mundial se ha aceptado que la presencia del alelo ϵ 4 está asociado a niveles de colesterol más elevados (44, 48), tal como reflejan los resultados de este estudio. Por otro lado, investigaciones como la realizada en Colombia (47) indican lo contrario, donde describen que este alelo está asociado a niveles disminuidos de colesterol total y LDL-c junto con valores elevados de HDL-c.

Asimismo en este estudio, después de evaluar a la población a través del índice odds ratio junto a su intervalo de confianza y pruebas de Chi², se obtuvo que en el grupo de sujetos con hipercolesterolemia hubo diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia del genotipo ϵ 4 con respecto al grupo control (Tabla 9), enfatizando la posibilidad de que en este primer grupo se pudiera presentar una susceptibilidad clínica a presentar niveles elevados de colesterol y mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, tal como se describe en otros estudios (3, 5); mas esta diferencia no se observa en el grupo de hipertriglicéridémicos ni RI. Sin embargo, para establecer si existe una verdadera relación clínica entre la presencia del genotipo y el desarrollo de la enfermedad es necesario realizar un estudio aumentando el tamaño de la muestra.

Por otro lado, existe una diferencia estadísticamente significativa en la presencia del genotipo ϵ 2 entre el grupo control y los tres grupos restantes, indicando que existe una tendencia a presentar valores de colesterol y triglicéridos disminuidos asociados a la presencia de este alelo, lo que concuerda con investigaciones previas a este estudio, que hablan del efecto protector que tiene este alelo ante el desarrollo de placas de aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares y metabólicas (3,

49, 50); en el caso de los resistentes a la insulina se obtienen resultados similares, confiriéndole al individuo cierta protección ante el desarrollo de dicha alteración. Este último resultado aporta una característica al genotipo que ha sido poco estudiada, por lo que es punto de partida para profundizar la investigación.

En un estudio realizado con individuos caucásicos, se obtuvo una frecuencia alélica de los diferentes genotipos de *ApoE* como se menciona a continuación: alelo ϵ 2 0,08, alelo ϵ 3 0,77 y alelo ϵ 4 0,15 (3), resultados que se asemejan a los obtenidos en el presente estudio: alelo ϵ 2 0,05, alelo ϵ 3 0,80 y alelo ϵ 4 0,15 (Tabla 5), distribución que puede venir dada por la mezcla de razas que existe en nuestro país, donde existe un alto número de mestizos con ascendencia europea.

Finalmente, es importante destacar que en el presente estudio se ha descrito que el SM, que afecta hoy en día a un alto porcentaje de la población, es de etiología poligénica y multifactorial (3, 21); por lo que es posible relacionarlo con los polimorfismos estudiados en este trabajo. En este sentido, nuestros resultados y análisis permitieron identificar un posible factor de riesgo relativo entre el desarrollo de SM y el alelo ϵ 4, una variante del gen de *ApoE* que está estrechamente relacionada con la aparición de hipercolesterolemia y enfermedades cardiovasculares, factores de riesgo para desarrollar SM, mientras que el alelo ϵ 2 representa un factor protector contra la aparición del mismo. Cabe destacar que sólo se encontró asociación entre los polimorfismos de este gen y los factores de riesgo a desarrollar SM estudiados, no así con los dos restantes.

Conclusión

De la población estudiada, se encontró que aunque la mayoría (61%) presentaba alteraciones en el metabolismo de los lípidos y/o de los carbohidratos, no existe asociación entre los polimorfismos Pro12Ala del gen PPAR γ 2 o Ala54Thr del gen FABP2 con dislipidemias como hipercolesterolemia e hipertriglicéridemia o RI, indicando que el hecho de presentar dichos genotipos no condicionan al individuo a desarrollar las patologías anteriormente mencionadas. Sin embargo, se encontró una relación entre los valores de colesterol total y los diferentes genotipos de *ApoE*, siendo los portadores del alelo ϵ 4 los

que se han asociado a valores de colesterol más elevados, existiendo una susceptibilidad clínica entre la presencia de este alelo y el desarrollo de la enfermedad; mientras que el alelo ϵ 2 se distribuye de forma estadísticamente significativa en el grupo control con respecto al grupo de hipercolesterolémicos, hipertrigliceridémicos y con RI, indicando que la presencia del mismo podría conferirle al individuo un efecto protector ante el desarrollo de estas condiciones.

Agradecimientos

El proyecto fue financiado por la Coordinación de Investigación y la Coordinación de Extensión de la Facultad de Medicina. Agradecemos a Grupo Evo-Lab C.A y a los habitantes del Sector "Los Eucaliptos" de la Parroquia San Juan, Municipio Libertador, Caracas.

Referencias

- Organización Mundial de la Salud (2011) Obesidad y sobrepeso (en línea) Última modificación: marzo 2011. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html>. Acceso el 14 de Agosto 2011
- Dwyer T, Blizzard CL. Defining obesity in children by biological endpoint rather than population distribution. *Int J Obes* 1996;20:472-480.
- Rodríguez N. Alteraciones en genes del metabolismo lipídico y enfermedad cardiovascular. *AVFT* 2007;26(1):1-9.
- Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999;20:649-688.
- Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res* 1996;37:907-925.
- Beamer B, Yen C, Andersen R, Muller D, Elahi D, Cheskin L, et al. Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene with obesity in two Caucasian populations. *Diabetes* 1998;47:1806-1808.
- Frederiksen L, Brodback K, Fenger M, Jorgensen T, Borch-Johnsen K, Madsbad S, et al. Comment: studies of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma gene in the Danish MONICA cohort: homozygosity of the Ala allele confers a decreased risk of the insulin resistance syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3989-3992.
- Mathews C, Van Holde K, Ahern K. *Bioquímica*. Madrid: Pearson Educación. 3 ed; 2005. p.701-745
- Waiss EP, Brown MD, Shuldiner AR, Hagberg JM. Fatty acids binding protein-2 gene variants and insulin resistance: gene and gene-environment interactions effects. *Physiol Genomics* 2002;10:145-157.
- Ordovas JM. Genetics, postprandial lipemia and obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2001;11:118-133.
- Berthier MT, Couillard C, Prudhomme D, Nadeau A, Bergeron J, Tremblay A et al. Effects of the FABP2 A54T mutation on triglyceride metabolism of viscerally obese men. *Obes Res* 2001;9:668-675.
- Baier LJ. A polymorfism in the human intestinal fatty acids binding protein alters fatty acid transport across Caco 2 cells. *J Biol Chem* 1996;271:10892-10896.
- Hegele RA, Connelly PW, Hanley AJ, Sun F, Harris SB, Zinman B. Common genomic variants associated with variations in plasma lipoproteins in young aboriginal Canadians. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1060-1066.
- Brown M, Shuldiner A, Ferrell R, Weiss E, Korytkowski-Zmuda J, McCole S et al. FABP2 genotype is associated with insulin sensitivity in older women. *Metabolism* 2001;50:1102-1105.
- Vimaleswaran K, Radha V, Mohan V. Thr54 allele carriers of the Ala54Thr variant of FABP2 gene have associations with metabolic syndrome and hypertriglyceridemia in urban South Indians. *Metabolism Clinical and Experimental* 2006;55:1222-1226.
- Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E Polymorphism and Atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1988;8:1-21.
- Wilson PWF, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. *Apolipoprotein E* alleles and risk of

- coronary disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1250-1255.
18. Lucotte G, Loirat F, Hazout S. Pattern of gradient of *apolipoprotein E* allele 4 frequencies in Western Europe. *Hum Biol* 1997;69:253-262.
 19. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and B-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in many. *Diabetologia* 1985;28(7):412-419.
 20. Welsh K. I. and Bunce M. Molecular Typing for the MHC with PCR-SSP. *Reviews in Immunogenetics* 1999;1:157-176.
 21. Reaven G. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;37:1595-1607.
 22. Camejo G, Ljung B and Oakes N. Pharmacological treatment of insulin resistance in obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2001;11:275-284.
 23. Zimmet P, Boyko EJ. Etiology of the metabolic syndrome: potential role of insulin resistance, leptin resistance and other players. *Ann NY Acad Sci* 1999;892:25-44.
 24. Acosta A, Chiesa M, y col. Prevalencia De Diabetes Mellitus Tipo 2 Y Síndrome Metabólico En Una Muestra Poblacional Del Estado Falcón, Venezuela. *Memorias Del IX Congreso Venezolano De Endocrinología y Metabolismo* 2004:49.
 25. Flores H, Silva E y col. Prevalence And Risk Factors Associated With The Metabolic Syndrome And Dyslipidemia In White, Black, Amerindians And Mixed Hispanics In Zulia State, Venezuela. *Diabet Res Clin Pract* 2005;69:63-67.
 26. Schröder A. Relación Entre Los Indicadores De Distribución De Grasa Corporal Y El Síndrome Metabólico En Niñas, Niños Y Adolescentes Obesos. Trabajo Especial De Grado De Especialización En Nutrición Clínica Opción Pediatría. 2007.
 27. Beck-Nielsen H, Groop LC. Metabolic and genetic characterization of prediabetic states. Sequence of events leading to non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1994;94:1714-1721
 28. Groop L, Forsblom C, Lehtovirta M, Tuomi T, Karanko S, Nissen M, Ehrnstrom BO, Forsen B, Isomaa B, Snickars B, Taskinen MR. Metabolic consequences of a family history of NIDDM (The Botnia Study). *Diabetes* 1996;45:1585-93.
 29. Swarbrick M, Chapman C, McQuillan B. A *Pro12Ala* polymorphism in the human peroxisome proliferator-activated receptor-g2 is associated with combined hyperlipidaemia in obesity. *European Journal of Endocrinology* 2001;144:277-282.
 30. Martínez M, Martínez L. Síndrome de resistencia a la insulina y síndrome metabólico: similitudes y diferencias. Síndrome metabólico: concepto, fisiopatología y epidemiología. *Cardiovascular Risk Factors* 2003;12(2):89-95.
 31. S.V.P.P. Sociedad Venezolana de Puericultura y Pediatría, Livia Machado de Ponte (Directora), Isbelia Izaguirre de Espinoza, Rafael J. Santiago P. *Nutrición Pediátrica* 2009;1:264-266.
 32. Rosado E, Bressan J. Efecto de la dieta y de los genes PPAR γ 2 y γ 2-adrenérgico en el metabolismo energético y en la composición corporal de mujeres obesas. *Nutr Hosp* 2006;21(3):317-331.
 33. Carvajal K, Hernández-Esquivel M, Moreno-Sánchez R. PPARs, síndrome metabólico y enfermedad cardíaca *Arco Cardiol Mex* 2007;77(Suppl 4):66-76.
 34. Yen CJ, Beamer BA, Negri C, et al. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor g (*hPPARG*) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR γ 2 missense mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241:270-274.
 35. Ek J, Andersen G, Urhammer SA, Hansen L, Carstensen B, Borch-Johnsen K, Drivsholm T, Berglund L, Hansen T, Lithell H, Pedersen O. Studies of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (*PPARGgamma2*) gene in relation to insulin sensitivity among glucose tolerant caucasians. *Diabetologia* 2001;44:1170-1176.
 36. Ghossaini M y col. Implication of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma 2 gene in type 2 diabetes and obesity in the French population. *BMC Medical Genetics* 2005;6:11
 37. Pérusse L, Bouchard C: Gene-diet interactions

- in obesity. *Am J Clin Nutr* 2000;72:1285-1290.
38. Baier LJ, Sacchettini JC, Knowler WC, Eads J, Paolissog, Tataranni PA, Mochizuki H, Bennett PH, Bogardus C, Prochazka M. An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increased fatty acid binding, increased fat oxidation and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995;95:1281-1287.
 39. Albala C, Jiménez B, Pérez F, Liberman C. Polimorfismo de la proteína ligante de ácidos grasos intestinal (*FABP2*), obesidad e insulina resistencia. *Rev Med Chile* 2006;134:372-379.
 40. Salem AH. A population frequency analysis of the *FABP2* gene polymorphism in the Egyptian population. *Egypt J Med Hum Genet* 2009;10(2):178-185.
 41. Gómez LC, Real SM, Ojeda MS, Giménez S, Mayorga LS, Roque M. Polymorphism of the *FABP2* gene: A population frequency analysis and an association study with cardiovascular risk markers in Argentina. *BMC Med Genet* 2007;8:39.
 42. Endo K, Yanagi H, Hirano C, Hayakawa Y, Hamaguchi H, Tomura S. No association found between the Ala 54Thr polymorphism of *FABP2* gene and obesity and obesity with dyslipidemia in Japanese school children. *J Atheroscler Thromb* 2001;8(3):80-83.
 43. Pihlajamäki J, Rissanen J, Heikkinen S, Karjalainen L, Laakso M. Codon 54 polymorphism of the human intestinal fatty acid binding protein 2 gene is associated with dyslipidemias but not with insulin resistance in patients with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(6):1039-1044.
 44. Celaya J, Rodríguez A, Arends A. Estudios de polimorfismos del gen (*APO E*) de la apolipoproteína-E (*Apo E*) y su relación con niveles elevados de colesterol total, lipoproteínas y triglicéridos séricos en niños de edad escolar. *Rev Soc Med Quir Hosp Emerg Pérez de León* 2007;38(1):19-26
 45. A Hixson JE. *Apolipoprotein E* polymorphism affect atherosclerosis en young males. Pathobiological determinants of atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. *Atheroscler Thromb* 1991;11:1237-1244.
 46. Bennet AM, Di Angelantonio E, Ye Z, Wensley F, Dahlin A, Ahlbom A, et al. Association of *apolipoprotein E* genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA*. 2007;298:1300-1311.
 47. Silvera Redondo C, Barrios R, Pájaro D, Hernández E, Chicangana C, Rolón G y cols. Polimorfismos del gen *ApoE*: su asociación con los niveles de lipoproteínas plasmáticas en población juvenil de Barranquilla. *Iatreia* 2010;23(4):22-27.
 48. Bañares V., Wysynski D., Schreier L. y Tavella M. Polimorfismo -219 G/T en el gen *Apo E* en relación con los niveles de colesterol y la enfermedad aterosclerótica en Argentina. *Invest Clin* 2010;51(1):17-26.
 49. Eto M, Watanabe K, Ishii K. A racial difference in *apolipoprotein E* allele frequencies between the Japanese and Caucasian populations. *Clin Genet* 1986;30:422-427.
 50. Díaz-Realpe, J, Muñoz J y col. Factores de Riesgo para Enfermedad Cardiovascular en Trabajadores de una Institución Prestadora de Servicios de Salud, Colombia. *Rev Salud Pública* 2007;9:64-75.

DIAGNÓSTICO PRECOZ DEL CÁNCER DE CUELLO UTERINO ASOCIADO A LA INFECCIÓN POR VIRUS PAPILOMA HUMANO

Morelva Toro de Méndez¹, Antonio Ferrández Izquierdo², Antonio LLombart Bosch³.

¹Escuela de Bioanálisis. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela,

²Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Valencia y de la Sección de Citopatología. Valencia, España.

³Departamento de Patología. Universidad de Valencia, España.

Recibido para publicación abril 2013. Aprobado para publicación junio 2013.

RESUMEN:

La infección persistente por ciertos tipos de alto riesgo oncogénico de virus papiloma humano (VPHAR) es el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de cuello uterino y sus lesiones precursoras. Los VPHAR inducen alteraciones moleculares durante todo el proceso de carcinogénesis cervical, que provocan la acumulación de errores genéticos, con la consecuente inestabilidad genética y transformación maligna. Estas alteraciones son producidas por la acción directa de las oncoproteínas virales E6 y E7 sobre las principales proteínas celulares supresoras de tumor, p53 y pRb, respectivamente, y pueden ser monitoreadas durante el surgimiento de la lesión neoplásica, mediante el uso de biomarcadores. En este artículo se revisan las últimas tendencias sobre el uso del estudio inmunocitoquímico, como una prueba complementaria a la citología y a la detección y tipificación de VPHAR en la evaluación de la expresión de biomarcadores como la proteína inhibidora de la proliferación celular p16INK4a, marcador único o combinada con otros biomarcadores, que puedan contribuir eficazmente en la detección de las pacientes con mayor riesgo a desarrollar neoplasia del cuello uterino asociada a la infección por VPHAR, durante la pesquisa de cáncer de cuello uterino de rutina y en el manejo clínico adecuado y oportuno.

Palabras Clave: cuello uterino, neoplasia, virus papiloma humano oncogénico, biomarcadores, inmunocitoquímica, p16INK4a/Ki-67.

EARLY DIAGNOSIS OF CERVICAL CANCER ASSOCIATED TO HUMAN PAPILLOMAVIRUS

SUMMARY

Persistent infection with certain types of high oncogenic risk human papillomavirus (HR-HPV) is the main risk factor for developing cervical cancer and its precursor lesions. HR-HPV induces molecular changes during cervical carcinogenesis, causing the accumulation of genetic anomalies, with subsequent genetic instability and malignant transformation. These alterations are produced by the direct action of the E6 and E7 viral oncoproteins on principal tumor cell suppressor proteins, p53 and pRb, respectively, and can be monitored during growth of the neoplastic lesion using biomarkers. In this paper we review the latest trends on the use of immunocytochemistry as a complementary test to cytology and HR-HPV detection and typing in evaluating expression of biomarkers such as the p16INK4a cell proliferation inhibitor protein, as a single marker or combined with other biomarkers, which can contribute effectively to the detection of patients with increased risk of developing cervical neoplasia associated with HR-HPV infection during routine screening for cervical cancer and in appropriate clinical management.

Key words: uterine cervix, neoplasia, high risk-HPV, biomarkers, immunocytochemical, p16INK4a/Ki-67.

Introducción

El cáncer de cuello uterino es la neoplasia maligna más común en las mujeres de los países subdesarrollados, el cual ocasiona alrededor de 280.000 muertes cada año, según el Centro de Información sobre HPV y cáncer cervical de la Organización Mundial de la Salud y el Instituto Catalán de Oncología (1).

La infección persistente por ciertos tipos de virus papiloma humano (VPH) de alto riesgo oncogénico

(VPHAR) es considerada actualmente el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de cuello uterino y sus lesiones precursoras (2-5). También se ha sugerido una relación causal entre el VPHAR y otros cánceres anogenitales (vulva, vagina, pene), así como de un grupo de neoplasias malignas de cabeza y cuello (6-9).

El VPHAR es capaz de inducir el desarrollo de un fenotipo celular maligno mediante diferentes mecanismos interrelacionados entre sí (10).

Solicitar copia a: Morelva Toro de Méndez (e-mail tmorelva@ula.ve.)

Debido a que las interacciones moleculares son mediadas por proteínas, tanto celulares como virales, una estrategia adecuada para evaluar estas vías moleculares complejas podría ser el estudio de la actividad de estas proteínas, mediante el uso de las técnicas de inmunoquímica, aplicadas a muestras celulares o tisulares. Esta metodología ofrece la posibilidad de analizar las proteínas de interés utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales, las cuales se encuentran alteradas durante el proceso de carcinogénesis del cuello uterino asociado a infección por VPHAR. Con la aplicación de las técnicas inmunohisto-citoquímica se ha logrado descubrir y estudiar una variedad de biomarcadores que podrían ser de gran utilidad clínica como predictores de enfermedad, durante el largo proceso de desarrollo de las lesiones neoplásicas del cuello uterino inducidas por una infección persistente por el VPHAR (11-15).

La detección inmunocitoquímica de alteraciones moleculares inducidas por los VPHAR en las células del cuello uterino infectadas podría ser usada como un análisis adjunto al estudio morfológico de las células o Citología, en la pesquisa de rutina del cáncer de cuello uterino, para la detección eficaz de las lesiones premalignas, conocidas en la actualidad con el término citológico de Lesión Intraepitelial Escamosa (siglas en inglés: SIL) propuesto por el Sistema Bethesda 2001(16) y tradicionalmente, como displasias o neoplasia intraepitelial cervical (siglas en inglés: CIN) de diferentes grados de severidad (CIN 1, 2 y 3 ó carcinoma in situ), basado en su aspecto histopatológico (17). La técnica inmunocitoquímica ofrece la ventaja que puede ser aplicada indistintamente sobre muestras citológicas del cuello uterino obtenidas de forma convencional, en muestras celulares en base líquida y en bloques celulares incluidos en parafina (18-20).

En este artículo se revisan las últimas tendencias sobre la aplicación del estudio inmunocitoquímico, como una prueba complementaria a la citología y a la detección y tipificación de VPHAR, en la evaluación de la expresión de biomarcadores como la proteína inhibidora de la proliferación celular p16INK4a, bien único o combinado con otros biomarcadores, que puedan contribuir eficazmente en la detección de las pacientes con mayor riesgo a desarrollar neoplasia del cuello uterino asociada a la infección por VPHAR.

Principales eventos moleculares de la carcinogénesis del cuello uterino.

El cáncer de cuello uterino surge a partir de la transformación de las células epiteliales infectadas por VPHAR, que conforman los epitelios de revestimiento de la mucosa cervical y especialmente de la zona de transformación o epitelio metaplásico (21). Esta neoplasia viene precedida por un espectro morfológico de lesiones intraepiteliales escamosas clasificadas como de bajo grado (siglas en inglés: LSIL) que incluye a la infección por VPH y a CIN 1 y lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (siglas en inglés: HSIL) que abarcan a CIN 2 y 3 ó carcinoma in situ (16).

La neoplasia maligna de cuello uterino es una enfermedad genética y el proceso de su desarrollo o carcinogénesis es complejo, multifactorial e incluye básicamente las siguientes fases: infección del epitelio cervical por VPHAR, persistencia viral, progresión a lesión premaligna e invasión. La persistencia de la infección por VPHAR representa el evento clave e inicial de la transformación celular y origen del cáncer cervical (4,10,22-24).

Existe entonces una relación causal bien establecida entre la infección por VPHAR y cáncer de cuello uterino, sin embargo, esta infección es necesaria pero insuficiente, ya que la mayoría de estas infecciones de transmisión sexual en mujeres jóvenes son transitorias y no producen lesión premaligna (25). Se requiere de la cooperación de otra serie de cofactores ambientales, virales y de la célula infectada, que al combinarse incrementan el riesgo de progresión de una infección por VPHAR a un estado neoplásico (26-28).

El VPH es un virus ADN que pertenece a la familia Papillomaviridae. Su genoma está compuesto por una serie de genes, que dependiendo del momento del ciclo vital del virus en que estos se expresen, se denominan E /early expression (E1-E7) y L / late expression (L1 y L2). Estos genes virales se encuentran controlados en las infecciones activas, sin embargo, cuando el ADN viral se integra al genoma celular, después de un largo período de persistencia, estos oncogenes virales comienzan a expresarse de manera descontrolada, con el propósito de modificar las funciones naturales de las proteínas celulares para inducir la transformación celular maligna (4,29-32).

Actualmente se han caracterizado más de 150 tipos

específicos de VPH, de los cuales aproximadamente 15 tipos virales se encuentran asociados a las lesiones premalignas y malignas del cuello uterino. Estos virus han sido clasificados de acuerdo a su potencial oncogénico en 2 grupos: de bajo (BR) y alto riesgo (AR) oncogénico. Entre los VPHBR más frecuentes se encuentran los tipos 6 y 11, asociados a lesiones benignas como los condilomas (verrugas) genitales, mientras que los VPHAR más comunes incluyen a los tipos 16, 18, 31, 33, 45, entre otros, cuyo ADN ha sido aislado tanto de las HSIL como del cáncer invasor e igualmente hallados con frecuencia en pacientes con citología normal, sobre todo el tipo VPH 16 (33-37).

Cuando las células inmaduras del estrato profundo del epitelio cervical escamoso y/o metaplásico, que se encuentran en división y diferenciación, son infectadas por un VPH, el ADN viral puede encontrarse en el núcleo en estado físico episomal, extracromosomal o formando parte integral del ADN celular. En las LSIL, el ADN viral se encuentra como un episoma y los niveles de expresión de los oncogenes E6 y E7 son bajos, debido al control cuidadoso que ejercen sobre estos, los genes virales E1 y E2. En las HSIL y en el cáncer invasor, el ADN de los papilomavirus está integrado al genoma de la célula infectada, en la que ha dado lugar a la transformación celular y surgimiento del tejido displásico (10,38-40).

La persistencia de la infección por VPHAR es el verdadero factor viral de riesgo para que suceda la progresión maligna. Durante ésta fase de la carcinogénesis ocurren 3 eventos moleculares de interés: la integración, la expresión sin represión de los oncogenes virales E6 y E7 y la interacción de las oncoproteínas virales E6 y E7 con las principales proteínas celulares supresoras de tumor: la proteína p53 y la proteína Retinoblastoma (pRb). Estas proteínas celulares se encargan de una variedad de funciones que regulan, directa o indirectamente, a los procesos vitales como la diferenciación celular, replicación del ADN, apoptosis, quiescencia y angiogénesis, entre otros (39,41-44).

Como consecuencia de esta interacción entre proteínas virales y celulares ocurre la alteración de los mecanismos reguladores del crecimiento celular, mediante la expresión elevada y permanente de los oncogenes virales E6 y E7, permitiendo de esta manera que la célula se divida constantemente, de forma descontrolada. Además,

las oncoproteínas virales E6 y E7 interfieren con otros múltiples mecanismos de regulación celular, que conllevan a la producción de alteraciones genéticas acumulativas y epigenéticas, con la consecuente inestabilidad genómica y finalmente, al surgimiento de un clon celular maligno que dará origen a la formación tumoral (45,46).

Las oncoproteínas E6 y E7 son factores esenciales para promover la transformación e inmortalización celular durante la carcinogénesis del cuello uterino. Se expresan permanentemente en las HSIL y el cáncer invasor, de forma combinada y su expresión sostenida es un requisito para producir y mantener el fenotipo celular maligno (21,24,40,47,48).

En las células normales, el proceso de división celular se encuentra controlado por mecanismos bioquímicos estrictos compuesto por proteínas interactivas que inducen y coordinan eventos básicos de la duplicación y división. En particular, la proliferación celular está regulada por la proteína pRb, miembro que integra la vía reguladora p16INK4a/CDK-ciclina/pRb. La proteína pRb es una fosfoproteína nuclear que ejerce su función reguladora mediante el secuestro reversible de los factores de transcripción de la familia E2F, durante la fase inicial G1. En estado hipofosforilado, la pRb se une al factor E2F y reprime la transcripción de genes cuyos productos están involucrados y son necesarios para la síntesis de ADN y progresión del ciclo celular. El complejo pRb-E2F inhibe el ciclo celular cumpliendo una función de regulador negativo de la propagación celular, lo que conduce a la ausencia de transcripción genética cuyos productos son necesarios para el avance hacia la fase S. Cuando la pRb se encuentra fosforilada por la acción del complejo CDK4- ciclina D1, ocurre la liberación y acumulación del factor E2F, conduciendo la progresión del ciclo celular a la fase S. Este proceso de fosforilación de la proteína pRb está controlado por las proteínas quinasas dependientes de ciclina (siglas en inglés: CDK) de la fase G1. A su vez, la activación o inactivación del complejo CDK4-ciclina D1 está regulada por la acción de inhibidores de CDK dependientes de ciclina, entre los que se encuentra la proteína p16INK4a. Esta proteína tiene la capacidad de unirse a las CDK 4 ó 6 e inhibir la actividad catalítica del complejo CDK-ciclina, regulando de esta forma el proceso de fosforilación de pRb y de forma indirecta, la proliferación celular (49). Normalmente, la proteína p16INK4a se encuentra

en muy bajos niveles, sin embargo, cuando la pRb se halla inactivada funcionalmente, la p16INK4a se sobrexprea y se acumula tanto en núcleo como en citoplasma, como respuesta a los elevados niveles libres de E2F50.

La inactivación de la pRb por E7-VPHAR puede ser identificada por una expresión alterada de la actividad de su inhibidor p16INK4a, ya que su expresión es regulada a su vez, por un mecanismo de feed-back negativo dependiente de pRb, resultando en niveles incrementados de p16INK4a, que se detectan a nivel nuclear y citoplasmático de las células que se descaman de las neoplasias intraepiteliales cervicales y del cáncer invasor (51-53). La proteína p16INK4a es considerada actualmente un excelente marcador tumoral (54) y de displasia cervical asociada al VPH (53,55).

En las células epiteliales del cuello uterino infectadas por un VPHAR, la inactivación funcional de las proteínas supresoras de tumor debido a la formación de complejos E6-p53 y E7-pRb, representa la esencia del proceso de carcinogénesis del cuello uterino, que conduce al descontrol del ciclo celular y la manifestación de este ocurre mediante la expresión anormal de numerosas proteínas asociadas al ciclo celular, como la proteína p16INK4a55.

Basándonos en estas consideraciones de patogénesis molecular, es posible identificar biomarcadores que reflejen los eventos moleculares implicados en todas las fases de la carcinogénesis del cuello uterino asociados a la infección por VPHAR, tanto aquellos dependientes de la expresión sin restricciones de los oncogenes virales E6 y E7, como los que indican descontrol del ciclo celular por inducción viral, con la finalidad de que sean usados para contribuir en el manejo clínico adecuado y oportuno. De esta manera, las alteraciones moleculares inducidas por el VPHAR podrían estudiarse a través de estos biomarcadores durante la pesquisa de rutina del cáncer de cuello uterino, lo cual representaría una herramienta de considerable valor diagnóstico y de pronóstico de las lesiones del cuello uterino en pacientes con infección viral persistente.

Biomarcadores para la pesquisa de las lesiones neoplásicas del cuello uterino.

En la era moderna de la citopatología ginecológica, las nuevas generaciones de pruebas de pesquisa para el cáncer de cuello uterino y sus lesiones

precursoras están orientadas a identificar marcadores moleculares que, utilizados en forma combinada, puedan contribuir en la discriminación entre las infecciones que poseen un gran potencial para progresar a displasia y luego a cáncer invasor, de aquellas infecciones que son temporales y que nunca inducirán el desarrollo de una lesión clínicamente significativa (13). Entre los numerosos biomarcadores estudiados, la detección de la expresión de ARNm de los oncogenes E6 y E7 de VPHAR y de la proteína p16INK4a son considerados marcadores que manifiestan la alteración del ciclo celular derivada de la sumatoria de todos los mecanismos que se desencadenan durante el surgimiento del cáncer de cuello uterino, para detectar efectivamente las células epiteliales en estado de transformación y progresión neoplásica, representando una excelente alternativa en el estudio y diagnóstico precoz de las lesiones cervicales (12,56-60).

Las pruebas moleculares para la detección de ADN de VPHAR serían las aplicadas inicialmente en la evaluación de rutina de las pacientes. Además del tipo específico de VPH presente, estas pruebas podrían incluir la carga viral, la persistencia e integración del ADN-VPH, así como la expresión y transcripción (ARNm) de los oncogenes E6 y E7. Las pruebas moleculares existentes son altamente sensibles y detectan cualquier tipo de infección por VPH, aunque se encuentre en una carga viral baja (61-63), sin embargo no son lo suficientemente específicas para identificar aquellas infecciones de carácter transformante, contrario a la citología, que permite reconocer específicamente a las células con características de discariosis y de malignidad. Por lo tanto, la utilidad clínica de los ensayos de detección de VPH se debaten entre la sensibilidad analítica para detectar la infección y la especificidad clínica para predecir la existencia de lesión en cuello uterino inducida por un VPHAR (55).

Debido a la relación causal entre el VPHAR persistente y la neoplasia de cuello uterino, las medidas actuales de prevención de este cáncer se basan en el resultado de las pruebas de detección de VPH. En muchos países de Europa y en Estados Unidos, el uso de la citología en base líquida combinada con la prueba de VPH ha ido reemplazando a la citología convencional en los programas de pesquisa de rutina para el cáncer de cuello uterino, sobre todo en pacientes mayores de

30 años (64,65).

Los nuevos biomarcadores específicos de los distintos estadios de desarrollo de la enfermedad neoplásica del cuello uterino están orientados y son significativos para decidir, de acuerdo al riesgo específico de enfermedad neoplásica, la conducta clínica a seguir en las pacientes con infección por VPHAR que requieren de un seguimiento riguroso (24,57). Se ha propuesto que el biomarcador ideal que permita detectar una fase específica de la carcinogénesis cervical sería el que posea una efectividad superior al 90%, para el diagnóstico de lesiones de alto grado (15).

Debido a los excelentes resultados de las pruebas inmunohistoquímicas obtenidos en las muestras tisulares de cuello uterino, tanto de tejido epitelial sano como en el neoplásico (3,66-70), se han llevado a cabo numerosas investigaciones, basadas en la técnica inmunocitoquímica, en muestras celulares tanto convencionales como en el material residual de la citología en base líquida (18,51,71-79), con la finalidad de mejorar la efectividad del diagnóstico precoz de las lesiones del cuello uterino.

La inactivación funcional de la proteína pRb por la oncoproteína E7-VPHAR provoca la sobreexpresión de la proteína p16INK4a y su acumulación, tanto en el núcleo como en el citoplasma celular. La p16INK4a es considerada, por tanto, como un biomarcador de inhibición de la vía reguladora p16INK4a/CDK4-ciclinaD1/pRb y el ciclo celular no controlado, reflejando así la transformación celular inducida por el VPHAR y posible existencia de neoplasia intraepitelial. Ello puede ser de gran ayuda en la clasificación de pacientes con hallazgos citológicos anormales pre-invasivos que incluyen ASC-US, ASC-H, LSIL y HSIL que requieren un control con evaluación clínica y tratamiento inmediato (18,51,80,81).

Se ha tratado de demostrar la utilidad de la proteína p16INK4a y otros biomarcadores en muestras clínicas, para mejorar el triaje de pacientes con riesgo a desarrollar una lesión intraepitelial de alto grado o cáncer invasor. Entre estos biomarcadores, estudiados de forma aislada o combinados, se incluye a la proteína p16INK4a, la cual continúa siendo objeto de investigación, debido a que ha demostrado buena efectividad para identificar a las células transformadas por VPHAR (18,78,79,82,83). Se han desarrollado

protocolos para la detección inmunocitoquímica de la proteína p16INK4a, como una prueba adjunta complementaria a la evaluación de las pacientes con resultados citológicos compatibles con anomalías en células epiteliales, tanto de origen escamoso como glandular (84,85). La proteína p16INK4a es un biomarcador sensible y específico para detectar pacientes con CIN 2 ó 3 y adenocarcinoma in situ, pudiendo ser utilizada en la pesquisa primaria del cáncer de cuello uterino, en conjunto con la citología y las pruebas moleculares de detección y tipificación del VPH (18,78,86).

La inmunodetección de p16INK4a podría contribuir en la discriminación de cambios celulares atípicos no asociados a infección por VPH, de aquellos que sí son inducidos por el VPH sobre todo oncogénico (87). El patrón de expresión de p16INK4a es diferente en los casos de infección por un VPH de bajo riesgo oncogénico, lo cual permitiría la diferenciación entre las lesiones que estos producen (67,68) y por tanto el riesgo de padecer una lesión potencialmente maligna. En el caso particular de la CIN 1 con inmunoespresión difusa de p16INK4a es más probable que progrese a una neoplasia intraepitelial de mayor grado de severidad, que las CIN que no expresan esta proteína o con expresión focal, las cuales serían alteraciones que regresarían espontáneamente. Por ello se considera que p16INK4a posee un elevado valor predictivo positivo para CIN (76,88-93).

El uso de la inmunodetección de p16INK4a ha mejorado significativamente los siguientes problemas de la interpretación citológica: 1) La variabilidad interobservador para detectar anomalías tisulares y celulares, sobre todo en casos con discrepancia citohistológica, así como la exactitud diagnóstica para la detección de CIN 2 o más (92,94,95). 2) La interpretación de la expresión de esta proteína en las NIC1, que al ser p16INK4a-inmunopositivas indican persistencia viral y podrían tener una mayor probabilidad de progresar a una lesión de mayor grado de severidad (CIN 2 ó 3) en comparación con aquellos casos de CIN 1 inmunonegativos (88,96). 3) La clasificación de los casos con ASC-US/LSIL que representan una lesión oculta CIN2 o más, para una atención clínica inmediata (72,74,78,97). 4) La pesquisa del cáncer de cuello uterino de rutina, como biomarcador complementario en el triaje de pacientes de riesgo con una prueba positiva para

VPHAR (18,70).

En resumen, los datos obtenidos a partir de los innumerables estudios evidencian que la detección inmunocitoquímica de p16INK4a posee un elevado potencial para ser usado como un biomarcador eficaz en la pesquisa de cáncer y lesiones premalignas del cuello uterino de rutina, en superposición con la citología, lo cual le aporta un valor clínico para la evaluación de pacientes con infección por VPHAR. Además, por lo anteriormente expuesto, parece que el uso combinado de las pruebas de laboratorio existentes sería la mejor estrategia para detectar efectivamente a las pacientes de riesgo elevado para enfermedad en cuello uterino.

Tendencias actuales de la aplicación de la inmunocitoquímica en la detección precoz del cáncer de cuello uterino.

Las nuevas estrategias de pesquisa del cáncer de cuello uterino y sus precursores deben ser cuidadosamente diseñadas, a fin de obtener un mejor entendimiento de la carcinogénesis del cuello uterino inducida por infección por VPHAR y posterior tratamiento de estas infecciones y de las lesiones que produce. La prevención del cáncer de cuello uterino ha tomado otra dirección con el desarrollo de las vacunas contra el papilomavirus, asociado al uso de biomarcadores virales y celulares aplicables en los laboratorios de rutina, inclusive con detección automatizada. Ante la especificidad no satisfactoria de las pruebas moleculares para detectar infección por VPH, debido a la alta frecuencia de éstas en mujeres jóvenes, sin evolucionar a lesión neoplásica y la sensibilidad insuficiente del estudio citológico para detectar las infecciones por VPHAR transformantes, antes de que produzcan lesión, la incorporación de biomarcadores a la pesquisa de rutina debería complementar las limitaciones de las pruebas tradicionales para detectar lesiones premalignas y malignas (15,98).

Se han introducido metodologías de laboratorio en las cuales se combina la detección simultánea de biomarcadores, que tienen como única finalidad incrementar la exactitud de la detección citológica de HSIL o de las pacientes de riesgo a desarrollarla. Recientemente, en Europa y Reino Unido se han desarrollado estudios que muestran el uso de una tinción inmunocitoquímica que incluye a dos biomarcadores para expresión compartida,

utilizados rutinariamente de forma aislada. Se trata de la inmunotinción dual para p16INK4a/Ki-67, la cual evalúa la sobreexpresión simultánea de estos dos marcadores en una misma célula, en estado de proliferación y con ciclo celular alterado, independientemente de su morfología, lo que le otorga un buen grado de objetividad a la interpretación de los resultados. Se ha sugerido que la presencia de una o más células inmunoreactivas para p16INK4a/Ki-67 podría ser un indicador confiable de CIN oculta, especialmente de alto grado (CIN 2+), en pacientes con citologías compatibles con ASC-US / LSIL (99).

Una tinción dual inmunocitoquímica para de p16INK4a/Ki-67 está ahora disponible (CINtec PLUS®), para facilitar la identificación de células epiteliales escamosas o glandulares transformadas, en muestras citológicas e histológicas del cuello uterino, ampliando la detección de pacientes de riesgo, con elevada sensibilidad y especificidad (60,93,100-107). La doble tinción se aprecia en el núcleo (rojo) que indica reactividad para el antígeno Ki-67 y el resto de la célula marrón para p16INK4a (Toro y cols 2013, en vía de publicación), como se aprecia en la Figura 1.

La sobreexpresión simultánea de los antígenos p16INK4a y Ki-67 en la misma célula epitelial del cuello uterino puede considerarse como un indicador de la alteración de los mecanismos de regulación que controlan la división celular y que fueron inducidos por la acción de los oncogenes virales E6 y E7. En estado fisiológico, estos dos biomarcadores se expresarían de manera antagónica, mientras que en las lesiones del cuello uterino de diferente severidad, con células que muestran una elevada actividad proliferativa, la inmunosobreexpresión de p16INK4a/Ki-67 representaría el estado de transformación por el que atraviesa esa célula epitelial, ofreciendo elevados niveles de sensibilidad y especificidad para la detección precoz del cáncer de cuello uterino y sus lesiones premalignas. Por lo tanto, las células epiteliales que sobreexpresen simultáneamente estos dos biomarcadores son indicativas de la existencia de lesión neoplásica.

Parece ser que la principal utilidad de la doble tinción para p16INK4a/Ki-67 sería en el triaje de pacientes con ASC-US/LSIL que pudieran presentar una lesión neoplásica de alto grado subyacente, ya que la inmunoreactividad positiva

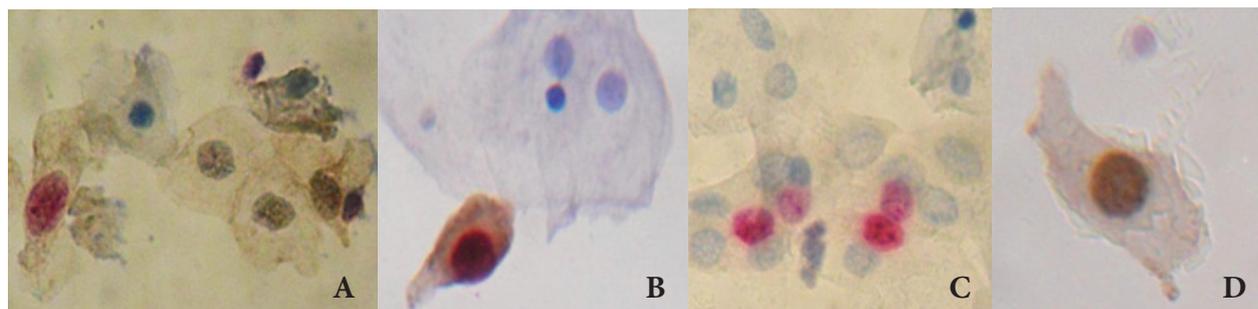


Figura 1. Ejemplos de muestras citológicas en base líquida del cuello uterino teñidas con la tinción dual inmunocitoquímica para p16INK4a/Ki-67. Contratinción con Hematoxilina de Harris. Un resultado positivo está representado por una o más células epiteliales con doble inmunoreactividad: en el citoplasma (marrón) que indica sobreexpresión de la proteína p16INK4a y en el núcleo (rojo) con expresión del antígeno de proliferación celular Ki-67, independientemente de la interpretación morfológica (A: célula intermedia atípica (ASC-US); B: células metaplásicas inmaduras atípicas (ASC-H). 40X. C: Células intermedias atípicas (ASC-US) con expresión única del antígeno de proliferación celular Ki-67 (núcleos rojos). 40X. D: célula intermedia atípica (ASC-US), la cual es sólo reactiva para el anticuerpo contra p16INK4a (célula marrón) 40X. Laboratorio de Anatomía Patológica, Hospital Clínico de Valencia. Departamento de Patología. Universidad de Valencia. España. Toro y cols 2013, en vía de publicación.

está fuertemente asociada a la presencia de CIN 2 o más (105,108). Además, tiene beneficio en la evaluación de grupos especiales de pacientes como las que presentan citologías negativas para lesión intraepitelial o malignidad pero con una prueba de VPHAR positiva. También podría tener valor práctico cuando se evalúa a grupos de pacientes especiales como postmenopáusicas y adolescentes con infección por VPHAR, independientemente de la edad (76,77,95,109).

El diseño de algoritmos de manejo clínico deberá apoyarse en la interpretación combinada de los resultados de las pruebas morfológicas, moleculares e inmunohisto-citoquímicas de laboratorios, para contribuir en el pronóstico de la evolución de la enfermedad y su tratamiento, que permita minimizar la aplicación de procedimientos invasivos innecesarios. La Tabla 1 muestra una propuesta de posible riesgo de enfermedad, de acuerdo a la interpretación combinada de resultados de laboratorio. El hallazgo citológico definiría, junto con las pruebas de VPH y la inmunoreactividad para p16INK4a/Ki-67 el posible riesgo de desarrollo de enfermedad neoplásica en el cuello uterino. Así tenemos por ejemplo el caso de pacientes con citología atípica (ASCUS), VPH positivo e inmunoreactividad negativa, el riesgo sería bajo. Mientras que en un caso con ASC-H, VPH positivo e inmunoreactividad negativa, el

riesgo sería moderado. Una paciente con citología compatible con LSIL (VPH) e inmunoreactividad negativa sería una paciente con infección común por VPH pero sin neoplasia. En resumen, a medida que la severidad de la lesión es mayor y las pruebas complementarias sean positivas, mayor será el riesgo de desarrollar neoplasia del cuello uterino.

Para ilustrar todo lo anteriormente descrito, se presentan imágenes citológicas (Figura 1), como ejemplo de los resultados de la aplicación de la técnica inmunocitoquímica para detectar simultáneamente biomarcadores como p16INK4a y Ki-67 en células epiteliales del cuello uterino con atipias.

Conclusiones

El cáncer es curable si se diagnostica a tiempo. Las medidas preventivas constituyen en la actualidad la principal herramienta para erradicar el cáncer de cuello uterino asociado a infección persistente por VPH de alto riesgo oncogénico. El uso de biomarcadores moleculares representa una alternativa eficaz en los conceptos modernos de pesquisa de cáncer de cuello uterino. Actualmente, las investigaciones se orientan a descubrir, caracterizar y validar estos y otros biomarcadores asociados a la carcinogénesis del cuello uterino inducida por VPHAR y su aplicación práctica en el manejo clínico efectivo de la paciente, en conjunto con la citología y pruebas moleculares para proporcionar el

Tabla 1. Algoritmo de manejo clínico combinando los resultados de las diferentes pruebas en la pesquisa de cáncer de cuello uterino.

Citología	Infección por VPHAR	Inmunoreactividad para p16INK4a/Ki-67	Riesgo de desarrollo de enfermedad neoplásica en cuello uterino*.
Negativa	Negativa Positiva	Inmunonegativa Inmunopositiva	Nulo Moderado/elevado
Positiva	Negativa	Inmunonegativa	Bajo
Positiva	Positiva	Inmunonegativa	Bajo/moderado
Positiva	Positiva	Inmunopositiva	Elevado/ muy elevado

Citología positiva incluye: atipias, lesión intraepitelial escamosa y cáncer invasor.

*Dependerá del grado de anomalías citológicas (atipias en células inmaduras que no descartan una lesión intraepitelial escamosa de alto grado (ASC-H) o lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL), del tipo VPH y de la intensidad de la inmunoreactividad.

mejor cuidado a la paciente con riesgo para displasia de cuello uterino. Aunque los presentes resultados son muy prometedores, antes de que dichas pruebas sean incorporadas a los laboratorios y programas de pesquisa primaria deberán validarse mediante nuevos ensayos clínicos, que aseguren la efectividad de los mismos, en términos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo. También debería determinarse el costo efectivo para la elección de los ensayos a realizar, orientados a la detección específica de lesiones intraepiteliales de alto grado.

Referencias

- WHO / ICO. Information Centre on HPV and cervical cancer (HPV Information Centre). 2010. Human papillomavirus and related cancers. Summary report update. November 10, 2010. Available at: http://apps.who.int/hpvcentre/statistics/dynamic/ico/country_pdf/XWX.pdf. Last accessed on 30 May 2013.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189:12-19.
- Toro de Méndez M. Caracterización inmunofenotípica del cáncer de cuello uterino asociado a infección por virus papiloma humano (VPH). 2006. Tesis Doctoral. ISSN 978-84-370-6635-6 Dep. Legal: V-4917-2007.
- Moscicki AB, Schiffman M, Burchell A, Albero G, Giuliano AR, Goodman MT, Kjaer SK, Palefsky J. Updating the natural history of human papillomavirus and anogenital cancers. *Vaccine* 2012;30 :F24-F33.
- Ciesielska U, Nowińska K, Podhorska-Okołów M, Dziegiel P. The role of human papillomavirus in the malignant transformation of cervix epithelial cells and the importance of vaccination against this virus. *Adv Clin Exp Med.* 2012;21:235-244.
- Crawford R, Grignon AL, Kitson S, Winder DM, Ball SL, Vaughan K, Stanley MA, Sterling JC, Goon PK. High prevalence of HPV in non-cervical sites of women with abnormal cervical cytology. *BMC Cancer.* 2011;11:473-478.
- Hartwig S, Syrjänen S, Dominiak-Felden G, Brotons M, Castellsagué X. Estimation of the epidemiological burden of human papillomavirus-related cancers and non-malignant diseases in men in Europe: a review. *BMC Cancer.* 2012;12:30-46.
- McLaughlin-Drubin ME, Meyers J, Munger K. Cancer associated human papillomaviruses. *Curr Opin Virol.* 2012;2:459-466.
- Wittekindt C, Wagner S, Mayer CS, Klussmann JP. Basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2012;11:Doc09.
- Steenbergen RD, de Wilde J, Wilting SM, et al. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol.* 2005;32 Suppl 1:S25-S33.
- Rajkumar T, Sabitha K, Vijayalakshmi N, Shirley S, Bose MV, Gopal G, Selvaluxmy G. Identification

- and validation of genes involved in cervical tumourigenesis. *BMC Cancer*. 2011;11:80-93.
12. Skoog L, Tani E. Immunocytochemistry: an indispensable technique in routine cytology. *Cytopathology*. 2011;22:215-229.
 13. Brown CA, Bogers J, Sahebali S, et al. Role of protein biomarkers in the detection of high-grade disease in cervical cancer screening programs. *J Oncol*. 2012;289315.
 14. Hwang SJ, Shroyer KR. Biomarkers of cervical dysplasia and carcinoma. *J Oncol*. 2012;2012:507286.
 15. Pinto AP, Degen M, Villa LL, Cibas ES. Immunomarkers in gynecologic cytology: the search for the ideal 'biomolecular Papanicolaou test'. *Acta Cytol*. 2012;56:109-121.
 16. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002;287:2114-2119.
 17. Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional. Capítulo 22. Tracto genital femenino. Elsevier, Ed 7ª. 2005. Pags: 1079-1080.
 18. Toro de Méndez M, Ferrández Izquierdo A. Detection of human papilloma virus (HPV) in liquid-based cervical samples. Correlation with protein p16INK4a expression. *Invest Clin*. 2011;52:3-14.
 19. Shidham VB, Mehrotra R, Varsegi G, D'Amore KL, Hunt B, Narayan R. p16 immunocytochemistry on cell blocks as an adjunct to cervical cytology: Potential reflex testing on specially prepared cell blocks from residual liquid-based cytology specimens. *Cytojournal*. 2011;8:1.
 20. Pinto AP, Crum CP, Hirsch MS. Molecular markers of early cervical neoplasia. *Diagn Histopathol (Oxf)*. 2010;16:445-454.
 21. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012;30:F55-F70.
 22. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:690-698.
 23. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodríguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007;370:890-907.
 24. Schiffman M, Wentzensen N. Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013;22:553-560.
 25. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 1998;338:423-428.
 26. Almonte M, Albero G, Molano M, Carcamo C, García PJ, Pérez G. Risk factors for human papillomavirus exposure and co-factors for cervical cancer in Latin America and the Caribbean. *Vaccine*. 2008;26:L16-L36.
 27. Yetimallar H, Kasap B, Cukurova K, Yildiz A, Keklik A, Soylyu F. Cofactors in human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Arch Gynecol Obstet*. 2012;285:805-810.
 28. Lizano M, Berumen J, García-Carrancá A. HPV-related carcinogenesis: basic concepts, viral types and variants. *Arch Med Res*. 2009;40:428-434.
 29. Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomavirus: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* 2003;22:5201-5207.
 30. McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomavirus. *Virus Res*. 2009;143:195-208.
 31. Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol*. 2009;19:97-113.
 32. Pim D, Banks L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. *APMIS*. 2010;118:471-493.
 33. de Villiers E, Bernard H, Fauquet C, Broker T, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17- 27.
 34. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7:453-459.
 35. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348:518-527.
 36. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human

- papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348:518-527.
37. Alemany L, Pérez C, Tous S, Llombart-Bosch A, Lloveras B, Lerma E, Guarch R, Andújar M, Pelayo A, Alejo M, Ordi J, Klaustermeier J, Velasco J, Guimerà N, Clavero O, Castellsagué X, Quint W, Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S; Spanish study group RIS HPV TT. Human papillomavirus genotype distribution in cervical cancer cases in Spain. Implications for prevention. *Gynecol Oncol.* 2011;124:512-517.
 38. Castellsagué X, Iftner T, Roura E, et al. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus infection of the cervix in Spain: the CLEOPATRE study. *J Med Virol.* 2012;84:947-956.
 39. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:342-350.
 40. Lehoux M, D'Abramo CM, Archambault J. Molecular mechanisms of human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Public Health Genomics.* 2009;12:268-280.
 41. Litjens RJ, Hopman AH, van de Vijver KK, Ramaekers FC, Kruitwagen RF, Kruse AJ. Molecular biomarkers in cervical cancer diagnosis: a critical appraisal. *Expert Opin Med Diagn.* 2013;7:365-377.
 42. Rositch AF, Koshiol J, Hudgens MG, Razzaghi H, Backes DM, Pimenta JM, Franco EL, Poole C, Smith JS. Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: A literature review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 2013;133:1271-1285.
 43. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* 2004;78:11451-11460.
 44. Rodríguez AC, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Solomon D, Guillén D, Alfaro M, Morales J, Hutchinson M, Katki H, Cheung L, Wacholder S, Burk RD. Longitudinal study of human papillomavirus persistence and cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3: critical role of duration of infection. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102:315-324.
 45. Bodily J, Laimins LA. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol.* 2011;19:33-39.
 46. Chen JJ. Genomic instability induced by human papillomavirus oncogenes. *NAJ Med Sci.* 2010;3:43-47.
 47. Korzeniewski N, Spardy N, Duensing A, Duensing S. Genomic instability and cancer: lessons learned from human papillomaviruses. *Cancer Lett.* 2011;305:113-122.
 48. Münger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, Zacny VL. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene.* 2001;20:7888-7898.
 49. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene.* 2001;20:7874-7887.
 50. Robbins y Cotran. *Patología estructural y funcional.* Capítulo 7. Neoplasia. Elsevier, Ed 7ª. 2005. Pags: 273-346.
 51. Serrano M. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Experimental cell research* 1997;237:7-13.
 52. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer.* 2001;92:276-284.
 53. Sahebali S, Depuydt CE, Segers K, Moeneclaeys LM, Vereecken AJ, Van Marck E, Bogers JJ. P16INK4a as an adjunct marker in liquid-based cervical cytology. *Int J Cancer.* 2004;108:871-876.
 54. Rajčani J, Adamkov M, Hybenova J, Jackuliak J, Benčat M. Diagnostic role of p16/INK4A protein in Human Papillomavirus (HPV) induced cervical dysplasia. *Cent. Eur. J. Biol.*, 2010; 5: 554-571.
 55. Witkiewicz AK, Knudsen KE, Dicker AP, Knudsen ES. The meaning of p16INK4a expression in tumors. Functional significance, clinical associations and future developments. *Cell cycle.* 2011;10:2497-2503.
 56. von Knebel Doeberitz M, Reuschenbach M, Schmidt D, Bergeron C. Biomarkers for cervical cancer screening: the role of p16INK4a to highlight transforming HPV infections. *Expert Rev Proteomics* 2012;9:149-163.
 57. Von Knebel Doeberitz M, Wentzensen N, von Knebel Doeberitz C. Biomarkers in screening of cervical cancer in modern gynecological cytopathology. In *Modern uterine cytopathology. Moving to the molecular smear.* Meisels A, Morin C. ASCP Press. Chicago IL. 2007. Pags:237-242.
 58. Safaeian M, Solomon D, Castle PE. Cervical cancer prevention--cervical screening: science in evolution. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2007;34:739-760.
 59. Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer*

- Epidemiol Biomarkers Prev., 2008;17:2536-2545.
60. Peralta-Zaragoza O, Deas J, Gómez-Cerón C, García-Suastegui WA, Fierros-Zárate Gdel S, Jacobo-Herrera NJ. HPV-Based Screening, Triage, Treatment, and Followup Strategies in the Management of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Obstet Gynecol Int.* 2013;9:12780.
 61. Waldstrom M, Christensen RK, Ornskov D. Evaluation of p16INK4a/Ki-67 dual stain comparison with an mRNA human papillomavirus test on liquid-based cytology samples with low-grade squamous intraepithelial lesion. *Cancer Cytopathology*, 2013;121:136-145.
 62. Toro de Méndez M, Llombart Bosch A. Detection and Genotyping of Human Papillomavirus DNA Using Polymerase Chain Reaction Short PCR Fragment 10-Line Probe Assay in Abnormal Papanicolaou-Stained Cervicovaginal Smears. *Acta Cytologica* 2009;53:540-547.
 63. Castle PE, Stoler MH, Wright TC Jr, Sharma A, Wright TL, Behrens CM. Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the ATHENA study. *Lancet Oncol.*, 2011;12:880-890.
 64. Cuzick J, Cadman L, Mesher D, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L, Terry G, Liddle S, Wright C, Lyons D, Szarewski A. Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population. *Br J Cancer.* 2013 Mar 5;108(4):908-913.
 65. Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, Arbyn M, Bosch FX, Cuzick J, Dillner J, Heideman DA, Snijders PJ. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer.* 2009;124:516-520.
 66. Masasad LS, Einsten MH, Huh WK, Katki HA, Schiffman M, Solomon D, Wentzensen N, Lawson HW. 2012 ASCCP Consensus Guidelines Conference. 2012 update consensus guidelines for the management of abnormal cervical cancer screening test and cancer precursors. *J Low Tract Dis.*, 2013;17:S1-S27.
 67. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Int.* 1998 a;48:580-585.
 68. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol.* 1998 b;153:1741-1748.
 69. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, Kurman RJ, Schmidt D, Stoler M, von Knebel Doeberitz M. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2002;26:1389-1399.
 70. Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD, Hildesheim A, Bratti MC, Wright T, Rodriguez AC, Chen S, Reichert A, von Knebel Doeberitz C, Ridder R, von Knebel Doeberitz M. Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 2004;13:1355-1360.
 71. Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, Ridder R; European CINtec Histology Study Group. Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol.*, 2010;133:395-406.
 72. Samama B, Schaeffer C, Boehm N. P16 expression in relation to human papillomavirus in liquid-based cervical smears. *Gynecol Oncol.*, 2008;109:285-290.
 73. Nieh S, Chen SF, Chu TY, et al. Is p16(INK4A) expression more useful than human papillomavirus test to determine the outcome of atypical squamous cells of undetermined significance-categorized Pap smear? A comparative analysis using abnormal cervical smears with follow-up biopsies. *Gynecol Oncol.* 2005;97:35-40.
 74. Sahebali S, Depuydt CE, Boulet GA, Arbyn M, Moeneclaey LM, Vereecken AJ, Van Marck EA, Bogers Immunocytochemistry in liquid-based cervical cytology: analysis of clinical use following a cross-sectional study. *Int J Cancer.* 2006;118:1254-1260.
 75. Ekalaksananan T, Pientong C, Kongyingyoes B, Chaiwongkot A, Yuenyao P, Kleebkaow P, Kritpetcharat O, Evans MF. Combined p16INK4a and human papillomavirus testing improves the prediction of cervical intraepithelial neoplasia (CIN II-III) in Thai patients with low-grade cytological abnormalities. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 2011;12:1777-1783.
 76. Ordi J, Garcia S, del Pino M, Landolfi S, Alonso I, Quintó L, Torné A. p16 INK4a immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women. *Int J Gynecol Pathol.*, 2009;28:90-97.
 77. Denton KJ, Bergeron C, Klement P, et al. The sensitivity and specificity of p16INK4a cytology

- vs. HPV testing for detecting high-grade cervical disease in the triage of ASCUS and LSIL Pap cytology results. *Am J Clin Pathol.* 2010;134:12-21.
78. Gupta R, Srinivasan R, Nijhawan R, Suri V, Uppal R. Protein p 16INK4A expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Indian J Pathol Microbiol.*, 2010;53:7-11.
 79. Izaaks CD, Truter EJ, Khan S. Prevalence of human papilloma virus in cytological abnormalities: Association of risk factors and cytomorphological findings. *Cytojournal.* 2012;9:19.
 80. Amaro-Filho SM, Golub JE, Nuovo GJ, Cunha CB, Levi JE, Villa LL, Andrade CV, Russomano FB, Tristão A, Pires A, Nicol AF. A comparative analysis of clinical and molecular factors with the stage of cervical cancer in a Brazilian cohort. *PLoS One.* 2013;8:e57810.
 81. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, et al. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2001;25:884-891.
 82. Guo M, Warriage I, Mutyala B, Patel S, Lin E, Gong Y, Sneige N. Evaluation of p16 immunostaining to predict high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with Pap results of atypical squamous cells of undetermined significance. *Diagn Cytopathol.*, 2011;39:482-488.
 83. Halloush RA, Akpolat I, Jim Zhai Q, Schwartz MR, Mody DR. Comparison of ProEx C with p16INK4a and Ki-67 immunohistochemical staining of cell blocks prepared from residual liquid-based cervicovaginal material: a pilot study. *Cancer.* 2008;114:474-480.
 84. Grapsa D, Frangou-Plemenou M, Kondi-Pafiti A, Stergiou E, Nicolopoulou-Stamati P, Patsouris E, Chelidonis G, Athanassiadou P. Immunocytochemical expression of P53, PTEN, FAS (CD95), P16INK4A and HPV L1 major capsid proteins in ThinPrep cervical samples with squamous intraepithelial lesions. *Diagn Cytopathol.* 2013 Jun 1. doi: 10.1002/dc.23003.
 85. Riethdorf L, Riethdorf S, Lee K, Cviko A, Löning T, Crum C. Human papillomavirus, expression of p16INK4a, and early endocervical glandular neoplasia. *Hum Pathol.*, 2002;33:899-904.
 86. Murphy N, Heffron CCB, King B, Ganuguapati UG, Ring M, McGuinness E, Shiels O, O'Leary JJ. P16INK4a positivity in benign, premalignant and malignant cervical glandular lesions: a potential diagnostic problem. *Virchows Arch.*, 2004;445:610-615.
 87. Mulvany NJ, DG, Sharyn, Wilson M. Diagnostic utility of p16INK4a: a reappraisal of its use in cervical biopsies. *Pathology* 2008;40:335-344.
 88. Redmann R, Rufforny I, Liu C, Wilkinson EJ, Massoll NA. The utility of p16INK4a in discriminating between cervical intraepithelial neoplasia I and nonneoplastic equivocal lesions of the cervix. *Arch Pathol Lab Med.*, 2008;132:795-799.
 89. Negri G, Vittadello F, Romano F, Kasal A, Rivasi F, Girlando S, Mian C, Egarter-Vigl E. p16INK4a expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. *Virchows Arch.*, 2004;445:616-620.
 90. Lee S, Kim H, Kim H, Kim C, Kim I. The Utility of p16INK4a and Ki-67 as a Conjunctive Tool in Uterine Cervical Lesions. *Korean J Pathol.*, 2012;46:253-260.
 91. Samarawardana P, Dehn DL, Singh M, Franquemont D, Thompson C, Gaido L, Torkko KC, Homer P, Burke S, Titmus MA, Nayi V, Shroyer KR. p16(INK4a) is superior to high-risk human papillomavirus testing in cervical cytology for the prediction of underlying high-grade dysplasia. *Cancer Cytopathol.*, 2010;118:146-156.
 92. Gustinucci D, Passamonti B, Cesarini E, Butera D, Palmieri EA, Bulletti S, Carlanì A, Staiano M, D'Amico MR, D'Angelo V, Di Dato E, Martinelli N, Malaspina M, Spita N, Tintori B, Fulciniti F. Role of p16(INK4a) cytology testing as an adjunct to enhance the diagnostic specificity and accuracy in human papillomavirus-positive women within an organized cervical cancer screening program. *Acta Cytol.*, 2012;56:506-514.
 93. Reuschenbach M, Seiz M, von Knebel Doeberitz C, Vinokurova S, Duwe A, Ridder R, Sartor H, Kommos F, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M. Evaluation of cervical cone biopsies for coexpression of p16INK4a and Ki-67 in epithelial cells. *Int J Cancer.*, 2012;130:388-394.
 94. Galgano MT, Castle PE, Atkins KA, Brix WK, Nassau SR, Stoler MH. Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. *Am J Surg Pathol.*, 2010;34:1077-1087.
 95. Killeen JL, Dye T, Grace C, Hiraoka M. Improved Abnormal Pap Smear Triage Using Cervical Cancer Biomarkers. *J Low Genit Tract Dis.*, 2013 Jun 11.
 96. del Pino M, Garcia S, Fusté V, Alonso I, Fusté P, Torné A, Ordi J. Value of p16(INK4a) as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade I. *Am J Obstet Gynecol.*, 2009;201:488.e1-7.
 97. Holladay EB, Logan S, Arnold J, Knesel B, Smith GDA comparison of the clinical utility

- of p16(INK4a) immunolocalization with the presence of human papillomavirus by hybrid capture 2 for the detection of cervical dysplasia/neoplasia. *Cancer*. 2006;108:451-461.
98. Meisels A, Morín C. Modern uterine cytopathology. Moving to the molecular smear. Chapter 7. A new era in molecular and serologic diagnosis of HPV infections: Technical considerations. ASCP Press, Chicago, IL. 2007, Pag:305-358.
 99. Atkins K. p16INK4a/Ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASC-US and LSIL Papanicolaou cytology. *Cancer Cytopathol.*, 2011;119:145-147.
 100. Samarawardana P, Singh M, Shroyer KR. Dual stain immunohistochemical localization of p16INK4A and ki-67: a synergistic approach to identify clinically significant cervical mucosal lesions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011;19:514-518.
 101. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R. p16/Ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou cytology. *Cancer Cytopathology* 2011;119:158-166.
 102. Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, et al. Triage Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol Oncol*. 2011;121:505-509.
 103. Yoshida T, Sano T, Kanuma T, et al. Usefulness of CINtec® PLUS p16/Ki-67 double-staining in cytological screening of cervical cancer. *Acta Cytol*. 2011;55:413-420.
 104. Ingh M, Mockler D, Akalin A, et al. Immunocytochemical colocalization of P16(INK4a) and Ki-67 predicts CIN2/3 and AIS/adenocarcinoma. *Cancer Cytopathol*. 2012;120:26-34.
 105. Donà MG, Vocaturo A, Giuliani M, et al. p16/Ki-67 dual staining in cervico-vaginal cytology: Correlation with histology, Human Papillomavirus detection and genotyping in women undergoing colposcopy. *Gynecol Oncol*. 2012;126:198-202.
 106. Loghavi S, Walts AE, Bose S. CINtec® PLUS dual immunostain: A triage tool for cervical pap smears with atypical squamous cells of undetermined significance and low grade squamous intraepithelial lesion. *Diagn Cytopathol*. 2013;41:582-587.
 107. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, et al. Performance of p16/Ki-67 immunostaining to detect cervical cancer precursors in a colposcopy referral population. *Clin Cancer Res* 2012;18:4154-4162.
 108. Rokita W, Kedzia W, Pruski D, Friebe Z, Nowak-Markwitz E, Spaczyński R, Karowicz-Bilińska A, Spaczyński M. Comparison of the effectiveness of cytodiagnosics, molecular identification of HPV HR and CINtecPLUS test to identify LG SIL and HG SIL. *Ginekol Pol.*, 2012;83:894-898.
 109. Longatto Filho A, Utagawa ML, Shirata NK, et al. Immunocytochemical expression of p16INK4A and Ki-67 in cytologically negative and equivocal pap smears positive for oncogenic human papillomavirus. *Int J Gynecol Pathol*. 2005;24:118-124.

TESTIGOS DE LA HISTORIA: PROCESO DE LA CALIDAD HEMATOLÓGICA (HEMATIMETRÍA) EN VENEZUELA

Amadita López¹, Yadira Pazo²

¹Cátedra de Hematología. Escuela de Bioanálisis. UCV, ²Servicio de Bioanálisis Rafael Rangel del Hospital Vargas de Caracas.

Recibido para publicación mayo 2013. Aprobado para publicación julio 2013.

RESUMEN:

La calidad hematológica en Venezuela, orientada a garantizar la confiabilidad de los resultados de la hematimetría, ha sido difícil de implementar. Los esfuerzos tanto individuales como institucionales, descritos según nuestras vivencias en el área, confirman la necesidad de continuar trabajando para lograr la acreditación de los laboratorios.

Palabras Clave: calidad hematológica, hematimetría, hemoglobina, estandarización, programas de intercomparación, ISO 15189

HEMATOLOGY QUALITY PROCESS (HEMOGRAM) IN VENEZUELA.

SUMMARY

Hematologic quality in Venezuela, intended to ensure the reliability of the CBC results, has been difficult to implement. Both individual and institutional efforts, described according to our experiences in the area, confirm the need to continue the work to achieve laboratories accreditation.

Key words: haematological quality, cbc, hemoglobin, standardization, subtropical programs, ISO 15189

Los procesos de calidad hematológica en Venezuela, orientados a garantizar la calidad de los resultados emitidos, aún con las técnicas convencionales, toman un mayor impulso con la introducción de los autoanalizadores hematológicos en los años 70. El gran número de resultados generados por estos instrumentos, requerían un esfuerzo extra para su control. Para aquel entonces el uso de controles comerciales estaba principalmente orientado al “ajuste” de los equipos y el control de los mismos se sostenía en la comparación con la tecnología manual.

A nivel internacional, en esos años, el ICSH (International Committee for Standardization in Hematology) desplegó una gran actividad en procesos de estandarización. Realizan un simposium en 1974 sobre control de calidad en Hematología, cuyos principales temas y otros se recogen en la publicación de Lewis y Coster (2) al año siguiente. Esta publicación fue nuestro primer texto de encuentro con estos temas, unos 10 años después.

Lo que comenzó como control de calidad abarcando los procesos preanalíticos, analíticos y postanalíticos, ha evolucionado a Aseguramiento de la Calidad y actualmente Gestión de la Calidad, debido a las necesidades crecientes de control y supervisión de los

sistemas de trabajo y las normativas que los rigen. Su objetivo es obtener resultados válidos que puedan utilizarse con confianza tanto para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento del paciente como para cualquier estudio de investigación. En este proceso destacaremos 3 entidades que, trabajando paralelamente o en conjunto, llevaron a la calidad de la hematimetría al lugar donde nos encontramos actualmente:

Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (M.S.A.S) hoy Ministerio del Poder Popular para la Salud (M.P.P.S)

En el M.S.A.S. desde 1936 se implementan procedimientos para controlar la calidad de los análisis. Para 1984 en la Oficina Sectorial de Laboratorio bajo la jefatura del Lic. J.C. Galindo, se incorpora en el organigrama la sección de Control de la Calidad, que se encargó de programar cursos, talleres, foros y proficiencias de cobertura nacional. Allí la Lic. I. Corro y su equipo desarrollaron una gran actividad y esfuerzo, con limitaciones de las herramientas de trabajo y, algunas veces, débil receptividad de los laboratorios. En el área de Hematología, en 1985 distribuyen un hemolisado de sangre para la determinación de hemoglobina y ocasionalmente frotis sanguíneos a unos

Solicitar copia a: Amadita Lopez (amadita.lopez@gmail.com)

400 laboratorios (incluían al M.S.A.S. la mayoría, pero también del I.V.S.S., IPASME y algunos privados) con un bajo índice de repuestas (42%) (1). Estos programas no perduraron en el tiempo y a la fecha, aún cuando el Comité Ejecutivo de Fecobiove ha intentado diferentes propuestas, no conocemos se haya materializado ninguna (2).

Cátedra de Hematología. Escuela de Bioanálisis. UCV

Paralelamente, a mediados de los 80, la Cátedra de Hematología de la Escuela Bioanálisis de la UCV, se inicia en los temas de calidad, incentivados tanto por el Prof. F Fragachán como por las discrepancias observadas en los resultados de los pacientes suministrados para la docencia por laboratorios externos, procesados por éstos en autoanalizadores hematológicos y en la Cátedra mediante metodología manual.

Se estandarizaron primero reactivos, materiales y las técnicas manuales, siguiendo los métodos recomendados por los organismos internacionales, y aunque los resultados manuales cumplían con los requisitos de variabilidad y exactitud publicados para esa metodología, se continuaba con la discrepancia de resultados con los otros laboratorios, sobre todo en hemoglobina.

La donación a la Escuela de Bioanálisis, de un autoanalizador hematológico semiautomático Baker modelo 7000, por el I.V.S.S, marcó el comienzo de la automatización en la Cátedra. Se tuvieron serias dificultades para su calibración, puesto que la casa que lo representaba no disponía de calibrador, ni respuesta adecuada a los requerimientos, imposibilitando la comparabilidad manual-automatizado.

Gracias a la valiosa intervención del técnico de Coulter, Sr. JJ Correa, a quien se solicita ayuda con ese equipo, Coulter de Venezuela facilita un autoanalizador hematológico automático, modelo Ssr, para realizar el trabajo y posteriormente dona a la Cátedra de Hematología el renombrado Coulter S-Plus con el que se finaliza el mismo, brindando además una excelente asistencia técnica, oferta de reactivos, calibradores y controles.

Todos estos aspectos se plasmaron en el trabajo de ascenso (3) dónde se describen los lineamientos para la garantía de calidad hematológica. Además, se presentan los resultados de la estandarización de la metodología manual, la comparación de los métodos manuales versus los automatizados y los automatizados entre sí (Baker vs Coulter), bases para la realización en 1988 y 1993 de la comparación interlaboratorio. La misma

se realiza a laboratorios del área Metropolitana, con equipos automatizados de diferentes casas comerciales, donde resaltaba un error sistemático de hemoglobina de hasta 21 g/L (2,1 g/dL) en la primera prueba y de hasta 11 g/L (1.1g/dL) en la segunda realizada 5 años después. Estos resultados se presentaron al jurado y en múltiples cursos, congresos, jornadas y por supuesto se incorporaron a la docencia de la Cátedra todos estos conceptos y herramientas.

En 1997 la Cátedra logra la participación en el Programa Internacional de Evaluación de la Calidad Externa en Hematología (IEQAS-H) patrocinado por la OMS, alcanzando validar la trazabilidad de la hemoglobina a los estándares internacionales, al obtener índices de desviación inferiores a 2.0 tanto por tecnología manual como automatizada. Sin embargo, en la comparación interlaboratorio realizada en esa fecha, los resultados fueron similares a los de años anteriores.

En el 2000, como preámbulo a elaborar la plataforma para un programa de evaluación externa (4), se realizó otra intercomparación con los mismos laboratorios del los ensayos anteriores, pero incluyendo 14 nuevos. En esta oportunidad se detectan algunos laboratorios con los valores de hemoglobina en rango, pero otros todavía fuera del esperado

Motivados por la invitación a las XV Jornadas Científicas de la SVBE, y con 4 años de experiencia en el Programa de Aseguramiento de la Calidad Interlaboratorio (PACI-IQAP) ofrecido por Repreclin Lab y en el conocimiento del buen desempeño de algunos de los laboratorios que habiendo participado en las comparaciones interlaboratorios anteriores, participaban ahora en este programa (PACI-IQAP), se repite la intercomparación en el 2005 en la Cátedra de Hematología, a los mismos laboratorios, con la misma metodología y con la participación en el IEQAS-H con excelentes resultados para ese período.

El resumen de todos ellos puede verse en la tabla 1 y aunque ha mejorado el desempeño, todavía quedan laboratorios reportando valores de hemoglobina fuera de los rangos aceptables.

Estos valores de inexactitud en laboratorios, representan una muestra mínima de la variabilidad de resultados emitidos, no sólo de los pacientes, sino también de los trabajos de investigación que utilizando resultados inexactos pueden llegar a conclusiones erróneas. Por eso las árbitros de publicaciones o los editores de revistas, deben exigir la demostración de que los resultados de las

Tabla 1. Error sistemático de la determinación de hemoglobina en los diferentes períodos evaluados

Evaluación interlaboratorio	1988	1993	1997	2000	2005
Laboratorios participantes	9	10	16	30	30
Diferencia Hb (g/L)					
Mínima y Máxima	-2,4 a -21	1 a -11	6 a -12	0 a -16	+6 a -16
Diferencia promedio	- 9,5	- 3,1	- 1,9	- 6,8	-1.5

pruebas presentadas provienen de un instrumento que cumplía con los requisitos de calidad vigentes.

Federación de Colegios de Bioanalistas de Venezuela (FECOBIOVE)

En 1993, en la XXXIV Convención Nacional de Bioanalistas, se aprobó tomar iniciativas que atendieran el control de calidad, creándose el Plan Aval de Funcionamiento como un recurso gremial para controlar y supervisar la calidad de los análisis de laboratorio. Dicho plan enfrentó resistencia y en 1996 se realiza una Convención Extraordinaria donde se sustituye el Plan de Aval de Funcionamiento por el de Acreditación y Sistema de Calidad en Bioanálisis (5).

Después de creada la Comisión de Acreditación y Sistema de Calidad en Bioanálisis, coordinada por la Lic. Y. Pazo y con el respaldo de la FECOBIOVE presidida por la Lic. B. Chirinos, se realizan múltiples actividades relativas a los procesos de calidad de los laboratorios. Se inician relaciones de colaboración con COLABIOCLI Y OPS/OMS ofreciendo talleres y cursos para la formación de los bioanalistas en esta área. Dentro de ello se organiza y coordina el Foro Regional de Acreditación en el 2002

En el 2002-2003 dos hechos inciden directamente en los proyectos de calidad: se promulga la Ley del Sistema Venezolano para la Calidad donde se designa a SENCAMER como organismo rector, presidido en ese momento por la Lic. M. M. Toro y a nivel internacional, después de varios años de discusión, se publica la Norma "ISO 15189:2003 Laboratorios clínicos – Requisitos particulares para la calidad y la competencia" que SENCAMER establece como instrumento para la acreditación de los laboratorios clínicos en Venezuela.

Ese mismo año, FECOBIOVE suscribe con SENCAMER

un convenio como herramienta para garantizar la calidad de los Servicios de Bioanálisis a través de su acreditación. Ambos entes programaron y dictaron más de 25 cursos, con la colaboración del PTB de Alemania, para difundir la Norma ISO 15189, instruir para la elaboración de la Documentación del Sistema de Gestión de la Calidad de un Laboratorio Clínico, así como la formación de Auditores instruidos a través de FONDONORMA a Bioanalistas propuestos por FECOBIOVE y SENCAMER.

En el año 2005 se incluyen en el portal de SENCAMER los links para acceder a la solicitud de Acreditación para los Laboratorios Clínicos y la Lic. T. Guillén, Directora de Acreditación, instauro el Comité Técnico de Laboratorios Clínicos con representantes del sector público, privado, universidades y centros de investigación, desarrollo e innovación vinculados al ámbito de los laboratorios clínicos, representantes del gremio de bioanalistas, de proveedores y usuarios.

Período productivo que, lamentablemente, se termina con la salida de la Lic. M. M. Toro de la Dirección de SENCAMER y designación del Dr. E. Samán, quien paulatinamente cambia las políticas de la Institución; no se convoca al Comité Técnico; no hay respuesta a los oficios del Comité Ejecutivo de la FECOBIOVE, ni a correspondencias de los integrantes del Comité Técnico; cambian hasta la página de SENCAMER y por supuesto retiran de la misma todo lo concerniente a la Acreditación del Laboratorio Clínico, con una misión y visión diferente del organismo que se mantiene hasta la actualidad, tal como puede leerse en su página web.

Las circunstancias obligan a modificar las estrategias, por lo que la Comisión de Acreditación y Sistema de Calidad en Bioanálisis, elabora con la asesoría de la Ing M. Piñero, una Guía para el Proceso de Acreditación

de Laboratorios Clínicos en Venezuela editada por FECOVIOBE (6), para orientar a los profesionales de bioanálisis en la elaboración de la documentación de calidad requerida por la norma COVENIN-ISO 15189:2004, marco de referencia obligado para los laboratorios de análisis clínico.

En el 2007 la misma comisión, coordinada ahora por la Lic. M. Herrera, selecciona de la Norma ISO 15189:2007 aquellos requisitos considerados fundamentales y viables de realizar por los laboratorios, a fin de definir los Requisitos Mínimos de Calidad con alcance a las áreas de gestión y técnicas de Hematología (hematología completa o hematimetría) y Bioquímica básica (glicemia, úrea, creatinina, colesterol, triglicéridos y transaminasas) en las fases preanalítica y analítica. Con ello diseña un plan piloto que debían cumplir los laboratorios para obtener la CERTIFICACIÓN FECOBIOVE

El plan piloto (aprobado en la XLIX Convención Nacional de Bioanalistas) se ofrece a 20 laboratorios entre públicos y privados, con jefes de servicio capacitados en el área o que hubiesen asistido a los cursos FECOBIOVE-SENCAMER durante el convenio. El 3 de Noviembre del 2007 se presenta el proyecto a los 15 laboratorios asistentes, se consolida el compromiso de participación, se firma el acuerdo de confidencialidad de las partes y se les asesoró y guió para elaborar la documentación de los requisitos solicitados a través de cursos, reuniones, tareas y asesorías. Concluye con la auditoria a esos laboratorios, realizados por entusiastas y colaboradores bioanalistas, con estudios de cuarto nivel en el área de calidad y con experiencia en auditorias. El 14 de Diciembre del 2009 en el acto programado por el comité ejecutivo de FECOBIOVE, presidido por la Lic. J. León se le hizo entrega a 4 laboratorios privados y 2 públicos de su CERTIFICADO DE FECOBIOVE, representando un producto tangible de muchos años de trabajo de la Comisión y del empeño y constancia de los participantes.

Se repite la convocatoria para el 2011 participando 5 laboratorios, obteniendo todos la Certificación. En el 2012 participan 20 laboratorios, fueron auditados y lograron la certificación 6 de ellos. Actualmente están cumpliéndose los lapsos para la convocatoria del 2013, con los mismos requisitos del 2010, que se espera amplíen para las próximas convocatorias.

La reciente renovación de la página web de la FECOBIOVE (7) donde ya se puede consultar el Plan de Certificación de Fecobiove y la posibilidad de publicar los laboratorios certificados, convirtiéndose en un portal de consulta para los usuarios y clientes a fin de

conocer los laboratorios certificados por ese organismo en Hematología y Química sanguínea básicas.

Considerando que hay más de 3000 laboratorios en Venezuela, ese pequeño número de participantes luce poco significativo, pero esperemos sea el germen que permita homogeneizar el desempeño y acortar la enorme brecha entre los diferentes laboratorios en Venezuela en la aplicación de los procesos de calidad, con miras al cumplimiento de las normativas internacionales.

Podríamos concluir que desde los años 80 a la actualidad, se han logrado progresos en los procesos de calidad de la hematimetría y al día de hoy prácticamente todos los laboratorios emplean autoanalizadores, con oferta de calibradores, controles comerciales para el control de calidad interno y posibilidad de participar en programas de comparación interlaboratorio, materiales para programas de evaluación externa (comerciales), herramientas requeridas para establecer un proceso de calidad analítica transparente, coherente y en mejoría continua, que puede ser auditado y certificado. Pero sobre todo, con profesionales comprometidos, algunos de ellos especialistas en el área de gestión de la calidad, con una actitud y constancia que acortará el camino para lograr que los servicios de bioanálisis satisfagan las normas y estándares de avanzada vigentes.

Referencias

1. Corro I. Comunicación Personal, 2002.
2. Lewis, S.M. and Coster, J.F. Quality Control in Haematology. Symposium of the International Committee for Standardization in Haematology. Academic Press, London, 1975.
3. López A.: Garantía de Calidad Hematológica. Trabajo de Ascenso a Profesor Agregado. Cátedra de Hematología. Escuela de Bioanálisis. UCV, 1994.
4. López A.: Plataforma para el desarrollo de un programa de evaluación externa de la calidad en Hematología. Trabajo de Ascenso a Profesor Asociado. Cátedra de Hematología. Escuela de Bioanálisis. UCV, 2001.
5. Pazo, Y. Acreditación y Sistema de Calidad en Bioanálisis In.: Peña Pirelli F. Más de 100 Años de Hechos y Realizaciones del Laboratorio Clínico en Venezuela. Vol I, 2010
6. Pazo, Y., López A., Chirinos, B. et al. Guía para el Proceso de Acreditación de Laboratorios Clínicos en Venezuela. FECOBIOVE, 2006
7. Plan de Certificación Fecobiove www.fecobiove.org/certificacion

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. 16

2013

Editorial	2
Biography of Dra. Ana Monzón de Orozco (1946-2013) Priva Zabner de Oziel y Noel Silva D.....	3
ORIGINAL ARTICLES:	
Prognostic values of LDH isoenzymes in patients with Non-Hodgkin's Lymphoma Priva Zabner de Oziel, Rosa Somoza, Valentina Wallis, Claudia Galicia, Jean Desenne, Ana Monzón de Orozco, Marina González, Gretta Acquatella, Marisela Morales, Yasmín Ordoñez, María Alejandra Torres, Antonieta Natale, Aixa Müller.....	6
Influence of diet on glucose phosphorylating activity of rat liver and small intestine Beatriz De La Torre.....	22
Pro12Ala Polymorphism Of The <i>PPAR</i> γ2 Gene, Ala54thr Polymorphism Of The <i>FABP2</i> Gene And Polymorphisms Of The <i>Apolipoprotein E</i> Gene In The Population Of "Eucaliptos" Of The Parroquia San Juan, Municipio Libertador Delimar Recio, Esther Révai, Mercedes Cerviño, Hilda Stekman, Isidro Piedra, María Fátima Garcés.....	28
REVIEW ARTICLE:	
Early Diagnosis Of Cervical Cancer Associated To Human Papillomavirus Morelva Toro de Méndez, Antonio Ferrández Izquierdo, Antonio LLombart Bosch	41
HISTORY ARTICLE:	
Hematology quality process (hemogram) in Venezuela. Amadita López, Yadira Pazo.....	54
Information for Authors	58

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

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

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