



Bogotá DC, Colombia - 4 al 7 de Noviembre de 2016 - Centro de Convenciones Gonzalo Jiménez de Quesada



XVI CONGRESO INTERNACIONAL DEL COLEGIO NACIONAL DE BACTERIOLOGÍA

MEMORIAS

SESIONES DEL DOMINGO

Calidad

[Actualización del sistema de calidad, Resolución 256 de 2016](#)

Daisy Mercedes Borrero Campos

[Las realidades de la metrología del laboratorio clínico en Colombia.](#)

Mercedes Salcedo-Cifuentes

[Vigilancia postcomercialización, gestión de efectos indeseados articulados a la atención segura del paciente](#)

Elkin Hernán Otálvaro Cifuentes

Inmunología y Hormonas

[Nuevos marcadores en Artritis Reumatoide: MMP-3.](#)

Claudia Marcela Tafur Amaya

[Activación y regulación de células B en condiciones normales y patológicas](#)

Sandra Milena Quijano Gómez

[Regulación de la respuesta inmune en cáncer mediada por fitomedicamentos](#)

Susana Fiorentino, Alejandra Gomez-Cadena, Amaia Martinez-Usatorre, Claudia Urueña, Alena Donda, Alfonso Barreto, Pedro Romero.

[Abordaje desde el laboratorio de la función tiroidea](#)

Dennise Ríos Rincón

Bioquímica Aplicada

[Importancia clínica de la Hiperhomocisteinemia](#)

Shirley Cruz Rubio

[Bioquímica aplicada al diagnóstico de la diabetes mellitus](#)

John E. Feliciano-Alfonso

[Ensayos ultramicroanalíticos para el pesquisaje y diagnóstico de enfermedades infecciosas. Presente y futuro.](#)

Irinia Yelena Valdivia Álvarez

[Pesquisa Neonatal Ampliada en Latinoamérica](#)

Eloísa Graciela Queiruga Bernini

Hematología

[Hematología: del laboratorio a la práctica clínica. - Detección de enfermedad mieloproliferativa a partir de un patrón de análisis en sangre periférica.](#)

María Clemencia Garnica Barrios

[Análisis molecular escalonado para la detección de variantes patogénicas en Hemofilia A en Colombia.](#)

Luz Karime Yunis, Adriana Linares Ballesteros, Edgar Cabrera, Juan J. Yunis

[Nuevos marcadores de riesgo trombótico: nucleosomas circulantes y NETs \(Neutrophil Extracellular Traps\)](#)

Viviana Marcela Rodríguez Pardo

Microbiología - Bacterias

[Estado actual de las Rickettsias en Colombia. Armando un rompecabezas](#)

Marylin Hidalgo Díaz

[Helicobacter pylori: un ejemplo de medicina traslacional en Gastroenterología](#)

Alba Alicia Trespalacios

Microbiología Aplicada

[Bioteconología: el aporte desde la Bacteriología](#)

Ruth Mérida Sánchez Mora

[Pruebas diagnósticas para confirmar el hiperadrenocorticismismo canino](#)

Diana Marcela Salamanca Chaparro

[Tecnología HTD \(hidro termo dinámica\) en pasteurización y esterilización de alimentos](#)

Luis Fernando Carvajal Osorio

[Perspectivas del uso de microorganismos para el manejo sanitario de explotaciones pecuarias e industriales](#)

Patricia Eugenia Vélez Arango

CONFERENCIAS

CALIDAD

Actualización del sistema de calidad, Resolución 256 de 2016

Daisy Mercedes Borrero Campos

Bacterióloga, Magíster en Dirección de Organizaciones de Salud Auditoría y Garantía de Calidad.
Gerencia y Administración Hospitalaria. Bogotá.

La Resolución 256 de 2016 por la cual se dictan disposiciones con relación al Sistema de Información está encaminado a estimular la competencia por calidad entre los agentes del sector, que paralelamente, permite, entre otros, a orientar a los usuarios en el ejercicio de los derechos y deberes que a su favor contempla el Sistema General de Seguridad Social en Salud.

Los Indicadores del Sistema de Información para la Calidad nos permiten monitorear la calidad de los Servicios de nuestras IPS, así como facilitar la toma de decisiones en la medida que contamos con datos que nos aportan mediciones objetivas.

En el artículo 2 de la resolución se menciona el **Ámbito de aplicación**, el cual va dirigido a las Entidades Administradoras de Planes de Beneficios —EAPB, a las Instituciones Prestadoras de Servicios de Salud, a los Servicios de Transporte Especial de Pacientes, a las Entidades Departamentales, Distritales y Municipales de Salud, al Instituto Nacional de Salud y al Organismo Técnico de Administración de la Cuenta de Alto Costo. Se excluyen los Profesionales independientes, las Entidades con objeto social diferente y la Entidades de los Regímenes especiales y de excepción contemplados en el artículo 279 de la Ley 100 de 1993 y la Ley 647 de 2001.

Finalidad del Monitoreo de la Calidad en Salud:

- Fomentar un adecuado uso y aprovechamiento de la información para el Mejoramiento de la Calidad en Salud.
- Gestionar el conocimiento y asegurar la implementación efectiva de intervenciones y estrategias para el logro de los resultados en Salud.

- Contribuir con la medición del desempeño y resultados de los agentes del SGSSS, para facilitar la toma de decisiones y suministrar a los ciudadanos información con la cual puedan ejercer el derecho a la libre elección.
- Promover acciones de mejoramiento, atendiendo al principio de eficiencia del sistema de información para la Calidad, contemplado en el artículo 47 del decreto 1011 de 2006 y las normas que lo modifiquen, adicionen o sustituyan.
- Ofrecer insumos para la referenciación por calidad entre los diferentes actores del sistema.

Dominios: Los dominios se encuentran distribuidos de la siguiente manera:

DOMINIO	INSTITUCIONES PRESTADORAS DE SERVICIOS DE SALUD	EMPRESAS ADMINISTRADO RAS DE PLANES DE BENEFICIOS	ENTIDADES TERRITORIALES DE SALUD
EFFECTIVIDAD	X	X	X
SEGURIDAD	X	-	-
EXPERIENCIA DE LA ATENCIÓN	X	X	X
GESTIÓN DEL RIESGO	-	X	X

El reporte de la Información es una herramienta muy importante porque integra de forma articulada información relevante de manera organizada, confiable, sistemática, segura y oportuna con el fin de organizar los datos obtenidos para determinar el comportamiento de lo que se está midiendo.

Las EAPB, las IPS y los Servicios de Transporte Especial de pacientes, deberán reportar la información de su competencia, contenida en los anexos técnicos N 2 y 3 de esta resolución a través de la plataforma de intercambio de información (PISIS) del sistema integral de información de la Protección Social-SISPRO del Ministerio.

INDICADORES:

Con respecto a los indicadores, la Resolución 0256 presenta variaciones como:

1. En eventos adversos se discriminan por tipo de evento adverso y por servicio (caídas, administración de medicamentos, úlceras, entre otros).

2. Respecto a los indicadores de satisfacción ya no se reporta total de pacientes satisfechos. Ahora se reporta: número de usuarios que respondieron "muy buena" a la pregunta: "¿Cómo calificaría su experiencia global respecto a los servicios de salud que ha recibido a través de su IPS?"

Número de usuarios que respondieron "buena" a la pregunta: "¿Cómo calificaría su experiencia global respecto a los servicios de salud que ha recibido a través de su IPS?"

Número de usuarios que respondieron "regular": "¿Cómo calificaría su experiencia global respecto a los servicios de salud que ha recibido a través de su IPS?" etc. En este orden de ideas la encuesta de satisfacción de nuestras IPS debe ser ajustada a las preguntas anteriormente mencionada.

FECHAS PARA EL REPORTE:

Fecha de Corte de la Información a reportar	Plazo para enviar el archivo plano	
Fecha de Corte	Desde:	Hasta:
De 2016-01-01 al 2016-06-30	2016-07-01	2016-07-31
De 2016-07-01 al 2016-12-31	2017-01-01	2017-01-31
y así sucesivamente:		
Primer día calendario del primer mes a reportar al último día calendario del último mes a reportar	Primer día calendario del siguiente mes de la fecha de corte de la Información a reportar	Último día calendario del siguiente mes de la fecha de corte de la Información a reportar.

De acuerdo a lo anterior expuesto es importante tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Ajuste sus fichas técnicas y la encuesta de satisfacción teniendo en cuenta los lineamientos de la resolución.
- El software y las agendas en físico deberán ser ajustadas para poder generar los reportes (RIPS).
- Es de vital importancia que todos los colaboradores de la IPS conozcan la Resolución 256.
- La información financiera se debe reportar a Supersalud.

Las realidades de la metrología del laboratorio clínico en Colombia.

Mercedes Salcedo-Cifuentes

Bacterióloga, Laboratorista Clínica, Especialista en Administración de la Calidad, Magíster en Epidemiología, PhD en Ciencias Biomédicas. Profesora asociada Facultad de Salud, Investigadora del grupo CALIMET Universidad del Valle. Cali.

Los laboratorios clínicos deben proporcionar información útil para el cuidado del paciente a través de la producción de resultados de laboratorio comparables en el

espacio y el tiempo. Este marco ideal dentro de un componente bioético tendría una importante aplicación clínica, económica, de calidad y de oportunidad, lo que contribuiría significativamente en la mejora de la atención en salud al permitir que los resultados de diferentes laboratorios clínicos fueran comparables universalmente.

Para el logro de este propósito, los resultados obtenidos por diferentes procesos analíticos rutinarios deben ser calibrados con materiales de control certificados usando el método de mayor nivel jerárquico de calibración¹. Esto involucra la existencia de una cadena ininterrumpida de trazabilidad metrológica entre los diferentes laboratorios a un método estándar de referencia, la cual se inicia con la definición inequívoca del mesurando o analito en estudio y termina con la jerarquía de calibración usada, proporcionando finalmente el resultado del paciente (1). Sólo a través de esta cadena ininterrumpida, los analistas pueden transferir de forma fiable la veracidad de sus mediciones. Sin embargo, no son los profesionales del diagnóstico, los directamente responsables de esta trazabilidad metrológica acumulada del sistema de medición, son los proveedores de los desarrollos tecnológicos cada vez más avanzados en el servicio de laboratorios clínico. Sin embargo, es responsabilidad del Bacteriólogo verificar que lo ofrecido por estos proveedores cumpla con los estándares metrológicos requeridos en las pruebas de diagnóstico clínico para la buena toma de decisiones por parte del médico (2).

De aquí que, junto a los sistemas de gestión de calidad implementados en el laboratorio clínico, sean estos los estándares de habilitación o acreditación, o los modelos ISO 9001 y 15189, la gestión de equipos y el control metrológico de las mediciones, debe esta implementado y ser el soporte de la trazabilidad metrológica de las mediciones que se llevan a cabo. La integración de estos dos modelos de gestión, permiten definir con una alta confiabilidad los intervalos de referencia y los límites de decisión clínica, aspectos críticos en el manejo del paciente (3).

Aquí se presentan los resultados de un trabajo exploratorio llevado a cabo en 10 laboratorios clínicos de mediana y alta complejidad, en donde se exploró: 1) conocimiento de un método usado para la definición de las especificaciones analíticas en el laboratorio; 2) la disponibilidad y calidad de la información sobre trazabilidad e incertidumbre de los sistemas de diagnóstico in vitro que usaban de rutina en el laboratorio clínico; 3) análisis de los resultados no conformes del control diario de los sistemas de medición (CCI) en el último año; 4) conocimiento si los organismos que les ofrecían programas de control externo de la calidad (PEEC) estaban certificados para ello y su importancia; 5) el control metrológico de las principales medidas físicas usadas en el laboratorio clínico (volumen, temperatura y masas) y 6) la gestión frente a los resultados arrojados por todos estos controles.

Los resultados evidenciaron debilidades marcadas en algunos de estos ítems valorados, pero en especial en lo que respecta a la gestión, es decir el reporte de

las no conformidades del sistema de control, el análisis, las acciones correctivas o preventivas y el seguimiento de la efectiva de estas últimas. Estos hallazgos fueron concordantes con el informe anual de actividades del Instituto Nacional de Salud (INS) presentado en el 2015 (4).

Teniendo en cuenta que los resultados producidos por los ensayos operados bajo diferentes condiciones ambientales, instrumentos y equipos de medición, llevan incertidumbre acumuladas tanto por la cadena metrológica involucrada en el sistema de medición como por los efectos aleatorios, debe realizarse una adecuada estimación de la incertidumbre combinada (5,6) y estas incertidumbres calculadas se deben comparar con los límites de incertidumbre apropiados para el método, con el fin de validar la utilidad clínica de la de medición (7).

Un punto importante a destacar en esta revisión, es que la aplicación del enfoque previamente ilustrada ya no es posible hacerlo por separado. Los componentes de un sistema de medición, es el equipo, los reactivos, los calibradores y los materiales de control, solo pueden ser garantizados si cumplimos con las especificaciones del fabricante. Cualquier cambio introducido por los usuarios o terceros, por ejemplo, el uso de reactivos, calibradores o controles materiales de diferentes proveedores, puede de hecho significativamente alterar la calidad del sistema de análisis. Por otra parte, una vez que los fabricantes de pruebas de diagnóstico in vitro han diseñado sistemas comerciales que según sus estándares cumplen con los requisitos de trazabilidad y calidad para la aplicación clínica (8), es tarea de los profesionales del diagnóstico verificar si los fabricantes han aplicado correctamente la trazabilidad de sus calibradores y si el sistema de medición ofrecido (equipo, reactivos y controles) es apropiado para su uso clínico.

Referencias

1. Panteghini M. Implementation of standardization in clinical practice: not always an easy task. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50: 1237–41.
2. Kallner A. Measurement performance goals: How they can be estimated and a view to managing them. *Scand J Clin Lab Invest* 2010; 70 (Suppl 242): 34–9.
3. Panteghini M, Ceriotti F. Obtaining reference intervals traceable to reference measurement systems: is it possible, who is responsible, what is the strategy? *Clin Chem Lab Med* 2012; 50: 813–7.
4. Red Colombiana de metrología. Subred salud. Informe anual de actividades. Bogotá 2015-03-02.
5. Panteghini M. Application of traceability concepts to analytical quality control may reconcile total error with uncertainty of measurement. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48: 7–10.
6. Braga F, Panteghini M. Verification of in vitro medical diagnostics (IVD) metrological traceability: Responsibilities and strategies. *Clin Chim Acta* 2014; 432:55–61.
7. Braga F, Infusino I, Panteghini M. Performance criteria for combined uncertainty budget in the implementation of metrological traceability. *Clin Chem Lab Med* 2015; 53: in press.
8. ISO 17511. In vitro diagnostic medical devices -- Measurement of quantities in biological samples -- Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials. 2003.

Vigilancia postcomercialización, gestión de efectos indeseados articulados a la atención segura del paciente

Elkin Hernán Otálvaro Cifuentes

Médico. Director de dispositivos médicos y otras tecnologías del INVIMA. Bogotá.

El Decreto 3770 de 2004, “Por el cual se reglamentan el régimen de registros sanitarios y la vigilancia sanitaria de los reactivos de diagnóstico in vitro para exámenes para especímenes de origen humano”, en su artículo 34, estableció:

“Programa de reactivo-vigilancia. El Invima. diseñará un programa de Reactivo-Vigilancia que le permita identificar los efectos indeseados no descritos o desconocidos, cuantificar el riesgo, efectuar medidas sanitarias, proponer medidas de salud pública para reducir la incidencia y mantener informados a los profesionales de la salud, autoridades sanitarias y la población en general”

Es así que en noviembre de 2013, la Dirección de Medicamentos y Tecnologías en Salud, del Ministerio de Salud y Protección Social, mediante radicado 201324001518251 de fecha de 07 de noviembre de 2013, otorgó al Invima el aval para la implementación del Programa Nacional de Reactivovigilancia en Colombia. Por lo cual el 26 de Diciembre de 2013, el Invima expide la Resolución 2013038979 “Por la cual se implementa el Programa Nacional de Reactivovigilancia”.

El Programa Nacional de Reactivovigilancia, constituye el mecanismo de vigilancia Post-comercialización de los Reactivos de Diagnóstico in vitro y tiene como propósito gestionar y evaluar sanitariamente los efectos indeseados (eventos adversos e incidentes), asociados al uso de los reactivos de diagnóstico, con el fin de tomar las medidas que conduzcan a mejorar la seguridad de los pacientes, los usuarios y todo aquel que directa o indirectamente este asociado con el uso de los reactivos, desde una prueba de embarazo casera, la cual puede ser adquirida en una droguería, hasta pruebas de alta tecnología usadas para diagnóstico de enfermedades infectocontagiosas, de interés en salud pública, de diagnóstico molecular entre otras.

En la actualidad, el programa se posiciona como el único a nivel de las Américas para la vigilancia de los reactivos de diagnóstico, convirtiéndose en una de las nuevas tendencias de la Vigilancia Epidemiológica del Siglo XXI y en modelo para otras Agencias Sanitarias homologas de las Américas.

El programa se ha implementado a nivel nacional a través de cuatro líneas de gestión que se describen a continuación:

Red Nacional de Reactivovigilancia: Está conformada por todos los actores, a cabeza del Invima, la inscripción se realiza on-line o a través del diligenciamiento y envío del formulario.

Promoción y Formación a los Actores del Programa: Se realiza a través de capacitaciones que van dirigidas a IPS, importadores, laboratorios y prestadores independientes, así mismo se realizan asistencias técnicas que van dirigidas a las Secretarías de Salud Departamentales y Distritales, esto de acuerdo a cronogramas semestrales, con lo que se busca dar a conocer el programa y su posterior implementación en cada uno de los actores del programa. En la actualidad se está utilizando como herramienta de formación, la metodología e-learning mediante la plataforma virtual Invima.

Monitoreo, Evaluación y Publicación de Alertas y Recall: El monitoreo implica la revisión diaria de las páginas web de las agencias sanitarias de países de referencia, como son FDA (Estados Unidos), Agencia española de medicamentos y productos sanitarios, TGA (Australia), Health Canadá (Canadá), ANMS (Francia), ANVISA (Brasil) y ECRI (Emergency Research Care Institute), con el fin de encontrar información relacionada con diferentes tipos de situaciones de riesgo (alertas, informes de seguridad y recogida de producto o recall) para los reactivos de diagnóstico In vitro que han sido importados en Colombia. Los sistemas de vigilancia en dichos países cuentan con tal robustez y sensibilidad, que permiten inferir situaciones de riesgo similares en Colombia, esto teniendo en cuenta que nuestro país es netamente importador de reactivos de diagnóstico in vitro.

Gestión de Efectos Indeseados: Los efectos indeseados son acontecimientos relacionados con la atención recibida por un paciente que tiene o puede tener consecuencias negativas, derivadas del uso de un reactivo de diagnóstico in vitro, esto se clasifican en evento adverso (inmediato) e incidente (reporte trimestral). El evento adverso debe ser notificado al Invima, máximo 5 días posteriores a la ocurrencia del evento y los incidentes deben ser reportados a las Secretarías de Salud de cada departamento o distrito.

Los eventos adversos son gestionados por el Invima, con el fin de abordar a los importadores de los productos involucrados en cada caso y determinar si estos han tomado las acciones necesarias para subsanar las causas que dieron lugar al evento y evitar que el mismo vuelva a materializarse.

De la misma forma los incidentes son consolidados por el Ente Territorial, quien los envía al Invima y desde allí se gestionan con el fin de determinar las causas que dieron lugar al reporte y evaluar su comportamiento, identificando aquellos que afectan la seguridad del paciente y que están relacionados con fallas de calidad, de desempeño o del proceso asistencial, con el fin de tomar las acciones correctivas frente al caso.

A corte del 31 de julio de 2016, se cuenta con el registro y gestión de 373 efectos indeseados, de los cuales el 93% (346) corresponde a incidentes y el 7% (27) a eventos adversos, de los mismos el 51% (190) de los casos están cerrados, el 31% (114) se encuentran en seguimiento y el 18% (69) se encuentran abiertos. Frente a los estados la descripción se indica a continuación:

- Abierto: Cuando se recibe el reporte inicial del efecto indeseado por parte del reportante primario (IPS, fabricante, importador, usuario, entre otros) como parte de una investigación preliminar, y se procede a generar la primera acción o requerimiento por el profesional asignado al caso.
- Seguimiento: En atención al reporte se reciben los resultados de la investigación realizada por los actores implicados. Estado transitorio.
- Cerrado: De acuerdo con la documentación allegada se determina si respecto al análisis y plan de acción implementado por los actores implicados se minimiza el riesgo en la utilización del reactivo de diagnóstico *in vitro*, y se puede dar cierre satisfactorio al reporte.

Ahora bien, Colombia ha impulsado la Política de Seguridad del Paciente, articulada con el Sistema Obligatorio de Garantía de Calidad de la Atención en Salud, la cual busca prevenir la ocurrencia de situaciones que afecten la seguridad del paciente, reducir y de ser posible eliminar la ocurrencia de eventos adversos para contar con instituciones seguras y competitivas internacionalmente.

En este sentido, los programas de vigilancia postcomercialización constituyen un mecanismo de identificación de efectos indeseados, que articulados a los programas de seguridad del paciente, permiten el desarrollo de prácticas seguras en cada una de las Instituciones prestadoras de servicios de salud, así como en los prestadores independientes, esto debido a que la gestión de efectos indeseados demanda la identificación de los riesgos asociados en cada una de las etapas del ciclo de vida de los reactivos, lo que permite ante cada riesgo identificado y evaluado la creación de medidas preventivas que favorezcan los procesos de seguridad que impactan en la atención del paciente.

Es así, que el Programa de Reactivovigilancia, promueve el desarrollo institucional de acciones seguras relacionadas con los reactivos de diagnóstico *in vitro*, mediante la implementación y adopción de sistemas de gestión de riesgo clínico, como el Análisis modal de Falla y Efecto – AMFE, el cual en el marco de una vigilancia proactiva, busca la identificación y análisis de los riesgos potenciales derivados de los procesos desarrollados en la Institución, con el fin de elegir e implementar medidas para el manejo y control de los mismos, así mismo, esta metodología permite el análisis reactivo, en aquellos casos en que el riesgo se materializo a través de un incidente o un evento adverso.

INMUNOLOGÍA Y HORMONAS

Nuevos marcadores en Artritis Reumatoide: MMP-3

Claudia Marcela Tafur Amaya

Bacterióloga, experta en Microbiología e Inmunofluorescencia. Gerente regional Latinoamérica Aesku Diagnostics, Wendelsheim Alemania.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica caracterizada por la inflamación de las articulaciones y la destrucción de estas, lo que lleva a discapacidad grave y a una mortalidad prematura.

Además de las limitaciones personales de cada paciente, la AR está generando altos costos para el sistema de salud en el diagnóstico, los fármacos antirreumáticos, las imágenes diagnósticas de seguimiento, terapias físicas, terapia psicológica, incapacidades, etc., afectando también la economía del país por la pérdida de capacidad de trabajo de los pacientes.

La AR una enfermedad autoinmune dada la presencia de autoanticuerpos, como factor reumatoide (RF) y anti-proteína citrulinada (ACPA).

El diagnóstico precoz, el pronóstico de la actividad de la enfermedad y el control de la progresión son fundamentales para asegurar la calidad de vida del paciente.

El objetivo del tratamiento es reducir la inflamación sinovial para evitar la destrucción de las articulaciones. Las principales estrategias terapéuticas en el manejo de la AR son la introducción de los fármacos anti-reumáticos y un control estricto de la actividad de la enfermedad y éxito de la terapia. Mientras algunos pacientes con AR pueden remitir con la terapia reumática básica, otros pueden necesitar un tratamiento más agresivo. Para mejorar la toma de decisiones de la terapia adecuada, se necesitan marcadores específicos que reflejan la actividad de la inflamación y la enfermedad y que puedan proporcionar información pronóstica adicional a largo plazo para los pacientes con AR. Además, estos marcadores también deben aplicarse como un medio de control del éxito terapéutico. Sin lugar a dudas, el tratamiento adecuado de los pacientes es ideal, en una etapa en la que la evolución del daño articular todavía pueda prevenirse.

La Metaloproteinasa de matriz 3 (MMP-3) pertenece a la familia de las metaloproteinasas, la cual se subdivide en subgrupos en función de su especificidad por el sustrato:

- Estromelisin (MMP-3, -10, -11), colagenasas (MMP-1, -8, -13), gelatinasas (MMP-2,-9) y MMP de tipo membrana (MMP-14, -17, -22, -24, -25).

La Metaloproteinasa de matriz 3 (MMP-3) juega un papel importante en la destrucción del cartílago y el hueso. Debido a su amplia especificidad de sustrato, MMP-3 es capaz de degradar los componentes de la matriz del tejido conectivo (proteoglicanos del cartílago, fibronectina, colágeno tipo IV, laminina, colágeno tipo IX, telopéptidos de tipo II y colágeno tipo XI), además de participar en la activación de otras enzimas destructivas como procolagenasa (proMMP-1) y progelatinasa B. Su expresión se aumenta considerablemente en la artritis reumatoide, incluso en la fase temprana de la enfermedad.

MMP-3 es secretada por los fibroblastos, las células sinoviales y los condroblastos. Los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) también son producidos por células del tejido conectivo. Esta balanza de TIMP y MMP es importante para el recambio de la matriz extracelular. Las MMP también son capturadas fácilmente por la Alfa2 macroglobulina, un inhibidor natural de la proteasa, estos complejos de MMP / Alfa2 macroglobulina se han visto aumentados en los pacientes con AR, lo que sugiere que los niveles de estos complejos representan el desequilibrio MMP / TIMP en la AR.

Los niveles de MMP-3 en suero de pacientes con AR también están fuertemente elevados incluso en la fase temprana de la AR por lo cual MMP-3 es un marcador serológico que puede identificar a los pacientes con un riesgo alto e inminente de desarrollar erosiones de hueso.

Los niveles séricos de MMP-3 se correlacionan con los niveles de MMP-3 producidos por la membrana sinovial, lo que refleja la actividad de la enfermedad y permite hacer un pronóstico de la progresión. Los niveles de MMP-3 bajan como consecuencia de la terapia eficiente y por lo tanto, también son un excelente marcador para evaluar el éxito de la terapia.

Debido a su valor informativo multifacético, MMP-3 ayuda a los médicos para crear y adaptar una terapia individualizada con medicamentos para cada paciente.

La determinación de MMP-3 puede ser realizada de manera sencilla y estandarizada por el laboratorio clínico.

En conclusión:

MMP-3 es un buen indicador para evaluar la progresión del daño articular incluso en la fase temprana de la enfermedad.

MMP-3 puede tener un valor particular en la predicción de la progresión de la enfermedad erosiva.

MMP-3 refleja la actividad inflamatoria en las articulaciones de pacientes con AR. La elevación de los niveles de MMP-3 representa la actividad de la enfermedad de los pacientes con AR, independientemente de la edad o la duración de la enfermedad.

MMP-3 es un marcador específico y útil para monitorizar el éxito de la terapia elegida al reducir los niveles en sangre de los pacientes frente a la mejoría clínica.

Ayuda a la identificación de los pacientes que se benefician de la terapia con medicamentos agresivos y así reducir el tiempo de espera en que los pacientes pueden recibir el tratamiento adecuado.

Con MMP-3 se puede realizar el monitoreo de la actividad de la enfermedad de forma rápida, sensible y más económica en comparación con la evaluación de la clínica mediante el uso de las puntuaciones de actividad como DAS, DAS28, SDAI o CDAI.

MMP-3 ayuda a reducir los costos del sistema de salud mediante la optimización de la terapia de la AR:

- Los Pacientes reciben medicamentos que se ajustan su estado individual de vida.
- Los Pacientes muestran más rápida remisión al utilizar los medicamentos adecuados
- Se ayuda a la reducción de los efectos y manifestaciones secundarios.
- Mantenimiento de la función articular y la capacidad de trabajo, mejorando la calidad de vida de los pacientes.

Referencias

1. Aletaha, D. et al. (2010) 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 62, 2569-2581.
2. Yamanaka, H. et al. (2000) Serum matrix metalloproteinase 3 as a predictor of the degree of joint destruction during the six months after measurement, in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43, 852-858
3. Tchetverikov, I. et al. (2003) Matrix metalloproteinases-3, -8, -9 as markers of disease activity and joint damage progression in early rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 62, 1094-1099.
4. Green, M.J. et al. (2003) Serum MMP-3 and MMP-1 and progression of joint damage in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology. (Oxford)* 42, 83-88.
5. Yoshihara, Y. et al. (1995) Increased levels of stromelysin-1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in sera from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 38, 969-975.
6. Shinozaki, M. et al. (2007) Elevation of serum matrix metalloproteinase-3 as a predictive marker for the long-term disability of rheumatoid arthritis patients in a prospective observational cohort IORRA. *Mod. Rheumatology.* 17, 403-408.
7. Fiedorczyk, M. et al. (2006) Serum matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 33, 1523-1529.

8. Posthumus, M.D. et al. (2002) Serum matrix metalloproteinase 3 levels during treatment with sulfasalazine or combination of methotrexate and sulfasalazine in patients with early rheumatoid arthritis. *J. Rheumatology*. 29, 883-889.
9. Houseman, M. et al. (2012) Baseline serum MMP-3 levels in patients with rheumatoid arthritis are still independently predictive of radiographic progression in a longitudinal observational cohort at 8 years follow up. *Arthritis Research & Therapy* 14: R30.
10. Nishimoto, N. et al. (2014) Drug free remission/low disease activity after cessation of tocilizumab (Actemra) monotherapy (DREAM) study. *Mod Rheumatology* 24 (1); 17-25

Activación y regulación de células B en condiciones normales y patológicas

Sandra Milena Quijano Gómez

Bacterióloga, MSc. PhD. Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

La linfopoyesis B ocurre en la médula ósea y se caracteriza por distintos pasos en la maduración celular que conducen al desarrollo de linfocitos B maduros vírgenes, que están listos para circular en órganos y tejidos periféricos. Para que el proceso de linfopoyesis B ocurra de manera adecuada, las células madre hematopoyéticas en los nichos medulares, entran en contacto con células del microambiente a través de estímulos directos e indirectos, que regulan distintas rutas de señalización en estas células stem y células progenitoras comprometidas en la maduración B, regulan también la activación de un amplio espectro de factores de transcripción y la expresión de genes y proteínas implicadas en la regulación de la diferenciación celular, supervivencia y ciclo celular. De esta manera distintas moléculas como c-Kit, IL-7, CD127, FLT-3 quinasa, PAX-5, CXCL-12-CXCR4, VLA-4-VCAM, IRF4, BAFF y otras implicadas en señalización celular como NFκB, RAS-MAPK, PI3K-AKT, Bcl-2, STATs y TRAFs, participan de forma activa y regulada en cada paso de la diferenciación B.

El desarrollo B ocurre en función de la dependencia o no de la exposición antigénica contemplando dos estadios: i) uno inicial, denominado antígeno-independiente, que ocurre en el hígado fetal y en la médula ósea fetal y adulta, y; ii) un estadio antígeno-dependiente que ocurre en los órganos linfoides secundarios; en estos procesos, gran parte de las células linfoides no logran diferenciarse completamente y mueren por apoptosis. Estudios recientes han establecido con gran precisión la secuencia de expresión de un amplio número de antígenos a lo largo de los distintos estadios madurativos de las células B normales. Así, se reconoce la presencia en MO de cuatro compartimientos madurativos B bien definidos. Estos incluyen de menor a mayor madurez, los precursores B CD34+, los precursores B CD34-, los linfocitos B transicionales slg+/CD10+/CD20+ y los linfocitos B maduros slg+/CD10-/CD20+, cada uno caracterizado por un amplio espectro de proteínas y factores de transcripción implicados en diferenciación celular.

Durante el primer estadio de maduración, los genes de las inmunoglobulinas (Ig) sufren un proceso de reordenamiento V(D)J de los segmentos variables (V), de diversidad (D) y de unión (J), mediante recombinación somática, dando origen a células B inmaduras sIgM+sIgD- con capacidad para migrar hacia el bazo y otros órganos linfoides secundarios. Habitualmente, tanto en MO como en SP, la mayoría (>85%) de los linfocitos B maduros corresponden a células B vírgenes sIgM+/sIgD+ y en menor proporción (<15%) a linfocitos B inmaduros sIgM+; entre estos linfocitos B, las células B de memoria sIgM+, sIgA+ y sIgG+ están generalmente poco representadas (<10%). Los linfocitos B localizados en distintos tejidos reciben estímulos antigénicos que regulan procesos de activación y maduración en periferia. Específicamente en los órganos linfoides secundarios, los linfocitos B en respuesta al antígeno, se activan, expanden, sufren hipermutación somática, maduración de la afinidad por el antígeno, cambio de isotipo de inmunoglobulina y la consecuente diferenciación hacia linfocitos B de memoria o hacia células plasmáticas circulantes.

Los linfocitos B maduros localizados en los distintos tejidos hacia los que migran, juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune, participando de forma positiva en la activación, mantenimiento y proliferación de linfocitos T CD4+, el mantenimiento de células T de memoria Th1 (IL-12) y Th2 (IL-4), proveen señales coestimuladoras (CD80 y CD86) y participan además como células presentadoras de antígeno generadoras de respuesta inmune específica. Por otra parte, estas células también pueden ser supresoras a través de la modulación de la proliferación y supervivencia de linfocitos T reguladores (CD25++/Foxp3+), mediante la producción de IL-10 (células B10) o TGF- β , con efectos negativos en el potencial inflamatorio de células T efectoras y en la actividad de células dendríticas, entre otras funciones.

Distintas alteraciones en los procesos celulares que regulan la activación de los linfocitos B, pueden conducir a activación aberrante y persistente de estos linfocitos, al incremento en la proliferación, a la inducción de alteraciones genéticas como traslocaciones cromosómicas o mutaciones que afectan a genes reguladores del ciclo celular y la apoptosis o dependiendo del estímulo inductor, a cansancio crónico de los linfocitos B. Estas alteraciones pueden estar asociadas con la evolución o transformación de los linfocitos B en células tumorales de pacientes con linfomas y en especial si existen condiciones clínicas de riesgo que favorecen la evolución a linfomas, como la inmunosupresión o las inmunodeficiencias primarias o secundarias.

Dentro de los eventos moleculares y celulares que participan en la activación y proliferación aberrante de linfocitos B, se encuentran agentes infecciosos con capacidad oncogénica como el Virus de Epstein Barr y el Herpes virus tipo 8 o el virus de inmunodeficiencia humana que tiene la capacidad mediante mecanismos directos e indirectos de activar de forma aberrante a los linfocitos B maduros e inmaduros. Estos eventos en conjunto con otros procesos celulares que conducen

a la generación de mutaciones o alteraciones genéticas pueden inducir la transformación maligna de los linfocitos B en células tumorales de linfoma.

Desde el punto de vista molecular e inmunofenotípico, las células neoplásicas de pacientes con distintos tipos de linfomas B, reflejan las características de células B normales de distintos tejidos linfoides, bloqueadas en estadios madurativos concretos; pero a su vez se estudios recientes muestran que las células tumorales de linfoma pueden diferenciarse de los linfocitos B de los cuales se derivan, en la expresión alterada de antígenos asociados a distintos estadios madurativos B como consecuencia de las alteraciones genéticas subyacentes o de anomalías en la comunicación entre la célula expandida y su microambiente. Estas alteraciones en conjunto favorecen la activación constitutiva de estos linfocitos B, a su proliferación desordenada y al aumento de su supervivencia.

En la actualidad, el mejor conocimiento de la biología de los linfomas B y del papel del microambiente en la regulación de estas células, ha favorecido el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de diversos tipos de linfomas B atacando puntos clave de la señalización celular de estos linfocitos B como consecuencia de la activación aberrante constitutiva.

Referencias

1. Cader FZ, Kearns P, Young L, Murray P, Vockerodt M. The contribution of the Epstein-Barr virus to the pathogenesis of childhood lymphomas. *Cancer treatment reviews* 2010; 36:348-53.
2. Carbone A, Cesarman E, Spina M, Gloghini A and Schulz T. HIV-associated lymphomas and gamma-herpesviruses. *Blood* 2009; 113: 1213-24.
3. Castillo JJ, Beltran BE, Miranda RN, Paydas S, Winer ES, Butera JN. Epstein-Barr Virus Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma of the Elderly: What We Know So Far. *Oncologist* 2011; 16: 87-96.
4. Clark MR, Mandal M, Ochiai K, Singh H. Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*. 2014; 14(2):69-80.
5. Küppers, R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nature Reviews Cancer* 2005; 5: 251-62.
6. Gloghini A, Dolcetti R, Carbone A. Lymphomas occurring specifically in HIV-infected patients: From pathogenesis to pathology. *Seminars in Cancer Biology* 2013; 23P:457– 467.
7. LeBien TW, Tedder TFB. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008; 112: 1570-80.
8. Moir S and Fauci A. B cells in HIV infection and disease. *Nature Reviews Immunology* 2009; 9, 235-45.
9. Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, Caraux A, Schmitz A, Almeida J et al. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010; 78 Suppl 1:S47-60.
10. Quijano S, López A, Rasillo A, Barrera S, Sánchez ML, Flores J, Fernández C et al. Association between the proliferative rate of neoplastic B-cells, their maturation stage and underlying cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphoproliferative disorders: analysis of a series of 432 patients. *Blood* 2008; 111:5130-41.

Regulación de la respuesta inmune en cáncer mediada por fitomedicamentos

Susana Fiorentino*, Alejandra Gomez-Cadena*, Amaia Martinez-Usatorre**,
Claudia Urueña*, Alena Donda**, Alfonso Barreto*, Pedro Romero**

*Grupo de Inmunobiología y Biología Celular, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá – Colombia.

** Ludwig Cancer Research Center, University of Lausanne, Lausanne – Switzerland

Los polifenoles, son compuestos de plantas de origen natural que participan en múltiples actividades biológicas como anti oxidantes, anti angiogénicos y pro-apoptóticos y son considerados por estas razones como antitumorales. En nuestro grupo hemos obtenido una fracción rica en polifenoles a partir de la planta *Caesalpinia spinosa*, la cual está normalizada químicamente y a la que hemos denominado P2Et. El P2Et, ejerce actividad citotóxica sobre varias líneas de células tumorales tanto humanas como murinas, a través de mecanismos que implican la inducción de apoptosis con despolarización de la mitocondria, activación de caspasa 3 y 9, expresión de fosfatidilserina, y fragmentación del ADN. Adicionalmente, el P2Et favorece la inducción de muerte inmunogénica que se caracteriza por la liberación de ATP, relocalización de la proteína HMGB1 del núcleo al citoplasma para luego ser liberada y exposición de calreticulina en la membrana plasmática lo que permite la activación de las células dendríticas y la captura y subsecuente presentación de antígenos tumorales a los linfocitos T CD8 por un mecanismo denominado “presentación cruzada. Hemos evidenciado la activación de la respuesta inmune in vivo en modelos de ratones trasplantados con células tumorales de cáncer de seno (4T1) o melanoma (B16) y tratados con el P2Et, la cual se confirma en experimentos recientes utilizando ratones inmunodeficientes KO para la recombinasa RAG y además la cadena gamma del receptor de las citocinas, en quienes la terapia con P2Et no es efectiva; lo que demuestra que la actividad antitumoral de este extracto es parcialmente dependiente de la presencia de una respuesta inmune efectiva.

Los tumores emplean múltiples estrategias para atenuar la efectividad del ataque de la inmunidad mediada por células, desde la desregulación de las células presentadoras de antígeno, hasta el reclutamiento y activación de células inmunosupresoras tales como células mieloides supresoras, monocitos tolerogénicos y linfocitos T reguladores. El ligando PDL-1 (Programmed death ligand 1) es el mayor ligando regulador negativo de la familia B7, el cual se une al receptor PD-1 (molécula de muerte programada) que es expresado sobre los linfocitos T activados y que transduce una señal que inhibe la proliferación de los linfocitos T, la producción de citocinas y la función citolítica. PD-L1 se expresa sobre las células tumorales, pero también sobre las células dendríticas mieloides asociadas al tumor, y el bloqueo de la interacción PD1-PDL-1 ha mostrado ser efectivo en el tratamiento de tumores como el melanoma. La Inmunoterapia combinada, utilizando bloqueadores de los puntos de chequeo ha mostrado ser muy eficiente siempre y cuando exista una respuesta inmune previa a la terapia.

Teniendo en cuenta que el P2Et induce una respuesta inmune específica del tumor, decidimos estudiar si el tratamiento con P2Et in vivo, en conjunto con anticuerpos anti PDL1 podrían tener un efecto potenciador. En este trabajo se muestra que la terapia combinada disminuye en forma significativa la aparición del tumor comparada con la terapia independiente de P2Et o anti PDL-1. Por otra parte, aun cuando los tumores trasplantables han sido utilizados en forma extensa para caracterizar la respuesta anti-tumoral, estos modelos no mimetizan el proceso de ruptura de tolerancia contra antígenos propios, de la misma forma que lo hacen los modelos de tumor espontáneo. Con el fin de medir entonces si el P2Et podría ser también efectivo en los tumores espontáneos, como se muestra en el tumor trasplantable de B16, nosotros utilizamos los ratones transgénicos Tyr:Nras que desarrollan tumores de melanoma 9 semanas después del tratamiento con el carcinógeno 7,12dimethyl benz (a) anthracene (DMBA). Nuestros resultados muestran que el tratamiento con P2Et tan pronto el tumor comienza a desarrollarse, también muestra un retardo importante en el desarrollo del tumor. El conjunto de estos experimentos sugiere que el tratamiento con P2Et induce muerte inmunogénica, posiblemente rompiendo la tolerancia contra los antígenos propios, e induciendo una respuesta inmune que retarda el crecimiento del tumor y que puede aumentar la eficacia de las terapias que bloquean los puntos de control como la terapia aprobada en clínica con anti PDL-1.

Abordaje desde el laboratorio de la función tiroidea

Dennise Ríos Rincón

Médica cirujana, Patóloga Clínica. Cali.

Dentro de las enfermedades del eje endocrino, las de la tiroides están entre las más frecuentes en niños y adultos y las pruebas de función tiroidea entre los exámenes más solicitados en el laboratorio clínico.

Un resultado alterado en una de estas pruebas puede ayudar a diagnosticar un trastorno tiroideo primario o secundario. Sin embargo, las pruebas de función tiroidea sólo deben ser solicitadas cuando hay características clínicas específicas que requieren que se descarte un desorden primario de la función hipotalámica, pituitaria o tiroidea, pues el análisis de la concentración de Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH) o de las hormonas tiroideas T3 y T4 cuando hay una baja sospecha clínica conlleva el riesgo de obtener resultados que conduzcan a iniciar investigaciones inapropiadas y tratamientos innecesarios.

Esto se debe a que una interpretación adecuada los resultados requiere, además de un entendimiento completo de la fisiología tiroidea, el conocimiento de los factores intra y extraendocrinos que modifican la determinación de estas magnitudes.

FISIOLOGÍA TIROIDEA

La producción de hormonas tiroideas es estrechamente regulada por la hormona liberadora de tirotropina (TRH) secretada por el hipotálamo y la TSH secretada por la pituitaria.

El iodo inorgánico es organificado por la enzima tiroidea peroxidasa (TPO) e incorporada en la Tiroglobulina (Tg), una gran glicoproteína sintetizada por la célula del folículo tiroideo. El acoplamiento subsecuente de los residuos de mono y diiodotironina con la molécula de Tg, conduce a la formación de las hormonas tiroideas T3 y T4, que son almacenadas en el coloide folicular, un material proteináceo que está contenido dentro de la luz del folículo tiroideo. Bajo el efecto de la TSH se produce la reabsorción del coloide por la célula folicular y la degradación enzimática del mismo por las enzimas lisosomales liberando el T3 y T4 a la circulación.

Sólo el 20% del T3 total en la circulación es secretado por la glándula tiroidea. El restante 80% se deriva de la conversión del T4 en los tejidos periféricos. La mayoría de la hormona tiroidea circulante está unida a proteínas transportadoras: Globulina transportadora de tiroideas (TBG), pre albúmina fijadora de tiroxina (transtirenina) y albúmina. Las hormonas ligadas están en equilibrio con su forma libre y en un estado eutiroideo el T4 libre (T4L) constituye menos del 0,02% del total de T4 y el T3 libre (T3L) menos del 0,5% del T3.

CONSIDERACIONES PARA UNA APROPIADA INTERPRETACIÓN DE LAS PRUEBAS DE FUNCIÓN TIROIDEA

Aunque la enfermedad tiroidea en su forma más florida es fácilmente reconocida, las alteraciones menores del estado tiroideo pueden ser más difícil de diagnosticar. En la mayoría de los casos los resultados de las pruebas de función tiroidea son orientadores y presentan un patrón que es fácilmente reconocido y consistente con la enfermedad tiroidea. Sin embargo, en un pequeño pero significativo subgrupo de pacientes, la interpretación de estas pruebas resulta más retadora, con escenarios bioquímicos que podrían parecer discordantes con el cuadro clínico.

Los cambios en el estado tiroideo normalmente están asociados con cambios concordantes en las hormonas tiroideas y la TSH: elevación en la T4 y T3 con TSH suprimida en tirototoxicosis y T4 y T3 bajos con elevación en la TSH en hipotiroidismo. Sin embargo, en un individuo determinado las concentraciones sanguíneas de T3 y T4 se mantienen relativamente constantes a lo largo de toda la vida, reflejando una especie de «set-point» del eje hipotalámico-pituitaria-tiroideo (HPT), por lo que los rangos de referencia poblacionales para las hormonas tiroideas son relativamente amplios en contraste con las variaciones individuales en los niveles séricos vistos

en los sujetos normales. Como resultado, los cambios en las concentraciones de hormona tiroidea suficientes para generar síntomas de hipo e hipertiroidismo pueden no estar asociados con anomalías numéricas en las concentraciones de T4 o T3, tal como ocurre en el llamado hipotiroidismo subclínico.

Adicionalmente existen condiciones que interfieren en los resultados de las pruebas de función tiroidea las cuales se describirán brevemente.

Enfermedad no tiroidea: la alteración en las pruebas de función tiroidea es relativamente común en el contexto de cualquier enfermedad aguda o crónica, presentándose el llamado síndrome del eutiroideo enfermo, el cual está definido por la alteración de las pruebas en ausencia de una anomalía intrínseca del eje HPT y sin evidencia actual que favorezca el uso de T3 o T4 en la mayoría de pacientes con este síndrome. Los cambios en las hormonas tiroideas y la TSH pueden verse tan rápido como 24 horas después del inicio de la enfermedad no tiroidea y han sido observados en sujetos con desnutrición, sepsis, quemaduras, enfermedad neoplásica, infarto al miocardio, postquirúrgicos y con enfermedad renal o hepática crónica. Las anomalías en las pruebas tiroideas por lo general se resuelven durante la convalecencia, aunque en algunos pacientes la TSH puede permanecer elevada por un corto periodo de tiempo.

Terapia con medicamentos: varios medicamentos prescritos comúnmente pueden resultar en una un estado tiroideo alterado, sea porque modulan el eje HPT por sí mismos o a través de efectos posteriores en el transporte la hormona tiroidea o su metabolismo. Dentro de estos se cuentan el yodo, la amiodarona, el litio, moduladores inmunes, agonistas de la dopamina, glucocorticoides, y metformina. Otros interfieren las concentraciones de la TBG lo cual típicamente resulta en cambios de las concentraciones totales de las hormonas tiroideas, pero no en las libres, aunque pueden observarse elevaciones transitorias en la FT3 y FT4. Estos medicamentos incluyen estrógenos orales, tamoxifeno, metadona y heroína. En contraste, los andrógenos y la terapia crónica con glucocorticoides han mostrado inhibir la síntesis de la TBG. Otro mecanismo es el desplazamiento de la T4 y T3 de las proteínas de unión de la hormona tiroidea alterando la liberación de la hormona y su depuración y distorsionando las pruebas diagnósticas para T4L y T3L, estas incluyen furosemida, aspirina, antiinflamatorios no esteroideos, fenitoína y heparina.

Interferencias analíticas: la presencia de anticuerpos humanos anti-animal en el suero del paciente, si están dirigidos hacia la misma especie empleada la producción de los anticuerpos del ensayo, puede interferir con la determinación del TSH. Así, los anticuerpos anti-animal capaces de producir una reacción cruzada con los anticuerpos de captura y detección pueden causar una interferencia positiva, conduciendo a un TSH falsamente elevado y a la inversa, unos anticuerpos anti-animal que bloqueen la unión de la TSH al anticuerpo de captura y detección

resultará en una interferencia negativa causando una lectura de TSH falsamente baja.

ENFERMEDADES AUTOINMUNES DE LA TIROIDES

Las enfermedades tiroideas autoinmunes son los desórdenes más frecuentes que causan disfunción de la glándula tiroidea e incluyen varias formas clínicas, entre ellas la tiroiditis de Hashimoto (TH) y la enfermedad de Graves (EG). Estas dos formas mayores de autoinmunidad tiroidea se caracterizan clínicamente por hipertiroidismo (EG) e hipotiroidismo (TH).

La enfermedad autoinmune tiroidea es multifactorial e implica el desarrollo de inmunidad contra autoantígenos tiroideos en un trasfondo genético particular, facilitado por la exposición a factores ambientales incluyendo la infección, la dieta, ingestión de yodo y el tabaquismo. Si bien, en su inicio la respuesta autoinmune en la EG y la TH puede ser similar y ambas enfermedades están caracterizadas por la infiltración linfocitaria de la tiroides y la producción de autoanticuerpos tiroideos, diferencias en el microambiente local son cruciales para el desarrollo de una u otra patología.

MARCADORES DE AUTOINMUNIDAD TIROIDEA

Los autoantígenos en la enfermedad de Hashimoto son la peroxidasa tiroidea (TPO) y la Tiroglobulina (Tg), presentes en más del 90% de estos pacientes. Sin embargo, no son patognomónicos de la TH, pues también ocurren en más del 70% de pacientes con enfermedad de Graves.

Similarmente, mientras que el receptor de la hormona estimulante el tiroides (TSH) es el mayor autoantígeno en la enfermedad de Graves, estos anticuerpos también ocurren en algunos pacientes con enfermedad de Hashimoto.

Los anticuerpos anti-receptor de la TSH (TRAb) son actualmente clasificados en estimulantes, bloqueadores, y neutrales sobre la base de su habilidad para unirse con diferentes tipos de epítopes, de la cual deriva la diversidad de su actividad biológica. Los TRAb estimulantes causan el hipertiroidismo la enfermedad de Graves y aunque los TRAb bloqueadores son encontrados en algunos pacientes con tiroiditis de Hashimoto su papel es incierto.

La agudeza diagnóstica de los TRAb ha aumentado con el desarrollo de nuevos ensayos. Los métodos automatizados de tercera generación tienen una alta sensibilidad para detectar enfermedad de Graves y una alta especificidad para discriminarla de otras enfermedades de la tiroides. Dentro de esta familia de ensayos, las inmunoglobulinas estimulantes del tiroides (TSI), auto anticuerpos que se unen al receptor de la hormona estimulante tiroides sobre la célula tiroidea

resultando en enfermedad de Graves, están ganando aceptación como método diagnóstico en la literatura médica más reciente.

CONCLUSIÓN

Si bien la disponibilidad de nuevas pruebas es un soporte valioso en el diagnóstico diferencial de los trastornos de la función tiroidea, para una adecuada evaluación del eje tiroideo desde el laboratorio clínico siguen siendo indispensables un buen ejercicio clínico y un conocimiento detallado de la fisiología tiroidea, el desempeño diagnóstico de cada prueba y los factores, endocrinos o no, que interfieren en sus resultados.

BIOQUÍMICA APLICADA

Importancia clínica de la Hiperhomocisteinemia

Shirley Cruz Rubio

Bacterióloga y Laboratorista Clínica, Especialista en Hematología en el laboratorio Clínico y manejo de Bancos de sangre, Magíster en Educación. Docente Titular Universidad de Boyacá.

Generalidades

La homocisteína fue descrita por primera vez en 1932 por Lewis W. Butz y Vincent Du Vigneaud, Es un aminoácido azufrado no constituyente de la dieta, desempeña un papel importante en la transferencia de grupos metilos en el metabolismo celular y es originada en los humano a partir de la desmetilación de la metionina por acción de la enzima metionina adenosil transferasa, o por mecanismos de remetilación por medio de la catálisis de la enzima homocisteínametiltransferasa. La homocisteína también se puede combinarse con la serina para generar cistationina por reacciones de transulfuración y por acción enzimática de la cistationina β -sintetasa y su coenzima el fosfato de piridoxal. El gen que codifica se encuentra en el brazo largo del cromosoma 21. (1)

En la dieta, la metionina se encuentra principalmente en carnes y pescado y en menor proporción en verduras, nueces, frutas y cereales.

La homocisteína en el plasma se encuentra en forma reducida aproximadamente en 1%; el 70% se encuentra unida a albúmina y el resto se encuentra formando compuestos disulfuro de peso molecular bajo.

El rango de variabilidad biológica se encuentra entre: 5 - 15 $\mu\text{mol/l}$, es de tener en cuenta que aspectos como el método analítico, el sexo, la edad e incluso características poblacionales producen variaciones en la determinación; se

considera hiperhomocisteinemia: Moderada: 15 – 30 $\mu\text{mol/l}$, Intermedia: 30 – 100 $\mu\text{mol/l}$ y Severa: > 100 $\mu\text{mol/l}$.

Etiología de la hiperhomocisteinemia

Se hereda en forma autosómica recesiva, involucra siete trastornos bioquímicos clínicamente diferentes, siendo los más frecuentes el déficit de cistatioina β -sintetasa y de la metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Varios estudios han demostrado la asociación entre los portadores T/T del polimorfismo c.677 de la MTHFR y la hiperhomocisteinemia, se presenta en aproximadamente 1 de cada 334000 nacidos vivos en todo el mundo. (2)

La hiperhomocisteinemia puede producirse por una deficiencia enzimática en alguno de los pasos del metabolismo, por presentar bajos niveles plasmáticos de ácido fólico vitaminas B6 y/o B12.

Factores de riesgo

Se consideran como principales factores de riesgo para el desarrollo de la hiperhomocisteinemia: edad, sexo, disminución en la concentración sérica de B6 y B12, el sedentarismo, consumo de alcohol y tabaquismo. Entre las principales causas asociadas se encuentra:

1. Deficiencia vitamínica: La vitamina B12 es un cofactor esencial para la metionina sintetasa en el proceso de remetilación de la homocisteína a metionina, mientras que el ácido fólico, bajo la forma de 5 metil tetrahidrofolato (THF), en actúa como donador de grupos metilos para la conversión de homocisteína a metionina, por tanto, las deficiencias de ambos nutrientes inciden en el incremento de los niveles de homocisteína en sangre. Aproximadamente en dos tercios de los pacientes que presentan elevación de los niveles de homocisteína existe asociación con bajas concentraciones de vitaminas, como el ácido fólico y la vitamina B12. (3) (4)
2. Enfermedad aterotrombótica e insuficiencia renal: Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte a nivel mundial, la hiperhomocisteinemia permite que los vasos sanguíneos absorban más fácilmente el colesterol de baja densidad (LDL) por parte de los macrófagos. Adicionalmente es considerada un factor de riesgo trombofílico moderado para la producción de tromboembolismo venoso. La insuficiencia renal es considerada como otra causa de hiperhomocisteinemia, debido a que esta es eliminada por la ruta renal. (5)
3. Pre eclampsia: Las concentraciones plasmáticas de homocisteína están elevadas significativamente en gestantes con preeclampsia en comparación con gestantes sanas durante el tercer trimestre de gestación. (6)
4. Deterioro cognitivo: La homocisteína junto con la proteína β -amiloide activan la apoptosis en neuronas corticales al incrementar los niveles citoplasmáticos de Ca^{++} y activar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

como son los iones de oxígeno, los radicales libres y los peróxidos que producen daño significativo a diversas estructuras celulares debido al estrés oxidativo mediado por el flujo de Ca^{++} . Lo anterior asociada a una irreversible neurodegeneración mediante mecanismos de excitotoxicidad, daño del ADN, modificación oxidativa de las bases nitrogenadas y fallas en las capacidades reparativas conduciendo así a la muerte celular. La presencia de hiperhomocisteinemia se asocia entre otros con la enfermedad de Alzheimer y otras formas de demencia (vascular), depresión en ancianos, enfermedad de Parkinson y Epilepsia. En 1962, Gerritsen y Carson demostraron la presencia de homocisteína en la orina de niños con retardo mental. Respecto a las causas que llevan al aumento de la homocisteína en los pacientes epilépticos en tratamiento crónico con FAE, no están del todo establecidas. Se ha postulado que se debe a alteraciones en los niveles de ácido fólico y vitamina B12, ambos constituyentes esenciales del metabolismo de la homocisteína. (7)

Los posibles mecanismos de daño endotelial se relacionan directamente por: producir peróxidos, alterar la adhesividad plaquetaria, activa los factores XII y V de la coagulación, inhibir la trombosmodulina, disminución en la producción de óxido nítrico y disminución de la proteína S de la coagulación

Conclusiones

Diversos estudios resaltan la importancia de la determinación de la homocisteína en la evaluación clínica de pacientes con factores de riesgo para enfermedad aterotrombótica, deficiencia vitamínica, pre eclampsia y deterioro cognitivo.

Referencias

1. Aguirre E Ciriaco, Egurbide A, M. Martínez Victoria B Agustín. Homocisteína en la clínica humana [citado 2016 Ago 25]; Med Clin (Barc). 2009;133(12):472–478 Disponible en: www.elsevier.es/medicinaclinica
2. Castaño L. Bioquímica Clínica. Ergón, Madrid, 2008
3. Aguirre E Ciriaco, Egurbide A, M. Martínez Victoria B Agustín. Homocisteína en la clínica humana [citado 2016 Ago 25]; Med Clin (Barc). 2009;133(12):472–478 Disponible en: www.elsevier.es/medicinaclinica
4. Oltean Sebastian, Banerjee Ruma. Nutritional Modulation of Gene Expression and Homocysteine Utilization by Vitamin B12. The Journal of Biological Chemistry
5. Ruiz P. La homocisteína y la enfermedad Cardio vascular. Perspectivas en nutrición humana. [Internet]. 2006 [citado 2016 Ago 25] ; Número 16 Disponible en: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/nutricion/article/view/17868>
6. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304501303758841>
7. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213485316001225>

Bioquímica aplicada al diagnóstico de la diabetes mellitus

John E. Feliciano-Alfonso

Médico, MSc en Epidemiología Clínica, Especialista en Estadística, Especialización Médica en Farmacología Clínica, Grupo de Investigación Evidencia Terapéutica Universidad de La Sabana. Bogotá.

El metabolismo de los carbohidratos es regulado por finos mecanismos que permiten mantener concentraciones no relacionadas con las complicaciones propias de la diabetes mellitus. Factores como la obesidad favorecen procesos que involucran el desarrollo de resistencia a la insulina y una disfunción en la secreción de insulina por parte de la célula beta pancreática. Esto genera una serie de acontecimientos que alteran la gluconeogénesis y la glucogenolisis, así como también el propio metabolismo de lípidos y de proteínas.

Es en este momento en que suelen manifestarse condiciones como la alteración de la glucemia en ayuno (al no poder controlar la producción hepática de glucosa) o la intolerancia a los hidratos de carbono (al producirse la pérdida del primer pico secretorio de la insulina). No detectar al individuo en estas primeras etapas de la enfermedad, resultará en la aparición de la forma más frecuente de diabetes mellitus: la tipo 2, condición relacionada con complicaciones que son las principales causas de mortalidad en el mundo como son los eventos cardiovasculares. Así mismo, pueden presentarse complicaciones que implican una gran carga no sólo para el paciente sino también para su entorno familiar, y que disminuirán su calidad de vida tal como la enfermedad renal crónica o el pie diabético.

Por estas razones, se hace evidente la apropiada identificación de la enfermedad en individuos que ya la padecen pero que ignoran su condición, o la detección oportuna de estadios tempranos de la enfermedad en individuos a riesgo. Actualmente se dispone de cuatro métodos diagnósticos para tal fin: glucemia al azar, glucemia en ayuno, prueba de tolerancia oral a la glucosa y la hemoglobina A1c. Cada una de estas pruebas tiene virtudes y defectos que las hacen ser particularmente útiles para ciertos perfiles de individuos. Los valores umbrales de diagnóstico de diabetes mellitus de estas pruebas son universalmente aceptados y se basan en el riesgo de producir complicaciones de carácter microvascular, en particular en el riesgo de desarrollar retinopatía. Estas pruebas de laboratorio deben ser realizadas por métodos estandarizados ya que son susceptibles de error.

Por último, es necesario resaltar que la medición de glucemia a través de glucómetros o la prueba 2 horas después de un desayuno, no se deben utilizar como métodos diagnósticos o de tamizaje de diabetes mellitus, y realizadas para tal fin solo van a producir un gasto innecesario en tiempo y recursos, así como una incorrecta clasificación de pacientes sanos y enfermos con sus respectivas implicaciones clínicas y sociales.

Ensayos ultramicroanalíticos para el pesquijaje y diagnóstico de enfermedades infecciosas. Presente y futuro.

Irinia Yelena Valdivia Álvarez

Microbióloga, Vivedirectora agrupación de desarrollo y producción de diagnosticadores. Centro de Inmunoensayo. Cuba.

La Tecnología SUMA (Sistema Ultra Micro Analítico) es un sistema integral de reactivos, equipos, programas y servicios de postventa, que posibilita el estudio masivo y el diagnóstico de un gran número de enfermedades, a través de la realización de pesquisajes activos, lo cual permite detectarlas en sus estadios iniciales y que el tratamiento aplicado resulte más efectivo. Una de sus características esenciales es el pequeño volumen de reactivos y muestras que emplea para la realización de las pruebas.

Los ensayos, enzimáticos (ELISA) y fluorescentes, desarrollados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas se aplican tanto a muestras de suero o plasma, como de sangre seca sobre papel de filtro, lo cual facilita la realización de estudios en regiones de difícil acceso y escasos recursos. Estos ultramicroensayos constituyen la base fundamental de los programas de salud cubanos para certificación de sangre, donde el SUMA provee los diagnosticadores para Hepatitis B, Hepatitis C y VIH 1/2 y para el programa de vigilancia epidemiológica, en el cual se incluye además de los anteriores, los ensayos para la vigilancia del dengue y la enfermedad de Chagas. Las pruebas de VIH y Hepatitis B son empleadas también en el programa materno-infantil, para evitar la transmisión de estos agentes infecciosos de la madre al niño.

En el presente trabajo se exponen las características esenciales de estos ensayos, así como los datos de su aplicación e impacto durante más de 25 años en los programas nacionales de salud.

El UMELISA HIV es capaz de detectar infecciones tanto de VIH-1, como de VIH-2, con una sensibilidad superior a 99% y más de 98% de especificidad, según las evaluaciones nacionales e internacionales realizadas, cuyos resultados se presentan en este trabajo. El ensayo de Hepatitis B puede detectar concentraciones de su antígeno de superficie desde 0,28 UI/mL en muestras de suero o plasma y a partir de 2 UI/mL para muestras de sangre seca sobre papel de filtro. Dentro de la batería de pruebas para el diagnóstico de la hepatitis B se encuentran, además del ensayo para la detección del antígeno de superficie, las pruebas para la detección de los anticuerpos al antígeno core (core total y core IgM) y de los anticuerpos contra el antígeno de superficie (anti-HBsAg). De todos ellos se abordarán aspectos de su desempeño, así como las características funcionales que presentan.

El ensayo de dengue es capaz de detectar la infección por cualquiera de los 4 serotipos de este virus y constituye la prueba de pesquisaje para la vigilancia serológica del dengue en Cuba desde hace más de 10 años, en tanto la prueba de Chagas tiene un estrecho campo de aplicación para el sistema de salud cubano, a diferencia de otras áreas de nuestro continente, donde esta enfermedad es endémica.

El trabajo abordará las características y resultados esenciales de estos diagnosticadores hasta el presente, así como sus proyecciones futuras, a tono con el desarrollo internacional en esta rama del conocimiento y el completamiento de la batería diagnóstica para determinados fines, como por ejemplo, la certificación de sangre.

Pesquisa Neonatal Ampliada en Latinoamérica

Eloísa Graciela Queiruga Bernini

Química Farmacéutica. PhD. Presidenta de COLABIOCLI. Uruguay.

Latinoamérica (LA) es un hermoso continente que comprende más de veinte millones de kilómetros cuadrados de superficie, que corresponden aproximadamente al 13,5% de la superficie emergida del planeta con una gran diversidad geográfica y biológica. Posee la mayor población de hispano hablantes, con 619.687.000 habitantes representan el 6% de la población mundial, distribuidos en mega ciudades de más de 10 millones de habitantes como Ciudad de México, Sao Pablo, Caracas, Buenos Aires así como en zonas muy escasamente pobladas como la cuenca del amazonas o la Patagonia Argentina. Esto lleva a importantes diferencias culturales, lo que se ve reflejado en la actividad de los profesionales del Laboratorio, y también en la Pesquisa Neonatal (PN).

No podemos hablar de Pesquisa Neonatal sin recordar que en 1962 el Dr. Robert Guthrie, diseñó un método de inhibición bacteriana para estudiar en los niños fenilcetonúricos el contenido de fenilalanina en sangre, uno de esos niños era su hijo John (1). Admiramos la enorme genialidad y generosidad de diseñar una toma de muestra, sencilla, segura, eficaz para poder realizar el estudio en los recién nacidos, detectar la enfermedad e instaurar tempranamente el tratamiento y evitar en otros padres el dolor de un hijo con retardo mental.

La Pesquisa en LA comenzó en laboratorios privados o públicos en la década del 80, Benjamin Smith en San Pablo, Antonio Gimenez en México, la Fundación Endocrinológica Infantil (FEI) en Argentina y el programa Nacional de Pesquisa en Cuba en 1986, a instancias del Dr. Ricardo Guell .

En la década del 90 varios países de LA comenzaron programas Nacionales de Pesquisa, Costa Rica, Chile, Cuba y Uruguay se organizaron para instrumentar programas de carácter nacional, comenzando algunos solo con Hipotiroidismo Congénito (HC), o Fenilcetonuria (PKU) e HC. Comprendemos que los 4 países que lideran este grupo son los más pequeños y se basan algunos en estructuras ya existentes para organizar el programa.

Simultáneamente en los países desarrollados EEUU y Europa, cuyos programas estaban consolidados, se introducen nuevas metodologías para el estudio de las enfermedades a pesquisar. Aparece en 1990 (2) un artículo sobre Tandem Mass Espectrometría (MASA), que propone el estudio de Aminoácidos (AA) y Acil carnitinas (AC) como método de pesquisa por esta metodología. El Dr. Néstor Chamoles de la Fundación para el Estudio de Enfermedades Neurometabólicas (FESEN) Argentina, fue pionero en LA en realizar y difundir esta metodología que introdujo en su laboratorio en 1994.

¿Cuál es la ventaja del MASA? En una gota de sangre seca impregnando un papel de filtro, se corta un disco de 3mm, en él se pueden realizar más de 50 determinaciones y obtener las relaciones entre los metabolitos estudiados en una planilla de excell y en un tiempo no mayor de 4 hs, lo que nos permite sospechar más de 30 enfermedades. La determinación de Fenilalanina (PHE) que en el método inicial demoraba más de 24hs, por MASA se determina la relación Fenilalanina/Tirosina y ya en una sola corrida se puede diagnosticar la enfermedad y el grado de afectación: clásico, moderado o leve.

La certeza de los resultados y el costo le hacen decir a (3) Aaron E. Carroll “La evaluación por Masa del recién nacido parece ser de las raras intervenciones sanitarias que ahorra costos y beneficia a los pacientes, a largo plazo es posible que ahorren dinero”

La Organización Panamericana de la Salud se ha expedido al respecto en 2 documentos 1968 y 2006 (4,5) y el American College of Medical Genétic (ACMG) en su documento sobre programas de Pesquisa (6) hace un score de que enfermedades son factibles de pesquisar por pautas de gravedad de la enfermedad, dificultad diagnóstica al nacer, existencia de tratamiento, morbimortalidad, etc. y en las 29 enfermedades que pone como necesarias de pesquisar, 24 de ellas se pesquisan por Masa en una sola gota de sangre y en una sola corrida. (6)

¿Qué dificultades conlleva el instrumentar la pesquisa por esta metodología?

Una inversión inicial alta, profesionales preparados para trabajar en estos equipos, servicios de mantenimiento acordes con lo que necesitan para controles, calibraciones y servicios que requieran o sea profesionales dentro del laboratorio y en la firma que represente a este equipamiento. Un laboratorio acorde con

campana, centrífugas, estufas, secadores y todo lo necesario para el procesamiento de la muestra que vamos a inyectar. Es un desafío a nuestra capacidad como profesionales para responder al reto de las nuevas tecnologías.

¿Cuáles son los resultados?

Para el estudio de las enfermedades que la pesquisa lidera como la Fenilcetonuria, mayor rapidez y seguridad en los resultados, pero el agregado de encontrar patologías no detectadas clínicamente tanto en el niño como en la madre son un agregado muy positivo. Déficit de B12 por ser hijos de madres vegetarianas estrictas, déficit de carnitinas, déficit de Acilcarnitina de cadena media en la madre, y toda la gama de acidemias y defectos de la beta oxidación en los niños.

Enfermedades que pueden ocurrir 1/200.000, que no eran posibles de ser implementadas por ser de muy baja incidencia y no llenar los requisitos para ser incluidas en un programa de pesquisa, hoy aparecen en una corrida sin necesidad de implementar una técnica especial para su búsqueda.

La gran diferencia es que cuando comenzamos los programas de PN, cada enfermedad que añadíamos al programa debía poner en marcha una técnica, tal vez por ELISA, EQL, Fluorimetría, con requerimientos especiales de instrumental, controles, técnicos, hoy podemos detectar 26 enfermedades con una sola técnica, una sola muestra, una sola corrida, un solo equipamiento.

Que hemos encontrado en los países que tienen implementada la Pesquisa Ampliada Uruguay (7) y Costa Rica (8)?

Uruguay: 1 citrulinemia, 4 MCAD, 2 AMM, 4 Déficit de B12, 1 Déficit primario de carnitina (CUD), 1 déficit de Cianocobalamina, 1 3-MCC en 325.227 niños estudiados

Costa Rica: 14 MCAD, 20 SCAD, 31 MSUD, 1 Tirosinemia, 10 Acidemia Propiónica, 8 Déficit de B12, 1 IVA, en 610.983 niños estudiados.

Estos hallazgos se consideran un agregado positivo a lo invertido en realizar la pesquisa de las enfermedades con mayor incidencia como son HC, PKU, HSC, FQ. Vale la pena intentarlo, en algunas enfermedades el tratamiento es tan sencillo como evitar el ayuno prolongado y suplementar con carnitina si es necesario, en otros el tratamiento es más complejo. Pensemos que en estas enfermedades de difícil tratamiento, cuán importante es conocer el diagnóstico, lo antes posible, ya sea por la eficacia del tratamiento que se instaura prematuramente o por evitar el peregrinar de padres y especialistas en busca de un diagnóstico.

Referencias

1. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*. 1963; 32: 338-4
2. Millington DS., Kodo N., Norwood DC., Roe CR., *J Inher. Metab. Dis.* 13 (1990) 321-324
3. Aaron Carroll MD MS, Stephen M. Downs MD MS www.pediatrics.org/cgi/doi/10.1542/peds.2005-2633H
4. Wilson JMG, Jungner G. Principios y práctica de la evaluación de la enfermedad. Ginebra: OMS, 1968. Disponible en: <http://www.who.int/bulletin/volumes/86/4/07-050112BP.pdf>
5. Andermann A, Blancquaert I, Beauchamp S, Déry V. Revisiting Wilson and Jungner in the genomic age: a review of screening criteria over the past 40 years et al. *Bulletin of the World Health Organization*. Abril 2008, 86 (4):317-19.
6. Watson M, Lloyd-Puryear M, Mann M, Rinaldo P, Howell R. Newborn Screening: Toward a Uniform Screening Panel and System. *Genet Med* 2006;8 (5, Suppl):S12-S25
7. Queiruga G, Queijo C, Lemes A, Machado M, Garlo P. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud vol.9 no.2 Asunción Dic. 2011 National System of Newborn Screening in Uruguay*
8. Saborio Rocafort M. La experiencia en Costa Rica con el Tamizaje Neonatal Expandido.

HEMATOLOGÍA

Hematología: del laboratorio a la práctica clínica Detección de enfermedad mieloproliferativa a partir de un patrón de análisis en sangre periférica.

María Clemencia Garnica Barrios

Bacterióloga, Especialista en Hematología. Bogotá.

Los síndromes mieloproliferativos crónicos (SMPC) son enfermedades clonales; originadas por una o más mutaciones de la célula madre hematopoyética. Están caracterizados por la proliferación en médula ósea de uno o más de los linajes de células mieloides (eritroides, granulocíticas y megacariocíticas) donde la médula ósea se encuentra ocupada por la población celular expandida y la proliferación clonal puede afectar algunos casos la línea linfóide.

La línea en proliferación mantiene en algún grado la capacidad de diferenciación y maduración, por lo que la expresión hemoperiférica es de celularidad madura y eficaz. Se considera que funcionan normalmente durante las etapas tempranas de la enfermedad y que la sobreproducción da lugar a las manifestaciones clínicas y patológicas de la enfermedad.

Los SMPC comparten una serie de características clínicas; e incluyen la tendencia a la evolución a otras hemopatías (leucemias agudas y fibrosis medular),

predisposición a hemorragias y trombosis y todas aquellas manifestaciones derivadas de la expansión celular (esplenomegalia, osteoartralgias, etc.).

El diagnóstico es casual en un alto porcentaje. Se da a partir de alteraciones analíticas por infiltración de células tumorales o por hematopoyesis extra medular y mielofibrosis. Algunos de los SMPC pueden presentar evolución clonal con proliferación de precursores inmaduros (fase blástica) o hacia fibrosis medular con mieloptisis (infiltración de la MO por células no hematopoyéticas, lo anterior resulta en diferentes grados de anemia, trombocitopenia y neutropenia).

La denominación SMPC engloba a diversas entidades nosológicas. Los límites entre ellos no son claros debido a la ausencia de marcadores específicos. Este es un concepto muy importante con implicaciones prácticas para la detección de pacientes que tienen estas enfermedades y para su manejo clínico, los SMPC se pueden detectar de manera efectiva en un alto porcentaje de los casos; incluso en sus primeras etapas basados en el reconocimiento de los patrones característicos que se presentan en sangre periférica, (hemograma, FSP y determinaciones de algunos analitos en suero).

La clasificación de la Organización Mundial de la Salud del año 2008 de SMPC actualmente denominados Neoplasias mieloproliferativas (NMP) es Leucemia mieloide crónica (LMC) - Trombocitemia esencial (TE) - Mielofibrosis primaria (MI) - Policitemia vera (PV) - Leucemia neutrofílica crónica (LNC) – Síndrome hipereosinofílico, (eosinofilia clonal, leucemia eosinofílica crónica (LEC)) y la Mastocitosis sistémica.

Las mutaciones que se conocen actualmente asociadas con los SMPC en el diagnóstico están siendo definidas en términos de marcadores moleculares. El hallazgo de estos son un blanco terapéutico potencial, valor de pronóstico y evolución.

Citogenética y biología molecular en los SMPC

- La presencia del cromosoma philadelphia (Cr Phi +), t (9;22) o mutación BCR-ABL se asocia con la LMC.
- (Cr Phi -) en la PV, TE y MF.
- Mutación V617F del gen JAK2 ha aportado otro marcador molecular de clonalidad; la mutación del gen de la Kinasa Janus es específica de neoplasias mieloides la presencia de esta mutación excluye eritrocitosis, trombocitosis, leucocitosis reactiva, mielofibrosis.
- La mutación V617F del gen JAK2 puede dar origen a tres diferentes fenotipos de la enfermedad se encuentra en el 97% en la PV y en 50% en la MF y TE, otra mutación la del exón 12, del gen JAK2 presente en algunos casos de la PV.

- Gen de fusión FIP1L1-PDGFR-A, PDGFR-B, FGF-R1 asociado a la LEC o Eosinofilia clonal con buena respuesta terapéutica.
- Recientemente, la mutación, MPLW515L, fue descrita en pacientes con mielofibrosis JAK2V617F-negativa con metaplasia mieloide y en algunos pacientes con TE y MF

Aspectos de diagnóstico

Una característica de los SMPC es el solapamiento de signos/síntomas, la falta de conocimiento específico acerca de los patrones que están relacionados con la enfermedad y la sobre posición de los patrones entre las condiciones reactivas y las neoplásicas.

Los patrones están ocultos en pacientes que tienen condiciones comórbidas entre las diferentes formas, (leucocitosis, trombocitosis, eritrocitosis, hiperplasia megacariocítica, esplenomegalia, mielofibrosis): lo anterior puede dificultar la inclusión de un paciente en una determinada entidad.

La valoración de la "sangre periférica" representan al laboratorio clínico la creación de patrones iniciales y desarrollando algoritmos de diagnóstico que aporten a la orientación y diferenciación con otras situaciones patológicas convirtiéndolo en el primer eslabón para el diagnóstico.

El objetivo del laboratorio es la detección y no la clasificación o el diagnóstico de los TMPC. La definición de los patrones de anormalidad que son predictivos para determinados tipos de neoplasia comienza con la interpretación del hemograma automatizado, los datos numéricos, histogramas, dispersogramas, los hallazgos y las tendencias que se pueden identificar en los datos hematológicos acumulados del paciente dan una visión rápida de su historial hematológico, complementando esto con los hallazgos citológicos en el frotis de sangre periférica que en conjunto permite diferenciar neoplasia mieloproliferativa, condiciones reactivas o ausencia de neoplasia. Es relevante aclarar que la capacidad de hacer una diferenciación desde el laboratorio permite que los pacientes reciban evaluaciones de diagnóstico y tratamientos adecuados rápidamente.

La revisión de las tendencias en los datos hematológicos nos permite ver los cambios constantes de los TMPC El hemograma en las neoplasias mieloproliferativas Neutrofilia, basofilia y trombocitosis excepto en la trombocitemia esencial, donde por definición la proliferación se limita al linaje megacariocítico (plaquetas). La eritrocitosis se ve solo en la policitemia vera pero la enfermedad puede estar presente durante meses o años antes de que la proliferación de eritrocitos sea evidente y en una proporción de pacientes puede ser transitoria o de un grado medio; la anisocitosis refleja la hematopoyesis extra medular al igual que los eritroblastos.

Las características morfológicas en el frotis de sangre periférica relevantes para el diagnóstico de los TMPC incluyen: neutrófilos con grados variables de hipersegmentación nuclear, agranulares (excepto en la mielofibrosis primaria), desviación a la izquierda en diferente grado y en algunos casos blastos circulantes, apoya en la definición de patrón morfológico la presencia de plaquetas hipogranulares, grandes o gigantes; estas generalmente no se observan en la trombocitosis reactiva, los hematíes con forma de lagrima (dacriocitos) típicamente observados en la mielofibrosis primaria pero es importante comprender que la fibrosis es también la etapa final común hacia la policitemia vera y en la leucemia mieloide crónica.

En las últimas etapas de la enfermedad, la mielofibrosis primaria y la policitemia vera presentan micro megacariocitos como respuesta a la hematopoyesis extramedular, presencia de basofilia y monocitosis que inicialmente no muestran alteración morfológica hasta las últimas etapas de la enfermedad y la reacción leucoeritroblastica que refleja la hematopoyesis extra medular.

En las primeras etapas de la enfermedad se puede observar neutrófilos isplasicos. Esta característica cuestiona si se está frente a un SMPC o neoplasia mieloproliferativa mielodisplásica mixta. Al mismo tiempo, las características displásicas que se desarrollan en pacientes que han tenido SMPC por largo tiempo probablemente señalan la evolución de la enfermedad hacia una fase mielodisplásica y probablemente evolucionará hacia la leucemia mieloide aguda.

La integración de datos del hemograma, la representación gráfica y el análisis de los datos hematológicos acumulados del paciente ayuda a evidenciar el cambio de los parámetros con el tiempo en relación el uno al otro, los datos numéricos ayudan a desarrollar reglas delta que incorporan la magnitud de los cambios que ocurren en los parámetros hematológicos durante la evolución de la neoplasia y diferentes intervalos de tiempo.

Las observaciones citológicas permiten establecer, determinar y reconocer los patrones morfológicos, los cuales facilitan la capacidad de distinguir la neoplasia mieloproliferativa de condiciones reactivas, ubicar al paciente en la categoría correcta: infección, inflamación, neoplasia mieloproliferativa, respuesta iatrogénica u otras situaciones de enfermedad; en tiempo real lo que permite mejorar los resultados, evitar complicaciones y disminuir el costo del cuidado del paciente.

El conteo de basófilos en la detección de las primeras etapas de la neoplasia mieloproliferativa es importante. Los intervalos de referencia de basófilos varían significativamente entre laboratorios; incluyendo los límites entre 0-150, 0-183 o 0-200 / mm³. Para fines de la detección de la neoplasia mieloproliferativa se maneja

un valor mayor o igual a $0.1/\text{mm}^3$ o a 2% en el diferencial automatizado de leucocitos son valores de corte útiles.

La leucemia mieloide crónica es la más frecuente de los SMPC y presenta una evolución en tres fases sucesivas: fase crónica, fase acelerada y crisis blástica las alteraciones analíticas encontradas son:

- Fase Crónica: en sangre periférica leucocitosis $>100 \times 10^9 /\text{L}$, precursores mieloides en todos los estadios de maduración (desviación a la izquierda), monocitosis absoluta, basofilia, trombocitosis, anemia variable, disminución de la fosfatasa alcalina granulocitaria (FAG), aumento de los parámetros de proliferación celular (LDH, ácido úrico, vitB_{12}).
- Fase Acelerada criterios de OMS: blastos 10-19% en sangre periférica (s.p) o médula ósea (m.o), basófilos en s.p. $\geq 20\%$, trombocitopenia ($< 100 \times 10^9/\text{L}$) no relacionada con el tratamiento o trombocitosis ($> 1.000 \times 10^9/\text{L}$) resistente al mismo; leucocitosis progresivas y refractarias.
- Crisis blástica uno o más de los siguientes criterios (OMS): blastos. $\geq 20\%$ en s.p o en m.o., proliferación extramedular de blastos (bazo, ganglios, SNC, piel). El 75% de las crisis son de estirpe mieloide (neutrófila, basófila, megacarioblástica, eritroide, monocítica o panmielosis); 20% son de estirpe linfocítica y en ocasiones bilineales.

Se evidencia en la evolución patológica de la LMC que no necesariamente puede haber un incremento de leucocitos, sin embargo, el conteo absoluto de blastos puede incrementarse, direccionando la transformación a una fase acelerada o una crisis (fase blástica) de la LMC.

Causas probables de trombocitosis en pacientes adultos: la trombocitosis con características de trastorno mieloproliferativo, incluyen trombocitosis progresiva persistente, el diferencial incluye la trombocitemia esencial, mielofibrosis primaria pre fibrótica o rara vez pre policitemia, policitemia vera, de la misma manera es infrecuente que se presente una trombocitosis marcada con conteos de plaquetas superiores a un millón en la LMC, algo parecido a la trombocitemia esencial. Un paciente con trombocitosis progresiva persistente tiene una neoplasia mieloproliferativa hasta que se demuestre lo contrario.

Cuando la duración es relativamente corta (medida en meses) se deben incluir etiologías alternativas en el diagnóstico diferencial. La presencia de anomalías hematológicas adicionales indicativas del patrón mieloproliferativo aumentará la probabilidad que se trate de neoplasias mieloproliferativas. El discriminador individual más útil, en la gran mayoría de los casos, será el rasgo morfológico de las plaquetas, grandes o hipo granulares, de un tamaño aproximado de un tercio del diámetro de un eritrocito.

El diagnóstico diferencial con la reacción leucemoide: leucocitosis (30-100.000/ μ l) neutrofilia, diferente grado de desviación a la izquierda, no basofilia, índice FAG normal.

La leucemia mielomonocítica crónica pertenece a un grupo muy heterogéneo de neoplasias mieloides. Clasificada por la OMS en 2008 como un trastorno mielodisplásico mieloproliferativo mixto. En etapa temprana, esta neoplasia, puede ser identificada con bastante seguridad debido a que presenta monocitosis persistente $>1.000 \times 10^9/L$ que evoluciona a ritmos muy variables sin cáncer o infección. No hay criterios reproducibles para la fase acelerada; por lo tanto el laboratorio juega un rol importante en la predicción de los cambios significativos clínicos en la progresión de la enfermedad, incluyendo la posibilidad a una transformación en leucemia mielomonocítica aguda, basado en la evaluación del tiempo en que se duplica la monocitosis y la evaluación de los rasgos morfológicos que muestran los monocitos (monocitos inmaduros, promonocitos, lobulación nuclear anormal, menos lobulaciones), segmentación nuclear, cromatina más fina y uno o más nucléolos pequeños. En muchos casos, a medida que el conteo absoluto de monocitos aumenta, los porcentajes relativos de estas células y la anormalidad morfológica e inmadurez también lo hacen. Estos cambios se asocian con cambios en otros parámetros hematológicos que señalan la progresión de la enfermedad.

Criterios para distinguir la leucemia mielomonocítica crónica de la leucemia mieloide crónica: no son dependientes del porcentaje, valor absoluto de monocitos o la proporción de monocitos a neutrófilos y precursores, es útil y su relación temporal con el desarrollo de otras anormalidades hematológicas, más las características morfológicas de los monocitos y neutrófilos aportaran a diferenciar los casos.

Si hay una monocitosis progresiva persistente que se desarrolle antes que aumente el conteo absoluto de neutrófilos no es probable que se trate de una LMC. La ausencia de basofilia o un aumento mínimo en los basófilos favorece a la leucemia mielomonocítica crónica.

Las características que diferencian la leucemia mieloide crónica negativa para (Cr Phi +) o t(9;22) que da lugar al gen de fusión BCR-ABL de la leucemia mieloide crónica clásica son: aumento del volumen corpuscular medio (VCM), anemia, normoblastos y trombocitopenia, un conteo normal de neutrófilos con características displásicas (núcleos pelgueroideos e hipogranulares), ausencia de basofilia, las plaquetas no muestran características morfológicas atípicas; en la evolución de la enfermedad se presenta desviación a la izquierda y la presencia de uno a dos por ciento de blastos con características displásicas moderadas. Este no es el patrón de la leucemia mieloide crónica para (Cr Phi +), la macrocitosis o anemias macrocíticas inexplicable es un factor de riesgo importante para todo tipo de neoplasia mieloide; incluyendo leucemia mieloide aguda.

Trombocitemia esencial (TE)

Obedece a la expansión de la línea megacariocítica, caracterizado por trombocitosis progresiva persistente con cifra de plaquetas $>$ a 1 millón/ μ L; se convierte en un diagnóstico de exclusión.

Los pacientes pueden ser asintomáticos o presentar cuadro clínico caracterizado por la tendencia a las hemorragias y a fenómenos trombóticos.

El FSP muestra trombocitosis, plaquetas morfológicamente normales, ausencia de plaquetas distrombopoyéticas, no se evidencian alteraciones en las otras líneas celulares, si se presenta anemia es normocítica, ocasionalmente normoblastos, leucocitosis con algunos elementos inmaduros. En la evolución de la patología se observarán plaquetas anormales grandes o hipo granulares, las alteraciones bioquímicas aumento de la LDH, vitamina B12, hiperpotasemia, hiperuricemia.

Es importante diferenciar la TE de las trombocitosis secundarias o reactivas asociadas a otras patologías: las plaquetas se presentan como reactante celular de fase aguda en procesos inflamatorios agudos o crónicos, sangrados agudos, déficit de hierro, procesos infecciosos, actividad física intensa, tratamiento con esteroides, pacientes esplenectomizados, recuperación post quimioterapia y asociadas a estrés.

Mielofibrosis primaria (MI)

Síndrome mieloproliferativo caracterizado por fibrosis medular, hematopoyesis extramedular (metaplasia mieloide) causado por el aumento del factor estimulante de los fibroblastos, que se produce en los megacariocitos.

La mielofibrosis primaria en las etapas temprana, media o tardía es fácil de identificar basándose en el patrón de la sangre periférica. Un aumento del ancho de distribución eritrocitaria en el hemograma, la anisocitosis es una característica clave de la mielofibrosis primaria y otros tipos de neoplasia mieloide con médulas fibróticas.

En el FSP se evidencian hematíes en lagrimea (dacriocitos), un número reducido de eritroblastos circulantes, anemia normocítica-normocrómica de intensidad leve-moderada, leucocitosis leve ($<$ 20.000/ μ L) con elementos inmaduros circulantes y pueden observarse células blásticas en escaso porcentaje con signos de disgranulopoyesis (pseudo-Pelger, disgranularidad, hiposegmentación), basofilia progresiva y persistente ausentes en las etapas tempranas de la enfermedad, el conteo de plaquetas aumentado de forma ligera-moderada, microcitosis que avanza lentamente debido a la hemorragia relacionada con un defecto de plaquetas que se ha caracterizado como una forma adquirida de la enfermedad de Von Willebrand, algunos pacientes muestran pancitopenia al diagnóstico.

Hay pacientes con la llamada mielofibrosis primaria pre fibrótica que se parece a la trombocitemia esencial al momento de su presentación clínica, estos pacientes desarrollan alteraciones hematológicas adicionales indicando que hay, mielofibrosis primaria o un tipo de neoplasia mieloproliferativa no clasificada. Una vez que se ha establecido el diagnóstico de neoplasia mieloproliferativa, el papel del laboratorio es alertar los cambios clínicamente relacionados con el diagnóstico o pronóstico del paciente; la razón de esto es que la (MI) tiene mayor morbimortalidad en comparación con la TE, esto está relacionado con una mayor incidencia de falla medular terminal y con la transformación a leucemia mieloide aguda.

Policitemia vera (PV)

Policitemia rubra vera o enfermedad de Vasquez-Osler, SMPC con proliferación celular trilineal de las células hematopoyéticas, predomina la proliferación de precursores eritroides; muestra curso evolutivo típico en dos fases consecutivas llamadas policitemia y postpolicitemia.

El enfoque diagnóstico está basado en la determinación de los niveles séricos de eritropoyetina (EPO) y en la determinación de la mutación del gen de la tirosín-kinasa JAK (V617F). Dicha mutación parece sensibilizar a los precursores eritroides a la acción de la EPO.

Los hallazgos de laboratorio: constante incremento de hematíes circulantes fenotípicamente normales, hematíes > 5,5 millones/ml, aumento de la masa eritrocitaria >36 ml / kg en varones y > 32 ml / kg en mujeres, Hb > 18.5 g/dl en varones y > 16.5 g/dl en mujeres, Hto > 70% en varones y > 62% en mujeres. suele observarse una expansión en menor frecuencia panmielosis (leucocitosis, basofilia y trombocitosis). Su evolución típica o clásica puede expresarse en 2 fases: fase policitemia y fase de fibrosis post-policitemia.

La presencia de algunos cambios clínicos y de laboratorio que sugieren la posibilidad de una transformación a mielofibrosis (MF) son: la presencia de precursores mieloides inmaduros, dacriocitos en sangre periférica, disminución de la Hb no relacionada al tratamiento, microcitosis por déficit de Fe, disminución de las plaquetas, aumento de LDH.

Leucemia neutrofílica crónica

Es una SMPC infrecuente que presenta una reacción leucemoide y caracterizada por leucocitosis (>25.000l), aumento de los neutrófilos en sangre periférica (aunque raramente es posible la aparición de granulocitos inmaduros < de 5% de mielocitos o metamielocitos), negativo para blastos y en algunos casos normoblastos; puede desarrollarse trombocitopenia por hiperesplenismo.

Dentro de los hallazgos de laboratorio se presenta aumento de la vitamina B12, ácido úrico y fosfatasas alcalinas leucocitarias. El diagnóstico diferencial debe hacerse con las leucocitosis reactivas (cuadros infecciosos, inflamatorios o neoplásicos).

Leucemia eosinofílica crónica/ Síndrome hipereosinofílico (LEC - SHE)

Síndrome hipereosinofílico primario resultado de la proliferación clonal incontrolada de los precursores de los eosinófilos en médula ósea y en otros tejidos.

Criterios diagnósticos:

Hemograma de sangre periférica: eosinofilia, definida según el número absoluto de eosinófilos como: leve 500-1500/ μ l; moderada 1500-5000/ μ l, grave $>5000/\mu$ l, anemia (~50 %), trombocitopenia (~30 %) o trombocitosis (~15 %), monocitosis y leucocitosis moderada, dosificación de IgE dentro del intervalo biológico de referencia, un porcentaje de blastos >2 % en sangre periférica o >5 % en médula ósea.

El síndrome hipereosinofílico secundario o eosinofilia reactiva de origen: alérgico, tóxico, enfermedades inflamatorias crónicas, infección por protozoos, reacciones farmacológicas, enfermedad injerto contra huésped, linfoma de Hodgkin, linfomas de células T, histiocitosis de células de Langerhans, mastocitosis sistémica, tumores sólidos, aspergilosis enfermedades sistémicas de tejido conectivo (poliangitis granulomatosa eosinofílica y otras vasculitis sistémicas, fascitis eosinofílica).

Referencias

1. Hematología. del laboratorio a la práctica clínica, Fernando Cobo Martínez y Jesús Alejo García Bautista, Formación Alcalá 2010.
2. Ruiz Arguelles GJ ed. Fundamentos de Hematología. 3ra ed, México, Editorial Panamericana. 2003.
3. Hemograma, cómo hacer e interpretar, Raimundo Antonio Gomes Oliveira, editorial Amolca 2011
4. Kaushansky K, Lichtman M, Beutler E, Kipps T, Seligsohn, U, Prchal J. Williams Hematology. 8th ed. United States: me Graw Hil 2010
5. Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, et al: Philadelphia chromosome- positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. Ann Intern Med 2003
6. Labardini-Mendez JR. Padecimientos mieloproliferativos crónicos y mielofibrosis.
7. Mesa RA, Elliott MA, Tefferi A. Splenectomy in chronic myeloid leukemia and myelofibrosis with myeloid metaplasia Blood Reviews; 2000,
8. Rosti G, Martinelli G, Basi S, et al: Molecular response to imatinib in late chronic phase myeloid leukemia. Blood 2004.
9. Cazzola M. Towards a rational treatment of essential thrombocythemia, despite limited evidence and old prejudices. Haematologica 2004.
10. Enright H, McGlave P. Chronic myelogenous leukemia. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, et al, eds. Hematology: Basic Principles and Practice. 3 rd ed. New York, NY: Churchill Livingstone; 2000.
11. Goldman JM, Melo JV: Chronic myeloid leukemia advances in biology and new approaches to treatment. 2003.
12. Spivak JL, Barosi G, Tognoni G, et al. Chronic Myeloproliferative Disorders Hematology 2003.

Análisis molecular escalonado para la detección de variantes patogénicas en Hemofilia A en Colombia.

Luz Karime Yunis,^{*} Adriana Linares Ballesteros,^{£ § †} Edgar Cabrera,[£] Juan J. Yunis^{* ζ}

Médicos: ^{*}Grupo de Patología Molecular, Universidad Nacional de Colombia. [£]Grupo de Onco-Hematología pediátrica, Fundación Hospital de la Misericordia. [§]Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, [†]Programa de Hemofilia, Clínica Infantil Colsubsidio. ^ζDepartamento de Patología, Facultad de Medicina e Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

La hemofilia A (HA) es el trastorno hemorrágico más común con una incidencia global de 1 de cada 5.000 varones nacidos vivos. Es un trastorno recesivo ligado al cromosoma X. En todo el mundo, hay aproximadamente 172.000 personas que padecen la afección y de éstos, el 60% tienen la forma grave de la enfermedad (nivel plasmático de actividad de FVIII por debajo del 1%), seguido de los casos leves (25%, la actividad de FVIII entre 5-30%) y los casos moderados (15%, la actividad de FVIII entre 1-5%).

Diferentes tipos de variaciones genómicas son responsables de los diferentes fenotipos de HA. En general, las variaciones con cambio de sentido son responsables de cerca del 50% de todos los casos de HA. Sin embargo, las inversiones Intron 22 y el intrón 1 inversiones (Inv22 y INV1) representan las alteraciones moleculares más frecuentes en los pacientes con HA severa con una frecuencia de 45 a 50% y 0,5 a 5%, respectivamente. Los individuos con inversiones del intrón 1, del intrón 22, deleciones y mutaciones sin sentido, por lo general tienen la forma severa de la enfermedad y un mayor riesgo de desarrollo de inhibidores durante el tratamiento. En los últimos años, el análisis de fusión de alta resolución (HRM) se ha utilizado para detectar segmentos genómicos para detectar regiones que puedan albergar variaciones de nucleótidos en diferentes enfermedades, incluyendo HA.

En Colombia hasta el momento, no hay servicios de diagnóstico molecular de HA. En este trabajo, hemos utilizado un enfoque sistemático para caracterizar las variaciones de la hemofilia A en una cohorte de pacientes de Bogotá, Colombia. En primer lugar, las Inv22 y Inv1 se determinaron mediante Inverse shifting-PCR (IS-PCR). Las muestras negativas para Inv22 y Inv1, fueron amplificadas para los 26 exones del gen F8 distribuidos en 52 reacciones de PCR, seguido de secuenciación Sanger. Se utilizó el análisis de microarrays en casos seleccionados para caracterizar mejor grandes deleciones detectadas en algunos casos. Un total de 37 pacientes varones con HA (30 severos, 5 moderados y 2 leves) fueron analizados por Inverse shifting-PCR para analizar las inversiones Inv22 y Inv1, seguido por análisis HRM y secuenciación Sanger y el análisis de microarrays. Entre los pacientes de HA severa, la Inv22 fue identificada en 15/30 pacientes varones (50%),

3/30 (10%) tenían Inv1, 3/30 (10%) tenían una gran variación estructural, y 5/30 (17%) tuvieron variaciones, ya sea de un solo nucleótido o pequeñas variaciones frameshift. No se detectó la variación genética patogénica en 4 / 30 pacientes severos (13%). Entre los pacientes moderados, uno tenía INV22 (20%) y los restantes tenían variaciones de nucleótido único. Dos pacientes leves también tenían variaciones de cambio de sentido. Con este enfoque sistemático, hemos sido capaces de detectar variantes patógenas en 33/37 varones afectados analizadas (89,2%) por primera vez en una cohorte de pacientes de Colombia.

Nuevos marcadores de riesgo trombótico: nucleosomas circulantes y NETs (Neutrophil Extracellular Traps)

Viviana Marcela Rodríguez Pardo

Bacterióloga, MSc. PhD. Laboratorio de Hematología. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

Durante procesos infecciosos e inflamatorios la activación de los neutrófilos conduce a la formación y liberación de estructuras denominadas “trampas extracelulares” (Neutrophil Extracellular Traps ó NETs), las cuales participan en la retención de agentes infecciosos y promueven su fagocitosis mediante un mecanismo denominado NETosis (1, 2). Sin embargo, la generación de NETs también se asocia a enfermedades de origen no infeccioso como preeclampsia (3) 0, vasculitis (4) y lupus eritematoso sistémico (5) donde participan en la inducción de la formación de anticuerpos anti-ADN exacerbando la presentación clínica en la enfermedad autoinmune. Los NETs están conformados por nucleosomas, ácidos nucleicos y proteínas nucleares que participan en la activación de los factores de coagulación XII, XI y VII (6); así como en la generación del fenotipo procoagulante en las plaquetas (7) e incremento en la síntesis del Factor von Willebrand de origen endotelial; promoviendo la generación de trombina, activación plaquetaria y aceleración en la formación de trombos en la microcirculación.

Diferentes modelos animales han demostrado la participación de NETs en trombosis arterial y trombosis venosa profunda (6, 8), así como trombosis asociada a cáncer(9). Adicionalmente, estudios en humanos han demostrado correlación entre los niveles circulantes de nucleosomas y ADN con el estado clínico de pacientes con microangiopatías tromboticas(10) y trombosis venosa profunda(11); por tal razón los NETs están empezando a ser considerados como nuevos marcadores de riesgo trombótico.

Referencias

1. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. J Cell Biol. 2007;176(2):231-41.

2. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(8):577-82.
3. Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, Gebhardt S, Hahn S. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum Immunol.* 2005;66(11):1146-54.
4. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med.* 2009;15(6):623-5.
5. Hakkim A, Furnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(21):9813-8.
6. van Montfoort ML, Stephan F, Lauw MN, Hutten BA, Van Mierlo GJ, Solati S, et al. Circulating nucleosomes and neutrophil activation as risk factors for deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(1):147-51.
7. Carestia A, Rivadeneyra L, Romaniuk MA, Fondevila C, Negrotto S, Schattner M. Functional responses and molecular mechanisms involved in histone-mediated platelet activation. *Thromb Haemost.* 2013;110(5):1035-45.
8. McInturff AM, Cody MJ, Elliott EA, Glenn JW, Rowley JW, Rondina MT, et al. Mammalian target of rapamycin regulates neutrophil extracellular trap formation via induction of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Blood.* 2012;120(15):3118-25.
9. Swystun LL, Mukherjee S, Liaw PC. Breast cancer chemotherapy induces the release of cell-free DNA, a novel procoagulant stimulus. *J Thromb Haemost.* 2011;9(11):2313-21.
10. Fuchs TA, Kremer Hovinga JA, Schatzberg D, Wagner DD, Lammler B. Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood.* 2012;120(6):1157-64.
11. Diaz JA, Fuchs TA, Jackson TO, Kremer Hovinga JA, Lammler B, Henke PK, et al. Plasma DNA is Elevated in Patients with Deep Vein Thrombosis. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord.* 2013;1(4).

MICROBIOLOGÍA - BACTERIAS

Estado actual de las Rickettsias en Colombia. Armando un rompecabezas

Marylin Hidalgo Díaz

Bacterióloga y Laboratorista Clínica. MSc, PhD. Pontificia Universidad Javeriana

Las rickettsiosis son entidades clínicas de carácter zoonótico causadas por bacterias pertenecientes al género *Rickettsia*, las cuales son transmitidas por artrópodos hematófagos como garrapatas, pulgas, piojos y ácaros (1). Con base en análisis filogenéticos, este género bacteriano se divide en cuatro grupos: el grupo de las fiebres manchadas (*R. rickettsii*, *R. sibirica*, *R. conorii*, *R. parkeri*, entre otras), grupo del tifus (*R. typhi* y *R. prowazekii*), grupo transicional (*R. akari*, *R. australis* y *R. felis*) y el grupo ancestral (*R. canadiensis* y *R. bellii*)². Actualmente, se han identificado aproximadamente 25 especies pertenecientes al género *Rickettsia*, las cuales tienen una distribución mundial y su ecología está determinada por factores ambientales y la presencia de vectores específicos que influyen en el

establecimiento y la epidemiología de determinadas rickettsiosis en diferentes regiones del mundo. En el ciclo de vida de estos microorganismos los artrópodos y pequeños mamíferos suelen ser utilizados como reservorios y hospederos amplificadores, siendo el humano un huésped accidental (1,3).

Las rickettsiosis son un conjunto de patologías que se caracterizan por la presencia de fiebres exantemáticas donde la más letal es la fiebre manchada de las montañas rocosas o RMSF (por *Rocky Mountain Spotted Fever*) cuyo agente etiológico es *R. rickettsii*, en esta infección se ven afectadas personas inmunocompetentes de cualquier edad. Las características clínicas más graves se observan cuando se ven comprometidos el cerebro, los pulmones, los riñones y el hígado, por ejemplo, edema pulmonar no cardiogénico, cambios neuronales focales, convulsiones, entre otros (4,5). Sin embargo, cabe destacar que existen otras rickettsiosis como el tifo endémico y epidémico causado por *R. typhi* y *R. prowazekii* respectivamente, la fiebre manchada transmitida por pulgas causada por *R. felis* y el rickettsialpox causado por *R. akari* (2,3).

En el análisis patológico se observa vasculitis de vasos pequeños, como consecuencia de la infección directa de las células endoteliales, y la respuesta inmune manifestada como un infiltrado linfohistiocitario perivascular. La infección se inicia en la zona de inoculación y posteriormente se extiende de célula a célula y por la circulación venosa, lo que finalmente produce cientos de focos de vasculitis multisistémica (6). Dependiendo del tipo de rickettsia, se pueden producir neumonitis intersticial, lesiones vasculíticas cutáneas (exantema clásico), meningitis, afección hepática, renal y gastrointestinal. En términos de patogénesis, una de las principales consecuencias del daño endotelial es el aumento de la permeabilidad capilar, lo cual lleva a edema, hipotensión, choque e hipoalbuminemia. También es relativamente frecuente el consumo de plaquetas, que genera trombocitopenia (6,7).

Grupo de las fiebres manchadas en Colombia

En 1935 se reportó en la localidad de Tobia, entonces municipio de Villeta, en Cundinamarca, un brote de una enfermedad febril, con una tasa de ataque del 20% y una relación de caso-fatalidad superior al 90%. De acuerdo con los hallazgos clínicos, el comportamiento en animales de experimentación y el aislamiento de la bacteria, se determinó que era una enfermedad similar a la fiebre manchada de las Montañas Rocosas de Norteamérica, y se denominó fiebre de Tobia (8). Entre 1940 y 1941 el Dr Patiño-Camargo tuvo la oportunidad de revisar dos nuevos casos compatibles con la rickettsiosis exantemática, provenientes de áreas cercanas a Tobia. Ambos pacientes murieron y su sangre fue usada para inocular cobayos, los cuales presentaron una reacción característica, que incluye orquitis y fiebre al 5 día post-inoculación. Los aislamientos obtenidos de estos animales eran compatibles con rickettsias y fueron mantenidos por pases continuos en animales, un trabajo

realizado en conjunto con el Laboratorio de Montañas Rocosas, Hamilton Montana en USA.

Infortunadamente, después de este reporte, las rickettsiosis no han sido estudiadas en Colombia, aunque en los libros de trabajo que reposan en el Instituto Nacional de Salud se encuentra reportado otro brote de rickettsiosis en la zona del valle de Suratá, Santander. Este caso fue descrito en 1946 por Carlos Sanmartín. En 2002, Miranda y colaboradores reportaron una seroprevalencia de 49% contra rickettsias del grupo de las fiebres manchadas, en una localidad de Córdoba. El reporte claramente indica que los trabajadores del campo de esta zona están expuestos a las rickettsias (29% de las muestras tenían reactividades de ++/+++ y +++/+++) (9). En el 2005, se informó de dos casos fatales ocasionados por *R. rickettsii* en pacientes que provenían de una localidad cercana (Villeta) a donde se reportó el primer caso de la fiebre de Tobia en 1935 (10) y en los años 2006, 2007 y 2008 se presentaron tres brotes ocasionados por este microorganismo, en diferentes localidades de Colombia particularmente en el Urabá Antioqueño, que incluyen los municipios de Necoclí, Los Córdoba y Alto de Mulatos (11-13).

En el 2017 fue publicado el reporte de la seroprevalencia 40.3% de anticuerpos contra *Rickettsia* en la población rural de Villeta, uno de los datos más altos reportados en la literatura (14). Continuando con el área de Villeta se describe por primera vez en esta región seroprevalencia en animales domésticos, incluyendo caninos y equinos. Estos datos obtenidos tanto en humanos como animales nos indican la circulación de especies de *Rickettsias* en la zona (15). Para el 2015 se reporta el aislamiento de *Rickettsia rickettsii* en el vector *Amblyomma patinoi* y se realiza la descripción de especies de rickettsias en *Amblyomma cajennense* (16-17). Se han realizado estudios de caracterización de paisaje incluyendo variables climáticas de la zona tratando de entender y unir estas características ecológicas con la presentación de casos clínicos.

Por otro lado en la zona del Urabá Antioqueño, que como se mencionó previamente se presentaron brotes ocasionados por *Rickettsia rickettsii*, se han realizado estudios de seroprevalencia, en Necoclí, con un porcentaje de 44.1% (18), se ha reportado la amplificación del gen *gltA* de *Rickettsia* del hígado de roedores la cual mostró una similaridad del 98.7% con *R. prowazekii* y en larvas de *Amblyomma* sp con una similaridad mayor al 99% para *R. tamurae*. En esta zona se ha demostrado la infección de *Amblyomma ovale* por *Rickettsia* sp cepa Atlantic rainforest Colombia (19).

De la misma forma, se han descrito casos similares de fiebre manchada de las Montañas Rocosas en diversas partes de todo el planeta, y cada vez son más los países latinoamericanos que reportan casos humanos de rickettsiosis, sugiriendo que se trata de una enfermedad que no ha sido tomada en cuenta en el diagnóstico diferencial de las enfermedades febriles en nuestras comunidades (20).

Rickettsias del grupo de tifo: tifo murino y epidémico

El tifo murino puede ocurrir como una entidad epidémica o con una alta prevalencia en ciertas regiones geográficas (21). La enfermedad puede ser grave, aunque la mortalidad es inferior al 2%. La asociación de esta infección con pulgas de ratas y de gatos está muy bien establecida. Sin embargo, el tifo murino puede ocurrir en lugares donde estas pulgas no se encuentran; es así que el ciclo clásico rata-pulga-rata ha sido reemplazado por animales peri-domésticos y sus pulgas (3-4).

El tifo epidémico o tifo transmitido por el piojo del cuerpo (*Pediculus humanus corporis*) ocurre casi siempre en epidemias explosivas que afectan una gran proporción de la población susceptible. Las epidemias se encuentran asociadas con condiciones de pobreza, guerra, hacinamiento y mala higiene personal, puesto que favorecen la persistencia del piojo del cuerpo humano (3).

Grupo del tifo murino en Colombia

Desde 1918 a 1922 el Dr Patiño –Camargo llevó a cabo una descripción de 67 casos clínicos compatibles con enfermedad tifoidea en Bogotá, en donde se pudo identificar el “virus” en el modelo animal a partir de sangre de pacientes compatibles clínicamente con tifo y a partir de piojos de estos pacientes. Para 1940 y 1941 el Dr Patiño Camargo fue el encargado de confirmar casos de tifo por medio de pruebas serológica y por inoculación en cobayos (21).

En la actualidad, en Colombia todos los casos de tifus murino se han reportado en Caldas; el número de casos en este departamento, supera ampliamente los datos descritos en la literatura internacional; desde el año 1992, en este departamento, se han notificado 100 casos o más por año. Un estudio previo realizado en el 2006 por Hidalgo y Col, indicó la presencia de la enfermedad en el Norte del Departamento de Caldas (22). Para el 2013 se realizó un estudio en 7 municipios del norte del departamento para conocer la seroprevalencia contra *Ryckettsia typhi* y *Rickettsia felis* un nuevo agente, sospechoso de causar la fiebre transmitida por la puga del gato, se reportó entonces una seroprevalencia del 25.2% para *R. typhi* y del 17.8% para *R. felis*. También es este artículo se muestra la presentación de 9 casos confirmados por seroconversión en muestras pareadas (Dos casos de tifo murino, un caso de infección por *R. felis*, un caso como rickettsiosis transmitida por pulga y cinco casos como Rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas) (23). Es esta misma región fueron capturadas especies de pulgas como *son Ctenocephalides felis*, *C. canis* y *Pulex irritans* en las cuales encontramos una tasa de infección con *R.felis* del 5,3%, 9,2% y 10% respectivamente (24).

En la actualidad los estudios en Caldas se han ampliado a todo el departamento para tener un panorama más completo incluyendo estudio de Rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas y variables ambientales y ecológicas.

Los últimos estudios realizados en Colombia, tanto en rickettsias del grupo de las fiebres manchadas como del grupo de tifo han logrado establecer una línea de base marcando el camino a seguir, lo que implica que los estudios posteriores sean todo un reto debido a la complejidad de las enfermedades y al hecho de que estas aún no sean parte de las enfermedades prioritarias en Salud Pública en nuestro país. Los estudios posteriores deberán estar enmarcados en conceptos de una salud y en el concepto de la interdisciplinariedad para que los profesionales de diferentes áreas puedan aportar al entendimiento de las rickettsiosis en Colombia.

Referencias

1. Labruna M, Mattar S, Nava S, Bermudez S, Venzal J, Dolz G, Abarca K, Romero L, de Sousa R, Oteo J, Zabala J. Rickettsiosis en América Latina, el Caribe, España y Portugal. *Revista MVZ Córdoba* 2011; 16 (2): 2435-2457.
2. Fuxelius H, Darby A, Min C, Cho N, Andersson S. The genomic and metabolic diversity of *Rickettsia*. *Research in Microbiology* 2007; 158: 745-753.
3. Raoult D, Parola P. *Rickettsial diseases*. Primera edición. Editorial Informa Healthcare. New York. 2007, 400p.
4. Renvoise A, Mediannikov O, Raoult D. Old and new tick – borne rickettsiosis. *International Health* 2009; 1: 17-25.
5. Hidalgo M, Faccini A, Valbuena G. Rickettsiosis transmitidas por garrapatas en las Américas: avances clínicos, epidemiológicos y retos en el diagnóstico. *Biomedica* 2013; 33: suplemento 1.
6. Valbuena G, Walker DH. Infection of the endothelium by members of the order Rickettsiales. *Thromb Haemost*. 2009;102:1071-9
7. Walker DH, Ismail N. Emerging and re-emerging rickettsioses: endothelial cell infection and early disease events. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6:375-86.
8. Patino L., Afanador A., & Paul JH. A spotted fever in Tobia, Colombia. *Am J Trop Med* 1937;17: 639-653.
9. Miranda AM., Florez S., & Mattar S Alta seroprevalencia de rickettsiosis en trabajadores del campo en el municipio de Ciénaga de Oro, Córdoba. *Inf Quinc Epidemiol Nac* 2002; 7:72-75
10. Hidalgo M, Orejuela L, Fuya P, Carrillo P, Hernandez J, Parra E, Keng C, Small M, Olano JP, Bouyer B, Castaneda E, Walker D, Valbuena G. Rocky Mountain Spotted Fever, Colombia. *Emerging Infectious Diseases*.2007;13:1058- 60.
11. Acosta J, Urquijo L, Díaz A, Sepúlveda M, Mantilla G, Heredia D, González M, Parra E, Rey G, Múnera G, Hidalgo M, et al. Brote de rickettsiosis en Necoclí, Antioquia, febrero a marzo de 2006. *Inf Quinc Epidemiol Nac* 2006;11:177-86
12. Pacheco E, Giraldo M, Martínez M, Hidalgo M, Galeano A, Echeverri I, Echevarria L et al Estudio de brote febril hemorrágico en el corregimiento de Alto de Mulatos - Distrito Especial Portuario de Turbo, Antioquia, enero de 2008. *Inf Quinc Epidemiol Nac* 2008;13:145-51
13. Hidalgo M, Miranda J, Heredia D, Zambrano P, Vesga JF, Lizarazo D, Mattar S, Valbuena G. Outbreak of Rocky Mountain spotted fever in Córdoba, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106:117-8.
14. Hidalgo M, Sánchez R, Orejuela L, Hernández J, Walker D, Valbuena G. Prevalence of Antibodies Against Spotted Fever Group Rickettsiae in a Rural Area of Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;77:378–380
15. Hidalgo M, Vesga JF, Lizarazo D, Valbuena G. A survey of antibodies against *Rickettsia rickettsii* and *Ehrlichia chafeensis* in domestic animals from a rural area of Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80:1029-30
16. Faccini-Martínez ÁA, Costa FB, Hayama-Ueno TE, Ramírez-Hernández A, Cortés-Vecino JA, Labruna MB, Hidalgo M. *Rickettsia rickettsii* in *Amblyomma patinoi* ticks, Colombia. *Emerg Infect Dis*. 2015;21:537-9.

17. Faccini-Martínez AA, Ramírez-Hernández A, Forero-Becerra E, Cortés-Vecino JA, Escandón P, Rodas JD, Palomar AM, Portillo A, Oteo JA, Hidalgo M. Molecular Evidence of Different Rickettsia Species in Villeta, Colombia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2016;16:85-7.
18. Padmanabha H, Hidalgo M, Valbuena G, Castañeda E, Galeano A, Puerta H, Cantillo C, Mantilla G. Geographic Variation in Risk Factors for SFG Rickettsial and Leptospiral Exposure in Colombia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2009;9:483-90
19. Londoño A.F, Diaz FJ, Valbuena G, Gazi M, Labruna M, Hidalgo M, Mattar S, Contreras V, Rodas JD. Infection of *Amblyomma ovale* by *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest, Colombia, *Ticks and Tick-borne Diseases* 2014 ;5:672-5.
20. Labruna MB. Ecology of rickettsia in South America. *Ann N Y Acad Sci.*2009; 1166:156-66
21. Patiño LB, Faccini Martinez A, Garcia Botero C, Hidalgo M. Contributions To Rickettsioses Research In Colombia (1917-1943). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2016;58:33.
22. Hidalgo M, Salguero E, de la Ossa A, Sánchez R, Vesga JF, Orejuela L, Valbuena G. Murine Typhus in Caldas, Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 2008;78:321–322
23. Ramírez-Hernández A, Montoya V, Martínez A, Pérez JE, Mercado M, de la Ossa A, Vélez C, Estrada G, Correa MI, Duque L, Ariza JS, Henao C, Valbuena G, Hidalgo M. Molecular Detection of *Rickettsia felis* in Different Flea Species from Caldas, Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;89:453-9.
24. Hidalgo M, Montoya V, Martínez A, Mercado M, De la Ossa A, Vélez C, Estrada G, Pérez JE, Faccini-Martínez AA, Labruna MB, Valbuena G. Flea-borne rickettsioses in the north of Caldas province, Colombia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013;13:289-94

Helicobacter pylori: un ejemplo de medicina traslacional en Gastroenterología

Alba Alicia Trespalacios

Bacterióloga y Laboratorista Clínica. MSc, PhD. Directora de Posgrados. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

La medicina traslacional consiste en aplicar los descubrimientos generados durante la investigación en el laboratorio o estudios preclínicos para mejorar el manejo, diagnóstico o prevención de una enfermedad; es así como el conocimiento adquirido en la investigación básica tiene efecto en la práctica clínica. Por ello la integración y diálogo entre estos saberes y la apropiada aplicación de estos conocimientos en el cuidado de los pacientes (1). La medicina traslacional es una continuidad de la medicina basada en la evidencia, con la aplicación integrada de la genómica, proteómica, farmacología, biomarcadores y tecnologías clínicas que amplían el conocimiento fisiopatológico de las enfermedades humanas. El concepto de medicina traslacional parece ser un objetivo claro de definir, pero difícil de conseguir (2). Conceptualmente se regresa a la medicina antigua donde todo se basaba en la evidencia experimental, el médico estudiaba al paciente, a su enfermedad, recetaba, diseñaba tratamientos adecuados para su paciente en base a sus estudios y prácticas (3). Sin embargo, a pesar de lo pertinente de este concepto, el desarrollo de la medicina traslacional en países en vía de desarrollo no ha sido fácil

de implementar, particularmente debido a que algunos sectores se resisten a la idea por su alto costo y por el temor de redirigir recursos económicos escasos a estas nuevas disciplinas, es así como la investigación traslacional requiere de hospitales con recursos suficientes, donde se concentren pacientes, datos, infraestructura y tecnología, para que los investigadores realicen ensayos clínicos en colaboración con grupos interdisciplinarios cooperativos (4); esto conlleva a repesar la educación de carreras de la salud en donde se incorpore la medicina traslacional en los niveles de formación de pregrado como de posgrado y así dar cuenta de las nuevas necesidades que el sector requiere. En concordancia con estas necesidades se percibe también la necesidad de ir más allá de las asignaturas tradicionales e incorporar en los currículos temáticas como la genómica, proteómica, metabolómica, medicina regenerativa, terapia génica, farmacogenética, nanotecnología y bioinformática entre otras (5, 6). Con ello se podrá crear una masa crítica de clínicos con capacidad de interactuar con investigadores del área básica y que en equipo sean capaces de resolver preguntas pertinentes que contribuyan al avance de la ciencia y la salud con el fin único de beneficiar a pacientes y la población en general (7). Una de las consecuencias más importantes a la que dará paso la aplicación de la ciencia básica a la clínica es el desarrollo de la medicina personalizada.

En el caso de enfermedades infecciosas, la medicina personalizada viene entrando cada vez más en uso y particularmente útil en el manejo de infecciones causadas por microorganismos multiresistentes en donde la selección de tratamientos exitosos en la erradicación de la infección son un actual reto para bacteriólogos como clínicos. En gastroenterología; el descubrimiento de *H. pylori* ha cambiado completamente el manejo de las enfermedades gastroduodenales (8). El tratamiento de la infección consiste básicamente en la erradicación de la bacteria, en donde los regímenes de erradicación más utilizados consideran la combinación de un inhibidor de la bomba de protones (IBP) y dos antimicrobianos entre los cuales los más usados actualmente son amoxicilina, claritromicina o metronidazol, sin embargo; debido a la resistencia de *H. pylori* a metronidazol y claritromicina, muchos pacientes que reciben tratamiento con terapias triples fallan en erradicar la infección en un 20 – 30 %. La selección de la terapia antimicrobiana en las enfermedades infecciosas se fundamenta en los resultados de pruebas de susceptibilidad; sin embargo el tratamiento de *H. pylori* difiere de la mayoría de infecciones comunes porque el cultivo y las pruebas de susceptibilidad no se realizan; por lo tanto el tratamiento de la infección es empírica (9); sin embargo la resistencia de *H. pylori* a los antimicrobianos es un factor muy importante en el manejo de la infección y la determinación de la resistencia antes de seleccionar la terapia de erradicación debería ser mandatorio. En Colombia no se realizan cultivos ni pruebas para la determinación de la resistencia, las pruebas convencionales como el E-test o la dilución en agar son técnicas costosas, requieren entrenamiento especial de los profesionales que la realizan y toman alrededor de dos a tres semanas antes de obtener el resultado, lo que no permite que sean implementadas

como pruebas de rutina. Recientemente, se ha propuesto que la detección de mutaciones relacionadas con la resistencia de *H. pylori* a claritromicina y levofloxacina, pueden ser una buena alternativa para determinar la resistencia de la bacteria a los antimicrobianos utilizados en las terapias de erradicación. Es así como en la línea de investigación “Caracterización molecular de *H. pylori*, del Grupo de Enfermedades Infecciosas de la Pontificia Universidad Javeriana” hemos logrado caracterizar los mecanismos moleculares de resistencia de la bacteria a antimicrobianos como claritromicina, amoxicilina, levofloxacina, metronidazol, furazolidona y tetraciclina, generando desarrollos que permiten la detección rápida por técnicas de biología molecular de las mutaciones relacionadas con resistencia a los antibióticos y así ofrecer una estrategia diagnóstica rápida que permita al gastroenterólogo seleccionar los antibióticos para el tratamiento y exitosa erradicación de la infección (10, 11). La resistencia bacteriana no es el único factor que debe controlarse para obtener éxito terapéutico; como se indicó anteriormente las terapias de erradicación contienen un IBP (ej. Omeprazol, ezomeprazol) que es usado para suprimir la secreción de HCl en el estómago. Este medicamento es metabolizado principalmente por el sistema enzimático citocromo CYP2C19 (7,8). Que es codificado por un gen polimórfico que determina 4 tipos de metabolizadores de IBP: ultrarápido, rápido, intermedio y lento; la implicación clínica de este último polimorfismo es que al metabolizar “rápidamente” el IBP, las dosis estándar de los mismos no logran suprimir adecuadamente la secreción de ácido y las terapias de erradicación de *H.pylori* serán menos eficaces aunque el microorganismo sea sensible a los antibióticos (12, 13). Es por ello la importancia del enfoque en la medicina personalizada, que permita conocer los perfiles de susceptibilidad de la bacteria así como los polimorfismos de CYP2C19 y de esta manera seleccionar la dosis de IBP que garantice que los antibióticos no se degraden rápidamente en el estómago así como los antibióticos a los que la bacteria sea susceptible, superando los errores que se cometen con el uso de las terapias empíricas que en nuestro medio tan solo logran curar al 70 % de los individuos que los reciben y contratándolo con las terapias personalizadas que logran erradicar la infección en el 98% de los pacientes, esta es una estrategia que de implementarse podría no sólo erradicar la infección sino prevenir el desarrollo u avance de las enfermedades asociadas a la infección como lo son las úlceras pépticas, gastritis atrófica, metaplasia y cáncer gástrico. Por lo tanto, en un país como Colombia en donde el cáncer gástrico constituye la primera causa de muerte por cáncer es importante buscar herramientas diagnósticas que guíen a la selección del mejor tratamiento y que en lo posible permitan trasladar los resultados obtenidos en investigación básica a clínicos y pacientes.

Referencias

1. Melcon MO y Cristina C. (2014). Medicina traslacional - Editorial. Neurol Arg.;6(4):183
2. Bermejo J, Heras M, Segovia A. (2009). Medicina cardiovascular traslacional ahora o nunca. Rev Esp Cardiol: 62: 66-8
3. Marquez CH. (2009) Futuro de la medicina traslacional en cáncer. Cancerología 4:7-8)

4. Saenz C, Saenz M, Saenz R. (2011). Medicina traslacional. Del laboratorio a la clínica y de la clínica a la acción. Gastroenterología latinoam; Vol 22, N 3: 263-264)
5. Sanz Alonso MA, Moscardo García F. (2012). La medicina traslacional y el perfil clínico de las innovaciones en Oncohematología, barreras para su implementación en un servicio hospitalario. Medical Economics. Instituto Roche.
6. Rodés J. (2007). La experiencia del Hospital Clinic de Barcelona: Integración Facultad de Medicina-IDIBAPS-Hospital Universitario. Educación Médica 10 n.4 Barcelona. Dic.
7. Woolf SH, (2008) The meaning of traslational research and why it matters. JAMA: 299(2):211-213
8. Marshall, B. J., Warren, J. R. & Goodwin, C. S. (1989). Duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. *Lancet* 1, 836-837.
9. Rimbara, E., Fischbach, L. A. & Graham, D. Y. (2011). Optimal therapy for *Helicobacter pylori* infections. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8, 79-88.
10. Trespalacios, A. A., Otero, W. & Mercado, M. M. (2010). Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. *Rev Col Gastroenterol* 21, 31 - 38.
11. Trespalacios AA, Rimbara E, Otero W, Reddy R, Graham DY. (2015). *Diagn Microbiol Infect Dis.* Apr;81(4):251-5.
12. Chaudhry AS, Kochhar R, Kohli KK. (2008). Genetic polymorphism of CYP2C19 & therapeutic response to proton pump inhibitors. *Indian J Med Res.*127: 521-530.
13. Furuta T, Sugimoto M, Shirai N, Ishizaki T. (2007). CYP2C19 pharmacogenomics associated with therapy of *Helicobacter pylori* infection and gastro-esophageal reflux diseases with a proton pump inhibitor. *Pharmacogenomics.* 8(9):1199–121

MICROBIOLOGÍA APLICADA

Biotecnología: el aporte desde la Bacteriología

Ruth Mélida Sánchez Mora

Bacterióloga y Laboratorista Clínica, MSc-PhD. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Facultad Ciencias de la Salud. Programa Bacteriología. Bogotá.

La Sociedad española de Biotecnología define esta ciencia como: “*La utilización de organismos vivos o partes de los mismos, para obtener o modificar productos, mejorar plantas o animales o desarrollar microorganismo para objetivos específicos*”.

El Convenio sobre diversidad biológica, Artículo 2.PNUD 1992, la define como “*Toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos proceso para usos específicos*”.

Una de las definiciones más aceptadas es la de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, que la subraya como “*la aplicación de la Ciencia y la ingeniería a la elaboración de materiales por agentes biológicos, con el fin de suministrar bienes y servicios*”.

Sus inicios proceden de culturas ancestrales, de hace más de 7000 años, por ejemplo, en el uso de levaduras para la elaboración del pan, y de la cerveza, en la producción de alimentos fermentados como el queso, el yogur, y de numerosos derivados de la soja, también en la selección y aprovechamiento de diferentes variedades de plantas y animales de interés agrícola y ganadero, así como en el procesamiento de hierbas para uso medicinal. Sin embargo, desde que Pasteur planteó el papel de los microorganismos y su importancia para el bienestar del hombre, el estudio de estos seres microscópicos abrió un campo interesante de ciencia aplicada que ha evolucionado y hoy en día fortalece el campo de la Biotecnología.

En la actualidad, su base es la ingeniería genética, que se ha desarrollado gracias a estudios realizados con diversos microorganismos, permitiendo el conocimiento más profundo de estos, así como el uso de sus productos génicos (enzimas, proteínas, ácidos nucleicos) y su actividad metabólica. De los microorganismos los más utilizados son las bacterias, tanto por sus propiedades bioquímicas como por su diversidad fisiológica y morfológica, y por ser de fácil crecimiento y cultivo en el laboratorio, incluso a gran escala en grandes tanques de fermentación, sin olvidar que presentan una gran versatilidad para la utilización de muy variados y diversos sustratos, aspecto este de gran importancia en biotecnología.

Dada la facilidad con que hoy se realiza la manipulación genética y la clonación molecular, el conocimiento de los genomas de los microorganismos ha permitido que estos sean utilizados de manera valiosa, gracias a la comprensión de sus características genotípicas y fenotípicas, lo que permite la obtención de productos con propiedades de interés para el hombre como la producción de compuestos de interés farmacológico, inmunológico, producción de bienes agrícolas e industriales entre otros.

Por qué las bacterias?

Se puede asegurar que el gran esfuerzo dedicado en épocas recientes al estudio de los diferentes aspectos de las bacterias, constituye una de las principales razones del rápido progreso de la biología molecular y, como consecuencia, de la moderna biotecnología.

Las bacterias presentan una amplia diversidad biológica, se encuentran prácticamente en todos los hábitats de nuestro planeta, y llevan a cabo transformaciones químicas que tanto plantas como animales no pueden realizar sin

su ayuda. Esta es la razón por la que han adquirido protagonismo y papel vital en las investigaciones biotecnológicas.

En los años cincuenta y sesenta, la bacteria *Escherichia coli* y sus fagos se constituyeron en los principales puntos de referencia para encuadrar los fenómenos biológicos a nivel celular y molecular debido al estudio de la estructura del ADN y al advenimiento de las enzimas de restricción. Hoy en día se conoce la secuencia de la cadena de ADN de un gran número de bacterias y se sabe que cuentan con suficiente material genético para codificar secuencias de aminoácidos correspondientes a unas 3.000 ó 4.000 moléculas de proteínas diferentes, siendo estos conocimientos suficientes para facilitar gran variedad de manipulaciones genéticas. Los datos sobre el metabolismo bacteriano permiten alterar a voluntad los mecanismos reguladores, orientándolos a la síntesis de aquellos productos más interesantes. La posibilidad de desarrollar mutantes súper productores de diferentes sustancias ha contribuido a su mayor revalorización, sobre todo al considerar los avances logrados en la identificación de las vías metabólicas y en el desarrollo de la ingeniería genética.

Otro aspecto interesante son los plásmidos o elementos genéticos circulares de ADN bicatenario super enrollado, los cuales se replican autónomamente en las bacterias, gracias a estos es posible introducir material genético exógeno en una célula microbiana y diseñar prácticamente a voluntad los pasos metabólicos que han de ser alterados para canalizar su metabolismo hacia la producción de una determinada sustancia de interés industrial.

Actualmente se estudian los problemas más complejos y difíciles del crecimiento y de la división celular utilizando bacterias, muchas de las cuales crecen en un medio simple y bien definido y se prestan a toda clase de estudios y usos en el laboratorio. Las levaduras y los virus, ofrecen también un gran interés dentro de la biología molecular y la biotecnología moderna, sobre todo al actuar como vectores de clonación en numerosos experimentos de ingeniería genética.

La Bacteriología un motor de la Biotecnología

La importancia del desarrollo de las colecciones de microorganismos, dado el enorme interés que poseen con fines científicos e industriales, ha llevado al surgimiento de áreas de conocimiento como la metagenómica, interactómica, proteómica entre otros, acompañadas de un conjunto de técnicas y herramientas de investigación que permiten el aislamiento de microorganismos no cultivables a partir de diferentes ambientes. En la actualidad solo el 1% de los microorganismos que habitan diferentes ambientes pueden ser estudiados por técnicas convencionales de microbiología, quedando alrededor del 99% de estos sin estudiar. Diferentes técnicas de biología molecular junto con herramientas de bioinformática se han desarrollado para realizar los estudios metagenómicos y analizar los datos que estos generan.

El uso creciente de los microorganismos para la producción de sustancias de interés industrial sólo puede tener éxito si se dispone de cultivos fiables y auténticos y por ello existe una conciencia cada vez más firme de que las colecciones proporcionan recursos y servicios que son una decisiva aportación al desarrollo de la biotecnología.

Biotechnología y Bacteriología: arcoíris de aplicaciones

La investigación y la industria hacen cada día más uso de la biotecnología como herramienta para los bioprocesos. Los múltiples usos de la Biotecnología han llevado a realizar una clasificación mediante un sistema de colores.

El color rojo, agrupa todos aquellos usos de la biotecnología relacionados con la medicina. Algunos ejemplos biotecnológicos corresponden al diseño de organismos para producir antibióticos en donde las bacterias desempeñan un papel muy importante, el desarrollo de vacunas y nuevos fármacos, los diagnósticos moleculares, las terapias regenerativas y el desarrollo de la ingeniería genética para curar enfermedades a través de la terapia génica.

El color verde, agrupa los avances en agricultura, donde se ha empleado el *Bacillus thuringiensis* como productor de insecticidas biológicos en cultivos de plantas agrícolas, árboles y plantas ornamentales. También se ha trabajado en: la obtención de plantas y animales transgénicos (*Agrobacterium tumefaciens*), la creación de nuevas variedades de plantas de interés agropecuario, el desarrollo de variedades con mejores propiedades nutricionales y la obtención de plantas que actúen como biofactorías productoras de sustancias de interés médico, biosanitario o industrial en cantidades fácilmente aislables y purificables.

El color azul, permite el aislamiento de moléculas con actividades enzimáticas útiles para diagnóstico e investigación, aumentando los estudios para la explotación de los recursos marinos, que ofrecen mayor biodiversidad, con el fin de generar productos y aplicaciones de interés industrial.

El color gris, va dirigido al medioambiente, busca el mantenimiento de la biodiversidad por medio del análisis genético de poblaciones y especies integrantes de ecosistemas, su comparación y catalogación. En este punto, es importante destacar la biorremediación, otro aspecto de gran valor dentro de la biotecnología gris, comprende los aspectos de biodegradación y biorreparación, y se refiere a la eliminación, mediante microorganismos, de hidrocarburos, productos tóxicos y otros compuestos contaminantes. También se trabaja en el tratamiento de las aguas residuales con la intensificación de actividades microbianas, controladas, de los procesos naturales de autopurificación. Algunas bacterias, como la *Alcaligenes eutrophus*, producen poliésteres lineales PHA, (polihidroxialcanoatos), por

fermentación del azúcar o de lípidos, compuestos que son usados en la industria de plásticos biodegradables. La obtención de metales a partir de minerales con escasos sulfuros metálicos solo es rentable si se aplica el proceso de biolixiviación, que es especialmente utilizado para la obtención de cobre, la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* es la más empleada en este proceso .

El color oro, agrupa la Bioinformática con sus aplicaciones en nanotecnología, microelectrónica y sistemas microelectromecánicos (MEMS); Micro Systems Technology (MST); Sistemas de nano-electromecánicos (NEMS). Si bien la bioinformática es más una herramienta que una aplicación en sí misma, la versatilidad del biotecnólogo para emplear las más modernas técnicas informáticas en aras de la comprensión de los problemas de gran complejidad biológica, lo han convertido en el profesional más demandado para esta nueva profesión.

El color marrón, Espacio y Geomicrobiología, propone estudiar el desierto y el espacio con el fin de encontrar nuevas moléculas de interés en ecosistemas tan poco investigados. La terraformación busca como ajustar las condiciones físico-químicas y geoquímicas a nuestras necesidades. ¿Y quién mejor que las bacterias para hacerlo? Es más, ¿y qué mejor que la biotecnología para diseñarlas?

Pruebas diagnósticas para confirmar el hiperadrenocorticismismo canino

Diana Marcela Salamanca Chaparro

Médica Veterinaria. MSc en Patología Clínica. Cali.

¿De qué dependerá el diagnóstico?

- 1) Aumento en la producción de cortisol
- 2) Disminución en la sensibilidad del feedback negativo del eje hipotálamo – pituitaria- adrenal.

Se debe tener presente que ninguna de las pruebas que existen actualmente es 100% precisa, ya que todas pueden tener falsos negativos. Por eso es recomendable realizar más de una prueba para confirmar o descartar la presencia de la enfermedad, sobre todo en animales sin signos clínicos clásicos de la enfermedad. Si un test es negativo pero aún hay sospecha de la enfermedad se le debe practicar otro test, si nuevamente es negativo debe considerarse que no tiene la enfermedad.

Ninguno de los Test sanguíneos puede predecir el tamaño del tumor de pituitaria, para esto se requiere pruebas de imagenología. Si el paciente no presenta signos clínicos evidentes no debe ser tratado basándose únicamente en los resultados de laboratorio.

Test más usados:

- A) Estimulación con ACTH
- B) Supresión con dexametasona a dosis bajas
- C) Cortisol/Creatinina en orina

Estimulación con ACTH:

Recomendado en pacientes con administración previa de glucocorticoides (HAC iatrogénico) y fenobarbital, también se utiliza en animales que tengan otra enfermedad ya que este es un test más específico. Se requiere solo una hora para su realización.

Protocolo:

La ACTH sintética hidrosoluble

1. Medición basal de cortisol
2. Suministrar vía endovenosa o intramuscular 0.25mg
3. Medición cortisol 1 hora después

Test de supresión con dexametasona a dosis bajas:

Este test tiene una alta sensibilidad, se sugiere cuando el animal no tiene antecedentes de recibir tratamiento con glucocorticoides y en los que se han descartado otras enfermedades. Este test en algunos pacientes puede diferenciar entre un problema primario de adrenales o hipofisario secundario. También está indicado si se tiene una alta sospecha de la enfermedad pero el test de estimulación con ACTH ha dado normal.

Cortisol/creatinina en Orina

Si esta prueba se combina con la supresión a dosis bajas con dexametasona puede llegar a diferenciar el tipo de HAC.

Ventajas: Es una prueba segura, fácil, altamente sensible y no es costosa.

Desventaja: la baja especificidad.

Protocolo:

- La muestra debe ser recogida en casa (evita el estrés)
- Preferiblemente la primera orina de la mañana (mitad del chorro)
- La muestra se centrifuga y se utiliza mínimo un mL del sobrenadante

Interpretación: Es una prueba que se utiliza específicamente para descartar la enfermedad, esto quiere decir que el ratio se encuentra elevado en la gran mayoría de perros con HAC. Sin embargo puede estar elevado hasta en un 80% en perros con otras enfermedades. Se recomienda no utilizar sólo esta prueba como prueba diagnóstica.

Test menos sensibles:

- a. Medición de fosfatasa alcalina
- b. Cortisol basal
- c. Test de supresión con dexametasona a dosis altas

Fosfatasa Alcalina: Es considerado el analito más sensible de la bioquímica de rutina. Determinada por la isoenzima de la FA inducida por corticoides. Sin embargo se ha demostrado que esta no es específica y puede estar incrementada en diabetes mellitus, en enfermedades hepáticas y en perros que están bajo tratamiento con anticonvulsivos. Un número importante de perros con HAC presentan niveles elevados de FA por encima de 1000-1500 U/L, sin embargo si esta no se encuentra elevada en un paciente sospechoso no se puede descartar el diagnóstico.

Test de Supresión con dexametasona a dosis altas: En perros con tumores adrenales la secreción de ACTH se encuentra suprimida por ende la dexametasona a cualquier dosis no disminuye la concentración de cortisol sérico. Sin embargo cuando el HAC es hipofisario, las altas dosis de dexametasona consiguen un grado de supresión.

Protocolo:

- Medición basal de cortisol
- Suministrar dexametasona vía endovenosa o intramuscular 0.1 – 1 mg/kg
- Medición 8 horas después

Interpretación: Supresión normal $<1.4 \mu\text{g/dL}$ confirma el diagnóstico de HAC, además descarta el HAC primario de adrenal La ausencia de supresión no confirma el diagnóstico de HAC primario debido a que algunos HAC hipofisarios no suprimen.

Cortisol Basal: El cortisol es secretado episódicamente y sus valores cambian a través del día. En caso de perros con HAC generalmente se encuentra elevado, aunque pueden llegar a verse mediciones normales, y en algunos casos pacientes normales pueden llegar a mostrar valores incrementados. Por ende esta no es una prueba diagnóstica fehaciente.

¿Cómo se encuentran los demás analitos del perfil bioquímico?:

ALT: Esta enzima suele estar incrementada (leve a moderada) en perros con HAC debido a que este causa una hepatopatía esteroidea por en exceso de acumulo de glucógeno en los hepatocitos.

Colesterol y Triglicéridos: Los esteroides estimulan la lipólisis favoreciendo la aparición de hiperlipidemia (hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia).

Urea: en la mayoría de casos no se encuentra alterada, pero debido a que los signos clínicos característicos del HAC son la Poliuria/Polidipsia, puede encontrarse disminuida secundaria a diuresis excesiva.

Glucosa: Esta se puede encontrar entre un valor alto normal en la mayoría de perros con HAC debido a que los glucocorticoides favorece la gluconeogénesis y provocan resistencia a la insulina.

Consideraciones Especiales:

Pruebas tiroideas: un gran porcentaje de perros con HAC tienen concentraciones bajas de T4 total, esto puede ser debido a una alteración en la afinidad entre las hormonas tiroideas y las proteínas transportadoras, un aumento del metabolismo de estas hormonas o una disminución en la secreción de TSH.

Fenobarbital: los efectos secundarios de este medicamento incluyen PD/PU y polifagia, además también causa incremento de la FA, por lo tanto puede haber sospecha de la enfermedad en animales que son tratados con este. La confirmación de la enfermedad en pacientes tratados es un reto diagnóstico. Aunque no parece haber efectos del fenobarbital sobre la prueba de supresión con dexametasona algunos pacientes no suprimen.

Referencias

1. FELDMAN EC, NELSON RW. Hyperadrenocorticism (Cushing's syndrome). In Canine and Feline Endocrinology and Reproduction, 2nd ed. Saunders, Philadelphia, 1996:187-265.
2. MELIÁN C, PÉREZ ALENZA MD, PETERSON ME, DÍAZ M, KOOISTRA H. Manual de endocrinología de pequeños animales. Multimédica ediciones veterinarias. Barcelona-España. 2008.
3. ETTINGER-FELDMAN. Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the Dog and Cat, 7 edition. Volumen 2. Elsevier Saunders, 2010.
4. DUNCAN-PRASSES, KENNETH S. LATIMER. Clinical Pathology Veterinary. fifth edition, Jhon Wiley & Sons, Inc.USA, 2011.
5. STOCKHAM SL. SCOTT MA.: Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. Second edition. Blackwell Publishing. Blackwell publishing, USA, 2008.

Tecnología HTD (hidro termo dinámica) en pasteurización y esterilización de alimentos

Luis Fernando Carvajal Osorio

Ingeniero de Alimentos, Especialista en Gerencia Estratégica de Alimentos y Bebidas. Manizales.

La tecnología HTD (hidro termo dinámica) es una única y revolucionaria tecnología usada para producir alimentos, bebidas, cosméticos, productos de aseo personal, biofertilizantes y productos farmacéuticos.

La tecnología HTD aprovecha y se enfoca en aplicar la energía creada por los fenómenos físicos; fricción turbulenta, cavitación inducida y controlada, donde los fluidos procesados integran operaciones, logrando ganancia de temperatura, nano-

molienda, homogenización, condiciones de pasteurización o esterilización, según los requerimientos deseados.

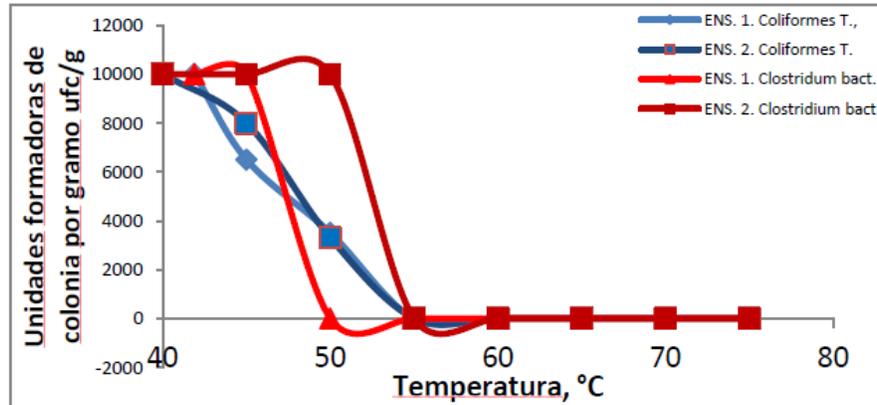
Lo anterior se logra al ser bombeado un fluido o sólidos en medio fluido a un mezclador especial el cual aumenta la velocidad, mientras disminuye la presión. Simultáneamente, chorros del mismo líquido se introducen dentro de la corriente principal a alta velocidad a través del diseño del equipo en las paredes mezcladoras, Al chocar las corrientes de líquido, estas causan considerables fuerzas cortantes los cuales hacen que el líquido hierva en frío debido a la baja presión (También llamada efecto cavitación). Esto conlleva a la creación de sitios de nucleación en la forma de micro burbujas las cuales son transportadas por el líquido aguas arriba mientras van creciendo sus tamaños en varios milímetros, Estas son llevadas a una zona de ensanchamiento, donde aumenta también la presión en el fluido y las burbujas decrecen y colapsan. Debido a las propiedades específicas del líquido, las burbujas colapsan asimétricamente, dando lugar a acumulación de chorros los cuales golpean las burbujas en sentido opuesto a su avance. Cualquier partícula sólida golpeada por estos chorros es destruida (Aplastada) mientras que la presión en la zona de colapso acumula decenas e inclusive cientos de bares de presión. La forma y el tipo de mezclador donde la tensión toma lugar previenen que el pulso ocasionado por la presión afecte sus paredes y así no cause destrucción en las superficies, impidiendo la Erosión del equipo. Tal impacto masivo con micro golpes es el causante de que el líquido incremente su temperatura, aplastando también partículas sólidas y así formando emulsiones y suspensiones. El reactor HTD usa la hidrodinámica, incluyendo la turbulencia y la cavitación, logrando que el producto se auto-caliente. Este enfoque permite distinguir nuestra tecnología de las demás convencionales y contribuye a una alta calidad del producto. La tecnología y los equipos HTD ahorran energía y recursos.

La capacidad de eliminar microorganismos por medio de la Tecnología HTD es atribuida a la acción conjunta de varios efectos físicos inducidos, como son: una variación brusca de alta presión y vacío; fuerzas mecánicas de choque que varían abruptamente durante el proceso provocando estrés sobre las membranas de los microorganismos, adicional en el momento de colapso de las microburbujas, existe una liberación de energía con gran incremento de temperatura que potencian la acción higienizante y como resultado una alta mortalidad de la población microbiana del fluido tratado.

Los productos obtenidos por la tecnología HTD incrementan generalmente las características organolépticas, pues es un sistema de proceso cerrado que no permite perdidas de elementos volátiles, intensificando así aromas y sabores, además, mantiene estables las propiedades nutricionales y en algunos casos las mejora, así mismo sucede con la digestibilidad de los productos procesados, al permitir romper cadenas de aminoácidos no digeribles por algunas personas.

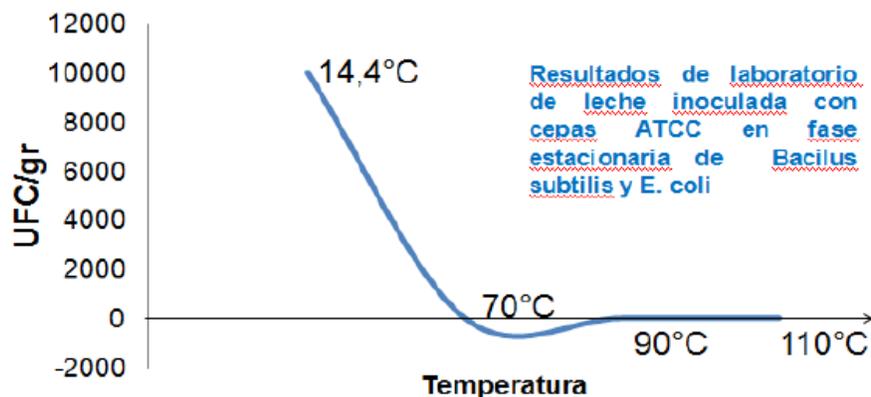
En pruebas realizadas a diferentes alimentos se ha podido validar la eficiencia de la tecnología en cuanto a la eliminación de carga microbiana, y el aumento de la vida útil, a continuación se presentan algunos ejercicios exitosos:

- Licor de gelatina: Se logra esterilidad del orden de un log-6 a 55°C, resultado de laboratorio para alimento inoculado con Coliformes totales, Clostridium y aguas residuales, con UFC/g incontables en muestra de partida. A continuación cinética de muerte térmica de microorganismos:



- Tratamiento de conservación a leche orgánica:

Cinética de muerte térmica de microorganismos procesados por HTD



- Se logra aumentar substancialmente la vida útil de la leche orgánica tratada por la tecnología HTD, sin uso de conservantes. A continuación se presenta los resultados obtenidos:

Análisis de vida útil leche entera tratada mediante la tecnología HTD *

°T max. proceso	Día 1	Día 4	Día 11	Día 20
70°C	(-) ✓	(-) ✓	(-) ✓	(-) ✓
°T max. proceso	Día 1	Día 15	Día 30	Día 60
90°C	(-) ✓	(-) ✓	(-) ✓	(-) ✓



* Proceso validado en el producto sin uso de conservantes

- Se ha logrado esterilidad comercial en leche achocolatada orgánica, sin uso de conservantes a 80°C.
- Esterilidad del orden del log-7 en pulpa de aguacate a 90°C.
- Resultados con crecimiento de cero unidades formadoras de colonias en los siguientes productos entre otros:
 - ✓ Pulpas de diferentes frutas tratadas a 60°C.
 - ✓ Cristales de Sábila tratados a 70°C.
 - ✓ Leche de Almendras tratada a 65°C.
 - ✓ Leches condensadas tratadas a 86°C.
 - ✓ Alimento húmedo de perros tratado a 100°C
 - ✓ Pasta de soya tratada a 105°C
 - ✓ Mezclas de cereales y leguminosas tratados a 90°C
 - ✓ Mezclas de cereales y frutas tratados a 65°C
 - ✓ Cernidos de frutas tratados a 70°C.

Perspectivas del uso de microorganismos para el manejo sanitario de explotaciones pecuarias e industriales

Patricia Eugenia Vélez Arango

Bacterióloga, MSc. Gerente Técnica Soluciones Microbianas del Trópico SAS. Manizales.

El uso de microorganismos para el control sanitario de insectos plagas y artrópodos que afectan las explotaciones pecuarias ha sido documentado en la literatura, con estudios de caso que relacionan la acción eficaz de estos agentes y su regulación continua a través del tiempo, cuando su empleo está enmarcado en programas de manejo integrado en los cuales se combinan herramientas de naturaleza agroquímica, control cultural, referido al manejo de variables de cultivo por parte del técnico que orienta la recomendación, y control biológico, mediante el uso de estos agentes de tipo microbiano.

En bovinos existen distintos parásitos externos que afectan a los animales en todas sus edades y causan distintas enfermedades que afectan la sanidad de los mismos y la producción, desencadenando pérdidas económicas que no hacen viables algunas explotaciones de carne o leche. Algunos de los parásitos externos como la garrapata *Boophilus* spp., y otras garrapatas de la familia Ixodidae, son hematófagos, causantes de anemias, transmisores de agentes patógenos, inhibidores de funciones de inmunidad y del apetito del animal, deterioro de las pieles, además transmiten enfermedades producidas por protozoos, bacterias y virus, que penetran por las perforaciones producidas en la piel y en algunos casos provocan la muerte por conducir a enfermedades agudas y crónicas (Vizcaíno 1992). En algunas empresas ganaderas se realizan controles periódicos de las garrapatas con agentes químicos, mediante baños dirigidos directamente sobre los animales, pero sin tener en cuenta los estadios o ciclos de vida de este parásito en las praderas y las repercusiones que conlleva el uso de estos agentes, al crear solo cierto grado de inmunidad del parásito hacia los mismos, trayendo como consecuencia brotes de otras enfermedades, y al generar resistencia de la garrapata a estos productos agroquímicos. Por lo tanto, se hace indispensable la evaluación de nuevos tratamientos a base de productos amigables con el ambiente, que no generen resistencia y no causen daño a la fauna benéfica involucrada en la regulación de este artrópodo.

De igual manera, existen otros insectos plagas que causan daños económicos a las explotaciones ganaderas, en cuanto afectan las pasturas y disminuyen significativamente la productividad animal. Entre estos, se destacan: el chinche de los pastos, que afecta actualmente la región de Ubaté, Cundinamarca, y otras regiones del país, el mión o salivazo de los pastos, la mosca de los establos, gusanos trozadores, insectos cortadores, insectos chupadores o saltahojas, insectos defoliadores, etc.

Las explotaciones avícolas y porcícolas también son susceptibles al ataque de insectos plagas que afectan su productividad y el manejo convencional de estos insectos plagas ha estado restringido al empleo de productos agroquímicos, algunos de alta toxicidad, con riesgos para los animales, operarios y riesgo de depósito de estos ingredientes activos en cauces de agua, instalaciones y producto para consumo humano. Aun cuando existen requerimientos de buenas prácticas de manejo de esas explotaciones, en muchos casos no se realiza seguimiento y control eficaz de estas condiciones, lo que se traduce en factores de riesgo, que no garantizan inocuidad de estos productos para el hombre.

Muchas empresas del sector agropecuario e industrial generan grandes cantidades de residuos, de naturaleza sólida y líquida, que no se disponen en forma adecuada, generando problemas sanitarios ligados a procesos de fermentación, olores y contaminación de cauces y ambiente. Actualmente, estas empresas están

avocadas al cumplimiento de la norma ambiental, con el pago de tasas retributivas, cuando no se soporta el cumplimiento de parámetros reglamentarios en los residuos generados, y el protocolo para su disposición adecuada.

La Microbiología y muy especialmente, la Biotecnología, entendida como el manejo técnico adecuado de los microorganismos para su utilización en diferentes áreas, y en este caso específico del sector agropecuario e industrial, con propósitos de regulación de insectos plagas y artrópodos, mitigación de contaminación ambiental a través del tratamiento biológico (bioremediación) de residuos de procesos, y su valorización final, en forma de abonos o alimento animal, adquiere gran relevancia en el mundo, en cuanto sus aplicaciones están enmarcadas en el concepto de sostenibilidad ambiental.

El objetivo primordial de esta presentación está centrada en la relación de experiencias de empleo de microorganismos, basadas en registros de literatura y experiencias propias, como resultado de procesos de investigación dirigidos a la regulación sanitaria de insectos y artrópodos de importancia pecuaria, y a los procesos de biotransformación de residuos agroindustriales, con aplicación a la producción de abonos sanitizados y enriquecidos con microorganismos biocontroladores, y forrajes técnicamente producidos, para alimentación animal.

Referencias

1. Proyecto "Ganadería Colombiana Sostenible". (2004). Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria. Disponible en: http://www.cipav.org.co/areas_de_investigacion/Ganaderia_colombiana_sostenible_que_es.htm. Consultado el: 15 de noviembre de 2013.
2. Vizcaíno, G. O. (1992). Enfermedades transmitidas por garrapatas y por dípteros hematófagos en: memorias I foro nacional sobre la situación nacional de garrapatas y moscas en la ganadería Asociación Nacional de Laboratorios de Productos Veterinarios Aprovet. Santafé de Bogotá. Julio 29, 1997.p.62-81.
3. Ellis, J., Bannink, I.K., Hindrichsen, R.D., Kinley, W.F., Pellikaan, N., Milora. (2016). The effect of lactic acid bacteria included as a probiotic or silage inoculant on in vitro rumen digestibility, total gas and methane production. *Animal Feed Science and Technology* 211 (61–74).
4. Cubero, J.; Rojas, A. (2010). Uso del Inóculo Microbial elaborado en finca en ensilaje de maíz. Valor Nutricional y Fermentativo. *Agronomía Costarricense*: 237-250.