



NÚCLEO BÁSICO
Revistas Científicas Argentinas

ByPC

ASOCIACIÓN
BIOQUÍMICA
ARGENTINA



Bioquímica y Patología Clínica

Revista de la Asociación
Bioquímica Argentina

Vol. 85 - Nº2

Mayo - Agosto de 2021

Ciudad de Bs. As. Argentina

ISSN 1515-6761 Ed. Impresa

ISSN 2684-0359 Ed. electrónica

Argentina desarrollará una vacuna contra el SARS-CoV-2.

La Dra. Juliana Cassataro dirige un equipo de investigación interdisciplinario que trabaja en el desarrollo de la primera vacuna argentina contra el COVID-19.

EDITORIAL

- Pág. 18 **Frente a la segunda ola**
Facing the second wave
 Geffner, Jorge Raúl

ARTÍCULOS ORIGINALES

- Pág. 19 **Paralelismo en inmunoensayos: dos abordajes aplicados a la determinación de anticuerpos anti - péptido deaminado de gliadina**
Parallelism in immunoassays: two approaches applied to the determination of anti-deamidated gliadin peptide antibodies
 Cárdenas Delgado, Víctor Manuel; Nuñez, Myriam
- Pág. 27 **Clima de seguridad del paciente percibido en tres laboratorios de análisis clínicos hospitalarios. Estudio de corte transversal**
Patient safety climate perceived in three hospital's clinical analysis laboratories. Cross-sectional study
 Carral, Pilar; del Valle, Marta Patricia; Serralunga, María Gabriela
- Pág. 35 **Diagnóstico molecular en biopsias de sarcoma de Ewing y rhabdiosarcomas pediátricos: experiencia en el Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez**
Molecular diagnosis applied to Ewing's sarcoma and alveolar rhabdomyosarcoma biopsies: experience at the "Dr. Ricardo Gutiérrez" Children's Hospital, Buenos Aires, Argentina
 Massone, Carla Antonella; Colli, Sandra; García Lombardi, Mercedes; De Matteo, Elena; Preciado, María Victoria
- Pág. 43 **Rabdomiólisis: causas y consecuencias de CPK elevada desde el laboratorio de análisis clínicos**
Rhabdomyolysis: causes and consequences of increased CK
 Steccone, Marina Andrea; Cattani, Alejandra; Imbelloni, Mariano Ivan
- Pág. 51 **Alteraciones neurológicas y su asociación con el estado inmunoviroológico en niños infectados con VIH: 20 años de experiencia**
Neurological abnormalities and their association with immunological status in HIV-infected children: 20 years of experience
 Fernández, María Eugenia; Prado, Damián; Sánchez, Ma. Florencia; Balbaryski, Jeanette; Gaddi, Eduardo; Barboni Graciela

REVISIÓN

- Pág. 58 **Bioquímica de la oxigenación hiperbárica**
Biochemistry of hyperbaric oxygenation
 Fraga, Pilar María Emilia; Jordá-Vargas, Liliana

PROGRAMA DE EDUCACIÓN CONTINUA

- Pág. 67 **Cursos A.B.A - Ciclo Lectivo 2021**



TAPA

Argentina desarrollará una vacuna contra el SARS-CoV-2

La Dra. Juliana Cassataro dirige un equipo de investigación interdisciplinario que trabaja en el desarrollo de la primera vacuna argentina contra el COVID-19. La fórmula de esta vacuna se basa sobre proteínas recombinantes, una tecnología similar a la usada en la vacuna contra la hepatitis B o el virus del papiloma humano (VPH).

Esta propuesta fue seleccionada y apoyada por la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación (Agencia I+D+i) en el marco de la Unidad Coronavirus, que integra junto con el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Nación (MINCYT) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Se trata de la primera iniciativa de este tipo en Latinoamérica.

El proyecto surgió con el objetivo de generar herramientas para prevenir la infección del SARS-CoV-2. Si bien esta vacuna no estará disponible en un plazo inmediato, realizar este desarrollo y, posteriormente, producir las dosis a nivel local presentará una ventaja futura en relación con el acceso a la vacuna, al costo y la logística del proceso de vacunación. Además, el grupo de trabajo de Cassataro plantea la factibilidad de la aplicación de esta futura vacuna como refuerzo o para inmunizar a personas que, por diferentes motivos, no puedan recibir las otras vacunas disponibles.

Este trabajo comenzó en junio del 2020, a partir del financiamiento otorgado por la Agencia I+D+i. En ese tiempo, no sólo se pudieron poner a punto las herramientas científicas y tecnológicas para este emprendimiento, sino también se avanzó en la fase de investigación preclínica, que está cerca de culminar. El equipo de trabajo compuesto por inmunólogos/os y virólogos/os, se prepara para la próxima etapa participando de reuniones con empresas argentinas y referentes de la Agencia I+D+i y MINCYT a fin de iniciar la producción del prototipo, que dé inicio a la fase clínica.

La iniciativa se desarrolla en el Instituto de Investigaciones Biotecnológicas de la Universidad Nacional de San Martín (IIB-INTECH); también se nutre de otras ideas y proyectos que contaron con el apoyo de la Agencia I+D+i. Un ejemplo de esto es la información que brindan los diferentes grupos de vigilancia genómica del SARS-CoV-2 como el trabajo dirigido por la Dra. Mariana Viegas, el cual propone brindar conocimiento actualizado sobre las diferentes variantes que circulan en nuestro país, en el marco del Consorcio Interinstitucional para la Secuenciación del Genoma y Estudios Genómicos de SARS-CoV-2. La información que brinda este consorcio es usada por el equipo de Cassataro, entre otras cosas, para conocer cómo será la respuesta inmune de esta futura vacuna a las diferentes variantes del virus que circulan en nuestro país.

COMISIÓN DE LA REVISTA

Director:

Dr. Fernando D. Brites

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

Secretaría Científica:

Dra. Fabrina Capecce

Hospital General de Niños Pedro Elizalde. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Comité Editorial:

Dr. Orlando Gabriel Carballo

Hospital General de Agudos Carlos G. Durand. Instituto Universitario, Hospital Italiano de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Dra. Isabel Desimone

Hospital Interzonal General de Agudos Evita, Lanús, provincia de Buenos Aires. Universidad Kennedy, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Dr. Jaime Kovensky

Hospital Dr. Arturo Umberto Illia, Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Carrera de Medicina, Universidad Nacional de la Matanza, provincia de Buenos Aires, Argentina.

Dr. Julián Verona

Hospital Municipal Subzonal Dr. Felipe Fossati. Balcarce, provincia de Buenos Aires, Argentina.

Lic. Débora Schmer Miranda [Español]

Lic. María Victoria González Eusevi [Inglés]

Secretarios Administrativos:

Sr. Gastón Goldberg

Sr. Jorge Signorelli

**ASOCIACIÓN
BIOQUÍMICA
ARGENTINA**
Fundada el 3 de
septiembre
de 1934

COMISIÓN DIRECTIVA

Presidente: Dra. Silvia B. González

Vicepresidente: Dra. Patricia Otero

Secretaria: Dra. Viviana Osta

Tesorera: Dra. Isabel Desimone

1º Vocal Titular: Dra. María José Rial

2º Vocal Titular: Dr. Eduardo Mormandi

3º Vocal Titular: Dra. María Rugiero

1º Vocal Suplente: Dr. Alberto Villagra.

2º Vocal Suplente: Dra. M. de la Paz
Domínguez

3º Vocal Suplente: Dra. Alejandra Svartz

COMISIÓN REVISORA DE CUENTAS

Titular 1º: Dra. Silvia Morilla

Titular 2º: Dra. Estella Meyer

Titular 3º: Dra. Silvia Cajiao

1º Vocal Suplente: Dra. Graciela Astarita

2º Vocal Suplente: Dra. Claudia Ayuso

COMISIONES INTERNAS

Prensa y Difusión

Presidente: Dra. Rocío Romero

Secretaria: Dra. Florencia Minotti

Vocales: Dr. Eduardo Mormandi

Dra. Fabrina Capecce

Certificación

Presidente: Dr. Alberto Villagra

Secretaria: Dra. Viviana Osta

Vocal: Dra. María José Rial

Cursos

Presidente: Dra. Silvia González

Secretaria: Dra. María Soledad Caldirola

Vocales: Dra. María José Rial

Dra. María de la Paz Domínguez

Dra. Alejandra Svartz

Dra. Liliana Maggi

Dra. Rocío Romero

Dra. Laura Colito

Comité Científico Asesor

Dra. Mónica Aixalá

Dr. Gloria Alvarez

Dra. Liliana Arias

Dra. Alicia Blanco

Dr. Orlando Gabriel Carballo

Dra. Silvia González

Dr. César Colino

Dr. Eduardo Mormandi

Dra. Raquel Osatinsky

Dr. Jorge Rey

Dra. María José Rial

Dra. Sandra Rozental

Dra. Gabriela Santiso

Dra. Nora Slobodianik

Premios y distinciones

Dra. Alicia Blanco

Dr. Fernando Brites

Dra. Nilda Fink

Dr. Néstor Litwin

Dra. Raquel Osatinsky

REGLAMENTO DE PUBLICACIONES

REVISTA BIOQUÍMICA Y PATOLOGÍA CLÍNICA

ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA

Bioquímica y Patología Clínica (ByPC), Revista de la Asociación Bioquímica Argentina, tiene el objetivo de difundir artículos inéditos y originales relacionados con aplicaciones de la bioquímica clínica en todas sus especialidades en el campo asistencial y de investigación clínica humana, así como en bioquímica animal y vegetal. ByPC está destinada a todos los profesionales de la salud interesados en estas áreas. ByPC se publica cuatrimestralmente en ambos formatos, impreso [ISSN 1515-6761] y electrónico [ISSN 2684-0359], sin costo para los autores y no posee propósitos comerciales.

La Comisión de Revista de ByPC está integrada de la siguiente manera:

Director:

Dr. Fernando D. Brites

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

Secretaria Científica:

Dra. Fabrina Capece

Hospital Pedro Elizalde, Ciudad de Buenos Aires. Ministerio de Salud. Buenos Aires, Argentina.

Comité Editor:

Dr. Orlando Gabriel Carballo

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

Dra. Isabel Desimone

Hospital Evita, Lanús, provincia de Buenos Aires. Universidad John F. Kennedy. Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

Dr. Jaime Kovensky

Hospital Arturo U. Illia, Ciudad de Buenos Aires. Universidad Nacional de la Matanza, provincia de Buenos Aires, Argentina.

Dr. Julián Verona

Hospital Dr. Felipe A. Fossati, provincia de Buenos Aires, Argentina.

Correctoras:

Lic. Débora Schmer Miranda [Español]

Lic. María Victoria González Eusevi [Inglés]

Secretarios Administrativos:

Sr. Gastón Goldberg

Sr. Jorge Signorelli

Los trabajos enviados a la Revista ByPC deben ser originales y no deben haber sido publicados o estar postulados simultáneamente en otras revistas u órgano de difusión científica nacional o extranjero, tanto en forma impresa como electrónica. Cabe mencionar que se encuentra absolutamente prohibido la copia textual de texto proveniente de otros artículos y para la detección de plagio la Revista utiliza el software plag.es. Para la preparación de manuscritos, se siguen los requerimientos del International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) disponible en <http://www.icmje.org>. Se pueden consultar guías para publicaciones en <http://www.equator-network.org>, en castellano en <http://www.espanol.equator-network.org>. Una vez aprobada la publicación del trabajo, ByPC retiene los derechos de su reproducción total o parcial. Quienes deseen reproducir material publicado en la revista deben solicitar permiso a ByPC. Igualmente, para incluir material de otras fuentes con derechos de autor en artículos a publicar en la revista, se debe obtener el correspondiente permiso, y adjuntar copia del mismo al artículo propuesto para publicación. Para mayor información respecto a los derechos de los autores, se recomienda consultar el documento disponible en: <http://www.accesoabierto.net/es/node/62>

1. Descripción del proceso de revisión y edición

La modalidad de revisión es por pares académicos a doble ciego. Específicamente, la Comisión de Revista realiza una primera evaluación del trabajo recibido y lo envía a 2 revisores ajenos a la Asociación Bioquímica Argentina, quienes deben ser especialistas reconocidos en el área de incumbencia del trabajo y no deben pertenecer a la misma institución de los autores ni guardar alguna relación conocida con los mismos. Los artículos son enviados a los revisores sin el nombre de los autores, lugar de trabajo, dirección de correspondencia, ni los agradecimientos. Los revisores reciben el trabajo completo acompañado de un formulario guía para la realización de la revisión con tópicos que la Comisión de Revista considera imprescindibles para elaborar el dictamen final. La evaluación efectuada por los revisores debe ser remitida a la Comisión de Revista dentro de los 30 días. El dictamen de los revisores es reservado, así como su identidad, y debe fundamentarse de modo explícito. En caso de discrepancia en el dictamen de los revisores, la Comisión de Revista acudirá a un tercer revisor que cumpla los mismos requisitos que los anteriores. El dictamen es decidido por la Comisión de Revista y es comunicado a los autores. Los resultados del dictamen pueden ser: a) Aceptación sin necesidad de modificaciones adicionales; b) Sugerencia de cambios mayores; c) Sugerencia de cambios menores; y d) Rechazo. Las críticas efectuadas al trabajo, así como un eventual rechazo deben estar debidamente justificados. Los resultados de la evaluación son inapelables. Los autores deberán responder a las sugerencias efectuadas en un plazo no mayor a 30 días, salvo que por la naturaleza de las mismas se requiera de más tiempo. En dicho caso, deberán solicitarlo específicamente al Comisión de Revista.

Una vez que el trabajo ha sido aceptado y se ha efectuado la comunicación a los autores, se procede a la corrección de estilo y ortográfica del mismo, tanto en castellano como en inglés. A continuación, se elabora la prueba de galera, la cual es enviada a los autores, junto con instrucciones para efectuar la corrección de la misma. Los autores cuentan con 5 días hábiles para devolver la prueba de galera corregida.

Posteriormente se procede a la publicación del artículo siendo el auto-archivo posible inmediatamente después (versión post-print corregida). El tiempo transcurrido entre la aceptación del trabajo y la publicación del mismo oscila entre 3 y 5 meses.

2. Requisitos para la remisión de manuscritos

- Doble espacio en todas las partes del manuscrito.
- Empezar cada sección o componente en una nueva página.
- Revisar la secuencia: título; autores; lugares de trabajo; datos del autor de correspondencia; resumen y palabras clave en castellano; título, resumen y palabras clave en inglés americano; introducción; materiales y métodos; resultados; discusión; agradecimientos, referencias bibliográficas, leyendas de las figuras; tablas; y figuras (cada uno en páginas separadas).
- Las ilustraciones no deben ser más grandes que 203 x 254 mm.
- Incluir los permisos para reproducir material publicado previamente o usar ilustraciones que pueden identificar a las personas.
- Incluir las transferencias de derechos de autor y otras solicitudes.

3. Carta

Carta dirigida al Director de la Revista en la cual se solicita la publicación del artículo. Debe contener el título del trabajo, categoría a la cual pertenece (ver ítem 4), nombre y apellido de todos los autores, dirección, teléfonos y dirección de e-mail del autor de contacto, una dirección de e-mail alternativa, una frase con valor de declaración jurada en la que se manifieste que el artículo cumple con todos los requisitos de publicación en ByPC, y que la última versión del manuscrito ha sido leída y aprobada por todos los autores.

La recepción de trabajos se realizará mediante el sistema OJS en la web oficial de la Revista ByPC: <http://revista.aba-online.org.ar/>. No se aplicarán cargos por el envío de artículos ni por procesamiento (APC).

Cualquier duda podrá despejarse ingresando al instructivo o solicitar asistencia a: revista@aba.online.org.ar o revistabypc.aba@gmail.com.

4. Categorías a las cuales deberán ser presentados los trabajos

- a) Artículos originales.
- b) Casos clínicos.
- c) Revisiones.
- d) Cartas al Editor.
- e) Informes.
- f) Guías o Consensos.

5. Preparación de los manuscritos

5.1. Generalidades:

El archivo deberá ser nombrado solamente con el apellido del primer autor y la leyenda "y col." si correspondiese [Ej.: Pérez y col]. El texto debe estar dividido en secciones con los títulos de Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión. Los artículos extensos pueden requerir subtítulos dentro de algunas secciones (especialmente en las secciones de Resultados y Discusión) para aclarar sus contenidos. Debe estar escrito en procesador de texto Word, en tamaño de página A4, con márgenes de al menos 25 mm, empleando letra Arial tamaño 12. Usar doble espacio, incluyendo la página del título, resumen, texto, agradecimientos, referencias bibliográficas, tablas individuales y leyendas. Numerar las páginas consecutivamente empezando con la página del título. Poner el número de la página en la esquina inferior derecha de cada página.

5.2. La primera página debe contener:

- a) El título que debe ser conciso pero informativo.
- b) El apellido y luego, separado por coma, los nombres completos de los autores, lo cual debe ir seguido de punto y coma, y los datos del siguiente autor. A continuación del nombre de cada autor, se debe colocar, a modo de superíndice, el número que haga referencia al lugar de trabajo al que pertenece dicho autor. El autor al cual debe ir dirigida la correspondencia debe ser destacado con un asterisco también a modo de superíndice [Ej.: Ramírez, Juan Carlos^{1*}; Benítez, Laura²; Romero, Mario³].
- c) Cada lugar de trabajo con el número asignado al autor correspondiente. No se deben emplear abreviaturas. Debe constar primero el nombre del servicio o laboratorio, luego el correspondiente al departamento y por último el de la institución, todo separado por comas y seguido de punto. A continuación, se debe incluir el nombre de la ciudad, la provincia y el país, también separados por comas y con punto final [Ej.: Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina].
- d) Nombre completo del autor responsable de recibir la correspondencia, su lugar de trabajo, la dirección postal, y la dirección de e-mail.

5.3. La segunda página debe contener:

- a) El resumen en castellano de no más de 250 palabras. Debe estar estructurado de la siguiente manera: introducción, objetivos, materiales y métodos, resultados y conclusiones. Se deben incluir dichos subtítulos de manera explícita. El resumen debe establecer los propósitos del estudio o investigación, procedimientos básicos (selección de los sujetos de estudio o animales de laboratorio; métodos de observación y analíticos), los hallazgos principales y las conclusiones más relevantes. Debería enfatizarse en los aspectos nuevos e importantes del estudio u observaciones. Se recomienda incluir los valores correspondientes a los hallazgos más relevantes acompañados de la forma de expresión de los mismos [Ej.: Media \pm D.E) y el tratamiento estadístico, si correspondiese. En el resumen no se deben utilizar abreviaturas.

- b) Palabras clave. Los autores deben colocar, e identificar como tales, tres a diez palabras clave o frases cortas que servirán para la indexación cruzada del artículo y deben ser publicadas con el artículo.

5.4. La tercera página debe contener:

- a) Título en inglés americano. Debe cumplir los mismos requisitos que el título en castellano.
- b) Resumen en inglés americano (Abstract). Debe cumplir los mismos requisitos que el resumen en castellano e incluir los siguientes subtítulos: *introduction, objectives, materials and methods, results y conclusions*.
- c) Palabras clave en inglés americano (Key words). Deben cumplir los mismos requisitos que las palabras clave en castellano.

5.5. Las páginas subsiguientes, comenzando cada sección en página aparte, deben contener:

- a) Introducción. En la introducción, se debe expresar el contexto o los antecedentes del estudio (por ejemplo, la naturaleza del problema y su importancia) y enunciar el propósito específico u objetivo de la investigación o la hipótesis que se pone a prueba en el estudio u observación. A menudo, la investigación se centra con más claridad cuando se plantea como pregunta. Tanto los objetivos principales como los secundarios deberán estar claros, y deberá describirse cualquier análisis de subgrupos predefinido. Se deben incluir sólo las referencias que sean estrictamente pertinentes y no añadir datos o conclusiones del trabajo que se presenta.
- b) Materiales y Métodos. Debe describir detalladamente los sujetos experimentales, el equipamiento, los reactivos y los procedimientos utilizados, con la inclusión de las marcas registradas cuando corresponda y referencias al utilizar métodos establecidos. Indicar las consideraciones éticas que correspondan si han participado en el estudio seres humanos (Aprobación por comités de ética y obtención de consentimiento informado). Se recomienda dividir la sección Materiales y Métodos mediante el empleo de subtítulos en el caso de ser demasiado extenso. Incluir una sección de "Análisis de datos" en la cual se describan las formas de expresión de los resultados y los métodos estadísticos empleados, si correspondiese. Estos deben ser descriptos con suficiente detalle para permitir que un lector experto con acceso a los datos originales pueda comprobar los resultados que se presentan. Cuando sea posible, cuantificar los hallazgos y presentarlos con los indicadores de medida de error o de incertidumbre adecuados [como los intervalos de confianza]. Evitar basarse únicamente en la comprobación de hipótesis estadísticas, como el uso de valores P, que no dan información sobre la magnitud del efecto. Siempre que sea posible, las referencias sobre el diseño del estudio y los métodos estadísticos deberán corresponder a manuales o artículos clásicos (con los números de página incluidos). Definir también los términos estadísticos, abreviaturas y la mayoría de símbolos. Especificar el *software* utilizado.
- c) Resultados. Presentar los resultados siguiendo una secuencia lógica en el texto, tablas e ilustraciones, y destacando en primer lugar los hallazgos más importantes. No repetir en el texto los datos de las tablas o ilustraciones; resaltar o resumir sólo las observaciones más importantes. Los materiales extra o suplementarios y los detalles técnicos pueden situarse en un anexo donde se puedan consultar para no interrumpir la secuencia del texto. Cuando los datos se resumen en este apartado, los resultados numéricos no sólo deben presentarse los derivados (por ejemplo, porcentajes), sino también los valores absolutos a partir de los cuales se calcularon, y especificar los métodos estadísticos utilizados para analizarlos. Limitar el número de tablas y figuras a las estrictamente necesarias para ilustrar el tema del artículo y para evaluar su grado de apoyo. Usar gráficos como alternativa a las tablas con muchas entradas; no duplicar datos en los gráficos y tablas. Evitar usos no técnicos de términos

estadísticos, como “azar” (que implica un dispositivo de aleatorización), “normal,” “significativo,” “correlaciones” y “muestra”. Cuando sea científicamente adecuado, incluir análisis en función de variables como la edad y el sexo.

- d) **Discusión.** Destacar los aspectos más novedosos e importantes del estudio y las conclusiones que de ellos se deducen, contextualizándolos en el conjunto de las evidencias más accesibles. No repetir en detalle datos u otro material que aparezca en la Introducción o en el apartado de Resultados. En el caso de estudios experimentales, es útil empezar la discusión resumiendo brevemente los principales resultados; a continuación, explorar los posibles mecanismos o explicaciones de dichos hallazgos, comparar y contrastar los resultados con los de otros estudios relevantes, exponer las limitaciones del estudio, y explorar las implicaciones de los resultados para futuras investigaciones y para la práctica clínica. Relacionar las conclusiones con los objetivos del estudio, evitando hacer afirmaciones rotundas y sacar conclusiones que no estén debidamente respaldadas por los datos. En particular, evitar afirmaciones sobre los costes y beneficios económicos a menos que el manuscrito incluya datos económicos con sus correspondientes análisis. Evitar afirmaciones o alusiones a aspectos de la investigación que no se hayan llevado a término. Cabe la posibilidad de establecer nuevas hipótesis cuando tengan base, pero calificándolas claramente como tales.
- e) **Agradecimientos.** Una o más declaraciones deben especificar (a) Las contribuciones que necesitan agradecerse pero que no justifican una autoría, tales como apoyo general por una jefatura de departamento; (b) Agradecimientos al apoyo técnico; (c) Agradecimiento al apoyo financiero y material, que debe especificar la naturaleza del apoyo; (d) Las relaciones que pueden tener un conflicto de intereses. Las personas que han contribuido intelectualmente al artículo, pero cuyas contribuciones no justifican una autoría, pueden ser mencionadas y sus funciones o contribuciones pueden ser descritas -por ejemplo, “asesor científico”, “revisión crítica de los propósitos del estudio”, “recolección de información” o “participación en el ensayo clínico”; tales personas deben haber dado sus permisos para ser mencionadas. Los autores son responsables de obtener los permisos escritos de las personas a quienes se agradece, porque los lectores pueden inferir su endosamiento de la información y conclusiones. La ayuda técnica debe ser agradecida en un párrafo aparte de los agradecimientos de otras contribuciones.

6. Aspectos que deben tenerse en cuenta en la redacción del manuscrito (Normas Vancouver actualizadas al 2016)

6. 1. Citas bibliográficas:

Es la presentación textual o resumida, de ideas expresadas por otros autores que sirven de apoyo al investigador, se contraponen a lo que él dice o aportan mayor información sobre un tema determinado. Las citas son un tipo de texto incrustado en otro texto.

Las citas en estilo Vancouver por lo general utilizan un sistema de secuencia numérica. Son numeradas consecutivamente en el orden de aparición en el texto. Se identifican con números arábigos entre corchetes, ejemplo [1].

a) Tipo de citas

- Cita directa: La que se transcribe textualmente. Ejemplo: “La cita textual breve, de menos de cinco renglones, se inserta dentro del texto entre comillas, y el número correspondiente se coloca al final, después de las comillas y antes del signo de Puntuación” [3].
- Cita corta: Menos de cinco renglones.
- Cita larga: Más de cinco renglones. Se escribe fuera del texto, dejando doble espacio y sangría, entre comillas y en bastardilla.
- Cita indirecta: Mención de las ideas de un autor con palabras de quien escribe. Se escribe dentro del texto sin comillas, el número de

la referencia se escribe inmediatamente después de citar su idea. Ejemplo: La mortalidad infantil conduce a empeorar la calidad de vida de Medellín [5].

b) Tipo de cita según redacción

- Cita integral: Es aquella donde el nombre del autor forma parte de la oración. El nombre se integra dentro del texto. El número de la referencia se escribe después del apellido del autor y antes de citar su idea. Ejemplos:
Como dice Londoño [5] la mortalidad infantil conduce a empeorar la calidad de vida de Medellín. Cita Indirecta
Según Sanz Pinyol [1] “Desde el punto de vista de la caracterización de los discursos, en el aula suelen producirse diferentes géneros” Cita directa
- Cita no integral: No se menciona el nombre del autor dentro del texto. Ejemplos:
É la mortalidad infantil conduce a empeorar la calidad de vida de Medellín [5]. Cita Indirecta
“Desde el punto de vista de la caracterización de los discursos, en el aula suelen producirse diferentes géneros” [1]. Cita directa

6. 2. Referencias bibliográficas:

- Conjunto de datos suficientemente detallados que permite identificar un documento. Deben ser numeradas consecutivamente en el orden en que son mencionadas en el texto. Identificar las referencias en el texto, cuadros y leyendas con números arábigos entre corchetes. Las referencias citadas sólo en los cuadros o en las leyendas de las figuras deben ser numeradas de acuerdo con la secuencia establecida por la primera identificación en el texto del cuadro o figura particular.
- Usar el estilo basado en los formatos utilizados por el US National Library of Medicine (NLM) en el Index Medicus. Los títulos de las revistas deben ser abreviados de acuerdo al estilo que utiliza el Index Medicus. Consultar la lista de revistas indizadas en el Index Medicus, publicado anualmente como una separata por la NLM y como una relación en el volumen del mes de enero del Index Medicus.
- Evitar el uso de los resúmenes como referencias. Las referencias a artículos aceptados pero no publicados deben ser designadas como “en prensa” o “en avance”; los autores deben obtener permiso por escrito para citar tales artículos así como la verificación de que ellos han sido aceptados para publicación. La información de los manuscritos remitidos pero no aceptados debe ser citada en el texto como “observaciones no publicadas” con el consentimiento escrito de los autores.
- No citar una “comunicación personal” a menos que proporcione información esencial no disponible de una fuente pública, en cuyo caso el nombre de la persona y la fecha de la comunicación deben ser citados entre paréntesis en el texto. Para los artículos científicos, los autores deben obtener permiso por escrito y confirmación de exactitud de la fuente de la comunicación personal.
- Las referencias deben ser verificadas por el autor o autores en los documentos originales.
- El estilo de Requisitos Uniformes (de Vancouver) se basa principalmente en el estilo estándar ANSI adaptado por la NLM para su base de datos.

a) Artículos de revistas

- Mencionar los seis primeros autores seguidos por et al (Nota: la NLM ahora menciona hasta 25 autores; si hay más de 25 autores, la NLM menciona los 24 primeros, luego el último autor seguido de et al): Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreaticobiliary disease. Ann Intern Med 1996;jun 1; 124 (11): 980-3.
Como una opción, si una revista lleva paginación continua a través de un volumen (como muchas revistas médicas lo hacen), el mes y el número del volumen pueden ser omitidos: Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreaticobiliary disease. Ann Intern Med 1996; 124: 980-3.

- Más de seis autores:
Parkin DM, Clayton D, Black RJ, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood leukaemia in Europe after Chernobyl: 5 year follow-up. *Br J Cancer* 1996; 73: 1006-12.
 - La organización como autor:
The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guide-lines. *Med J Aust* 1996; 164:2824.
 - Sin autor mencionado:
Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J* 1994; 84: 14.
 - Artículo no escrito en inglés:
Ryder TE, Haukeland EA, Solhaug JH. Bilateral inftapatellar seneruptur hos tidligere frisk kv-vinne. *Tdsskr Nor Laegeforen* 1996; 116: 412.
 - Volumen con suplemento:
Shen M Zhang QF. Risk assesement of nikel carcinogenicity and occupational lung cancer *Environ Health Perspect* 1994; 102 Suppl 1: 275-82.
 - Número con suplemento:
Paybe DK, Sullivan ME, Massie MJ. Women's psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol* 1996; 23 (1 Suppl 2. 89-97).
 - Volumen con parte:
Ozben T, Nacirharhan S, Tuncer N. Plasma and urine sialic acid in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem* 1995; 32 [Pt 3]: 303-6.
 - Número con parte
People GH, Mills SM. One Hundred consecutive cases of flap lacerations of the leg in ageing patients. *N Z Med J* 1994;107 (986 PH): 377-8.
 - Número sin volumen
Turan I, Wredmark T, Fellander-Tsai L. Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. *Clin Orthop* 1995; (320): 110-4.
 - Sin número, ni volumen:
Browell DA, Lennard TW. Immunologic status of the cancer patient and the effects of blood transfusion on antitumor responses. *Curr Opin Gen Surg* 1993; 325-33.
 - Compaginación en números romanos:
Fisher GA, Sikié BI. Drug in clinical oncology and hematology. Introduction. *Hematol Oncol Clin North Am* 1995 Apr 9(2): xi xii.
 - Tipo de artículo indizado tal como es requerido:
Enzensberger W, Fischer PA. Metronome in Parkinson's disease [carta]. *Lancet* 1996; 347 1337.
- Clement J, De Bock R. Hematological complications of hantavirus nephropathy (HVN) [resumen] *Kidney Int* 1992; 42: 1285.
- Artículo conteniendo una retractación:
Garcy CE, Schwarzman AL, Rise ML. Ceruloplasmin gene defect associated with epilepsy in EL mice [retraction de Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML. In: *Nat Genet* 1994; 6.: 426-31]. *Nat Genet* 1995,11: 104.
 - Artículo retractado:
Liou GI, Wang M, Matragoon S. Precocious IRBPgene expression during mouse development [retractado en *Invest Ophthalmo Vis Sci* 1994; 35: 31271. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 1083-8.
 - Artículo con errata publicada:
Hamlim JA, Kahn AM. Herniorraphy in symptomatic patients following inguinal hernia repair [publicado con errata en *West J Med* 1995; 162. 2781]. *West J Med* 1995; 162 28-31.
- b) Libros y otras monografías
- Autor [o autores] personal:
Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publisher; 1996.
 - El editor(es), compilador(es) como autor:
Norman IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York; Churchill Livingstone; 1996.
 - Una organización como autor y editor:
Institute of Medicine [US]. Looking at the future of the Medical program. Washington [DC]: The Institute; 1992).
- Un capítulo en un libro:
Phillips SJ, Whisnant JP Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Kaven Press; 1995. p. 465-78.
 - Libro de congreso:
Kimura J, Shibasaki H, editors. Recent advances in clinical neurophysiology. Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology; 199 Oct 1519; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier;1996.
 - Ponencia de un congreso:
Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degouler P, Piemme TE, Rienhoff O, editors MEDINFO 92 m Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10, Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.
- c) Informe científico o técnico
- Emitido por la agencia financiante o auspiciadora:
Smith P, Golladay K Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report Dallas (TX): Dept. of Health and Human Services (US), Office of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report N° HHSIGOEI69200860.
 - Emitido por la agencia ejecutante:
Field MJ, Tranquada RE, FeasleyJC, editors. Health services research: work force and educational issues. Washington: National Academy Press; 1995. Contract N°AHCPR282942008. Sponsored by the Agency for Health Care Policy and Research.
- d) Disertación
- Kaplan SJ. Post-hospital home health care; the elderly's access and utilization [dissertation]. St Louis (MO): Washington Univ; 1995.
- e) Patente
- Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors; Novoste Corporation, assignance. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5.529,067, 1995 Jun Material publicado.
- f) Artículo de periódico
- Lee G. Hospitalizations tied to ozone pollution: study estimates 5000 admissions annually. *The Washington Post* 1996; jun 21; Sect. A:3 [col5].
- g) Material audiovisual
- HIV+/AIDS: the facts and the future [videocassettel. St Louis (MO): Mosby-Year Book 1995.
- c) Material legal
- h) Ley Pública
- Preventive Health Amendments of 1993, PubL. N° 103-183,107Stat, 2226 [Dec. 14, 1993].
- i) Dispositivo no decretado
- Medical Records Confidentiality Act of 1995, S. 1360, 104th Cong. 1st Sess [1995].
- j) Código de regulaciones federales
- Informed Consent, 42 C.F.R. Sect. 441. 257 [1995].
- k) Material inédito
- En prensa o "en avance":
Leshner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. *N Eng J Med*. En prensa 1997
- l) Material electrónico
- Artículo de una revista en formato electrónico:
Morse SS. Factors in the emergence of infections diseases. *Emerg Infect Dis* [serial on line] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5], 1(1): [24 screens]. Available from: VRL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>.
 - Monografía en formato electrónico:
CDI, clinical dermatology illustrated [monograph on CD-ROM]. Reeves JRT, Malbach H, CMEA Multimedia Group, producers. 2nd ed. Version 20. San Diego: CMEA; 1995.
 - Archivo computarizado:
Hemodynamics 111: the ups and downs of hemodynamics [computer

program]. Version 2.2 Orlando (FL): Computerized Educational Systems; 1993.

7. Tablas

Todas las tablas deben agruparse a continuación de las leyendas de las figuras, cada una en página separada. Deberán estar numeradas secuencialmente con números romanos, contener un título y aclaraciones al pie de la tabla, si fuese necesario. Al pie de cada tabla debe figurar la aclaración de las abreviaturas empleadas, así como toda la información relacionada con la forma de expresión de los resultados y el tratamiento estadístico que los autores consideren necesaria. Las tablas deben ser comprensibles por sí mismas. Para la elaboración de las tablas, se recomienda utilizar el procesador de texto Word y seleccionar el Estilo de Tabla "Tabla básica 1".

8. Figuras

Todas las figuras deben agruparse a continuación de las tablas, cada una en página separada. Deberán estar numeradas secuencialmente con números arábigos. Las fotografías y las figuras podrán tener colores, aunque en el caso de las figuras el fondo debe ser blanco. El título de las figuras no debe incluirse junto a las mismas sino en la sección "Leyendas de Figuras". En dicha leyenda debe incluirse el título de la figura, la aclaración de las abreviaturas empleadas y toda la información relacionada con la forma de expresión de los resultados y el tratamiento estadístico que los autores consideren necesaria. En caso de figuras, fotografías o tablas tomadas de otra publicación, se debe citar la fuente y además enviar el permiso escrito otorgado por el propietario intelectual de dicho material para que el mismo sea publicado en ByPC.

9. Revisiones, cartas al editor, informes guías y consensos

Las revisiones, cartas al editor, informes guías y consensos serán usualmente solicitados por el Comité Editorial de la Revista a autores considerados expertos en el campo, la disciplina o la especialidad en cuestión. Sin embargo, serán consideradas para su publicación las que fueran enviadas espontáneamente. Deberán seguir los lineamientos expuestos para la publicación de artículos originales, con la diferencia de que su texto no necesitará contar con resultados y discusión. En el caso particular de las revisiones, deben contener un mínimo de 20 referencias bibliográficas completas y actualizadas a los fines del tema tratado.

10. Ortografía y formas de expresión

- Se debe evitar la utilización de palabras en otros idiomas y, cuando ello sea indispensable, deberán ser colocadas en itálica [Ej.: *in vitro*].
- El estadístico "p" debe ser escrito en minúscula.
- En la expresión de los resultados, se debe dejar espacio entre la cifras y los símbolos o las unidades [Ej.: $p < 0,05$; $32 \pm 2 \text{ g/l}$].
- Unidades: se deben emplear las unidades utilizadas más frecuentemente en nuestro medio para cada analito [Ej.: glucosa, urea, ácido úrico, lípidos, lipoproteínas, apoproteínas en mg/dl].
- Las abreviaturas deben ser aclaradas la primera vez que aparecen en el texto ubicándolas entre paréntesis, a pesar de que se trate de abreviaturas ampliamente conocidas [Ej. hemoglobina (Hb)]. A su vez, siempre deben ir seguidas de un punto.
- En la expresión de los resultados, tanto la media como la mediana deben contener la misma cantidad de decimales que sus respectivos desvíos estándar, errores, percentilos o rangos [Ej. $9,25 \pm 0,78$].
- En la expresión de los resultados, la separación entre el entero y los decimales se debe hacer mediante comas y no con puntos lo cual es propio del idioma inglés (3,25), excepto para el resumen en inglés (*Abstract*), en el cual se deben emplear puntos (3.25).
- En el texto, cuando un número aparece al principio de la oración, deberá ser escrito en letras [Ej. Veinte pacientes..].



Por favor, tenga a bien responder las siguientes preguntas por SI o por NO y realice todos los comentarios que justifiquen su respuesta. Si lo considera necesario, puede agregar otros ítems no incluidos en el formulario.

Sus comentarios serán remitidos al autor sin identificar la fuente y sus sugerencias serán de gran ayuda para éste y para los editores de la Revista.

Formulario Guía para la evaluación de manuscritos

SECCIÓN	SI/NO	COMENTARIOS		
Título				
¿Contiene el objeto de estudio y menciona las principales variables estudiadas?				
¿Emplea abreviaturas, acrónimos, símbolos o fórmulas poco conocidas?				
¿Es una representación breve y precisa del contenido del artículo?				
Introducción				
¿Están bien resumidos los antecedentes del tema de estudio y son pertinentes al mismo?				
¿Está claramente definido el objetivo principal?				
Materiales y métodos				
¿La población y / o muestra estudiada está claramente definida?				
¿Se menciona con claridad el diseño metodológico?				
¿Los métodos aplicados están desarrollados con claridad y suficientes detalles?				
¿El tratamiento estadístico es el adecuado?				
Resultados				
¿Los datos están bien presentados?				
¿Las tablas, las figuras y los gráficos son comprensibles?				
¿Existen tablas, gráficos o figuras que deban cambiarse, eliminarse o ser agregados?				
¿Existe duplicación de la información entre el texto, las tablas, las figuras y/o gráficos?				
Discusión				
¿Los resultados son adecuadamente discutidos?				
¿Se confrontan con referencias actualizadas de otros autores pertinentes?				
¿Existen errores de cálculo, interpretación u omisión?				
Conclusiones				
¿Las conclusiones se soportan en los datos obtenidos?				
¿Son correctas y acordes al objetivo planteado para este estudio?				
Referencias bibliográficas				
¿Se mencionan completamente todas las referencias bibliográficas citadas en el trabajo?				
¿Se consignan con el formato establecido para la revista?				
Modificaciones sugeridas y recomendaciones para el/los autor/es				
Comentarios exclusivos para el editor				
Dictamen	Aceptar <input type="checkbox"/>	Aceptar con cambios menores <input type="checkbox"/>	Aceptar con cambios mayores <input type="checkbox"/>	Rechazar <input type="checkbox"/>

Frente a la segunda ola

La Argentina transita hoy circunstancias excepcionalmente difíciles de cara a la segunda ola de la pandemia por SARS-CoV-2, que ya se ha instalado entre nosotros. En las últimas semanas, hemos experimentado un notable incremento en el número de contagios diarios, de consultas por casos sospechosos de COVID-19 y de internaciones hospitalarias. Partiendo de niveles que no han descendido por debajo de los 4000/5000 casos diarios, hoy enfrentamos números que alcanzan los 14000 contagios diarios y planillas que denuncian niveles de positividad en los estudios diagnósticos realizados por RT-PCR cercanos al 30 - 40%, sugiriendo muy fuertemente que el número real de contagios es notoriamente superior respecto de los casos cargados en el sistema SISA.

Un elemento agravante de la presente ola reside en la circulación comunitaria de nuevas variantes de SARS-CoV-2, particularmente, la variante británica y la variante P.1 surgida en la región de Manaos. Ambas se caracterizan por su mayor transmisibilidad y la mayor severidad en los cuadros clínicos que provocan. Más aún, la variante de Manaos parece mostrar una significativa capacidad para evadir la respuesta inmune inducida por la previa infección y, probablemente, por aquella inducida mediante diferentes vacunas en uso actualmente.

Nuestros países hermanos muestran un panorama similar o aún más grave que el nuestro. El colapso humanitario y sanitario en Brasil, la saturación de las unidades de cuidados intensivos en Paraguay y Chile y el tremendo incremento en el número de nuevas infecciones en Uruguay ilustran claramente esta situación. Si bien la comunidad científica internacional ha afrontado el desafío planteado por la pandemia de un modo sumamente eficiente, mediante el desarrollo de un conjunto de vacunas altamente seguras, inmunogénicas y eficaces, la tremenda inequidad internacional en el acceso a las mismas conspira contra el objetivo tan deseado de derrotar la pandemia y retornar a una cierta normalidad.

Hay debates pendientes que exigen hoy más urgencia que nunca. Entre ellos, los referidos a la exención de patentes y la necesaria transferencia de tecnología que permita incrementar sustancialmente la producción mundial de vacunas y salvar, en consecuencia, millones de vidas.

El actual escenario es realmente grave. Llegará el momento en el que deberemos realizar un balance de lo que hemos hecho bien y mal, en el terreno de nuestras asociaciones, institutos y universidades. Deberá ser este, un balance constructivo y a la vez riguroso. Mientras tanto, como profesionales de la salud, continuaremos aportando lo mejor de cada uno de nosotros en defensa de la salud pública y la vida.

Dr. Jorge Raúl Geffner

Investigador Superior del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Profesor Adjunto, Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología,

Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires (UBA).

ARTÍCULO ORIGINAL

Paralelismo en inmunoensayos: dos abordajes aplicados a la determinación de anticuerpos anti-péptido deaminado de gliadina

Parallelism in immunoassays: two approaches applied to the determination of anti-deamidated gliadin peptide antibodies

Cárdenas Delgado, Víctor Manuel^{1,2*}; Nuñez, Myriam³

¹Sección de Virología y Autoinmunidad, Laboratorio Mantel. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

²Cátedra de Fisiología Humana, Facultad de Medicina. Fundación Barceló. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

³Cátedra de Matemática, Departamento de Fisicomatemática, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*Contacto: Cárdenas Delgado, Víctor Manuel. Sección de Virología y Autoinmunidad, Laboratorio Mantel, Marcelo T. de Alvear 2263 CP 1122, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina; victor.cardenas@manlab.com.ar

Resumen Introducción: el análisis de paralelismo en un ensayo de ELISA examina si los calibradores se comportan como el analito endógeno frente a los inmunorreactantes del kit. Si la reactividad es comparable, es válida su aplicación con fines semicuantitativos en el área diagnóstica. Objetivo: analizar el paralelismo entre dos inmunoensayos comerciales ELISA como parte de un programa de verificación operativa para determinación de anticuerpos anti-péptido deaminado de gliadina de clase IgA e IgG (PDG-A y PDG-G). Materiales y métodos: se procesaron cuatro muestras: M1 a M4. Para el análisis del paralelismo entre 1) muestras y estándares y 2) muestras entre sí, se emplearon dos estrategias: en la primera, se ajustó un modelo logístico de 4 parámetros (4PL) a muestras y estándares para después linealizar los datos con la transformación Logit-Log. Luego, se comparó la similitud entre el coeficiente de Hill y la pendiente de las rectas por ANOVA. En el segundo enfoque, basado sobre el coeficiente de variación [CV], se analizó el paralelismo entre muestras. Usando diluciones seriadas de cada muestra, se interpolaron las densidades ópticas en la curva de calibración y se corrigió por factor de dilución: el nivel de anticuerpos obtenido debería ser consistente en el rango de diluciones explorado y no exhibir desviaciones por fuera de valores prefijados para un CV de 20%. Resultados: los dos abordajes fueron congruentes, M1 no reacciona de manera predecible con el kit PDG-A, mientras que M3 tampoco lo hace con el kit PDG-G. El análisis de las pendientes parece mostrar una sensibilidad exagerada en la detección de desvíos del paralelismo. Conclusiones: se recomienda dar prioridad a la evaluación gráfica de las curvas 4PL y abandonar el uso de las pruebas basadas sobre la hipótesis de similitud de parámetros en favor del método basado sobre el CV%.

Palabras clave: ELISA, inmunoensayo, paralelismo, diagnóstico, estándares.

Abstract Introduction: Parallelism analysis examines whether the calibrators behave in the same manner as the endogenous analyte against the immunoreactants kit. Once confirmed, the kit can be applied for semiquantitative purposes in the diagnostic field. Objectives: To analyze ELISAs parallelism as part of an operative verification program of two commercial immunoassays that quantitate anti-deamidated gliadin peptide antibodies of IgA and IgG class (DGP-A and DGP-G). Materials and methods: Four human samples termed M1 to M4 were processed. To analyze parallelism between samples and standards, a logistic four-parameter model (4PL) was adjusted to samples and standards, and then the data were linearized with the aid of Logit-Log transformation. ANOVA was used to compare the similarity between Hill coefficient (4PL) and slopes (linear adjustment). Then, to analyze parallelism among samples, we used an approach based on the variation coefficient (VC%). By processing serial dilutions of each sample, optical densities were interpolated in the calibration curve and the resulting concentrations were dilution-corrected. Antibody levels obtained from this inverse procedure should remain consistent in the dilution range explored, without deviations from the tolerable VC% value. Results: Both approaches agreed in that M1 did not react in a predictable fashion with the DGP-A kit. The same conclusion was drawn from M3 analysis with the DGP-G kit. Slope analysis showed an exaggerated sensitivity when detecting parallelism deviations. Conclusions: It is recommended to prioritize graphical evaluation of 4PL curves and set aside the parameter similarity-based tests in favor of the VC%-based method.

Keywords: ELISA, immunoassay, diagnostics, parallelism, standards.

Introducción

La técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA), de uso tan extendido en el campo de la serología, brinda una estimación semicuantitativa de biomarcadores de importancia clínica. Dentro de la esfera de estos biomarcadores, se encuentran los anticuerpos con especificidad de unión definida cuyos niveles circulantes correlacionan con eventos fisiopatológicos, tales como inmunizaciones, procesos infecciosos o recidivas en enfermedades autoinmunes.¹ Así, su determinación se ha consagrado como una valiosa herramienta para los procesos de toma de decisiones inscriptos en el marco de complejos algoritmos de la práctica clínica. En este contexto, desde el laboratorio de inmunología es esencial contar con procedimientos que no sólo den certeza acerca del desempeño de los inmunoensayos disponibles comercialmente, sino que, además, definan sus limitaciones.² En este artículo se plantea un esquema de verificación operativa del paralelismo aplicado a dos inmunoensayos comerciales para detección de anticuerpos anti-péptido deaminado de gliadina de clase IgA e IgG (PDG-A y -G), de uso corriente en el laboratorio clínico.

Hay una creciente demanda analítica sobre las determinaciones que integran el panel de pruebas diagnósticas de enfermedad celíaca: su elevada prevalencia, estimada en el 1 % de la población, sumada a iniciativas de organizaciones civiles para que se legisle sobre la materia justifica la trascendencia sanitaria que ha cobrado la detección precoz en individuos de alto riesgo. Dentro de las pruebas serológicas disponibles, se recomienda realizar el cribado por medio de la detección de anticuerpos antitransglutaminasa y antiendomiso³⁻⁴, combinación que por su especificidad y sensibilidad ha probado ser eficiente en la tarea de diferenciar a la población afectada por enfermedad celíaca de la población normal. Sin embargo, estos anticuerpos de buen desempeño en diagnóstico no son adecuados para monitorear la adherencia estricta del paciente a la dieta libre de gluten⁵, condición necesaria para minimizar el riesgo de mortalidad a largo plazo derivada de complicaciones oncológicas tales como el linfoma⁶. No obstante, en los últimos años, la determinación de los niveles de anticuerpos PDG-A y -G por ELISA ha demostrado tener una sensibilidad superior a los anticuerpos anti-transglutaminasa tisular y antigliadina en la detección de transgresiones alimentarias en la población pediátrica⁵, lo que justifica su incorporación como herramienta de monitoreo en numerosos servicios de inmunoserología.

La magnitud de la señal analítica en el ELISA depende de la reactividad del analito con componentes críticos del kit. En contraste con métodos cuantitativos de uso corriente en química clínica, esta señal no constituye una determinación directa de su masa, sino que depende de características de, por lo menos, una reacción antígeno-anticuerpo. Sabiendo que el analito está conformado por una población de anticuerpos cuya biosíntesis deriva de una respuesta inmune humoral de naturaleza policlonal, es preciso reconocer el alto grado de heterogeneidad en sus parámetros de interacción inmunoquímicos.

Por otro lado, los estándares que se usan para construir

la curva de calibración no sólo son heterogéneos en cuanto a su composición, sino que, muchas veces, están insuficientemente caracterizados en los certificados de análisis que acompañan los kits comerciales. Otros niveles de complejidad se suman a la cuestión, si se considera la respuesta humoral inmadura de pacientes pediátricos, tal vez no comparable a la de adultos, y su potencial impacto en la señal. Por lo expuesto, cabe la posibilidad de que el material de referencia de los ELISA no sea representativo del analito endógeno desde el punto de vista inmunoquímico.⁷⁻⁸ Esto cuestiona la noción según la cual es válido interpolar señales en la curva estándar con fines semicuantitativos y, por lo tanto, también pone en duda la calidad de los resultados analíticos derivados del ensayo.

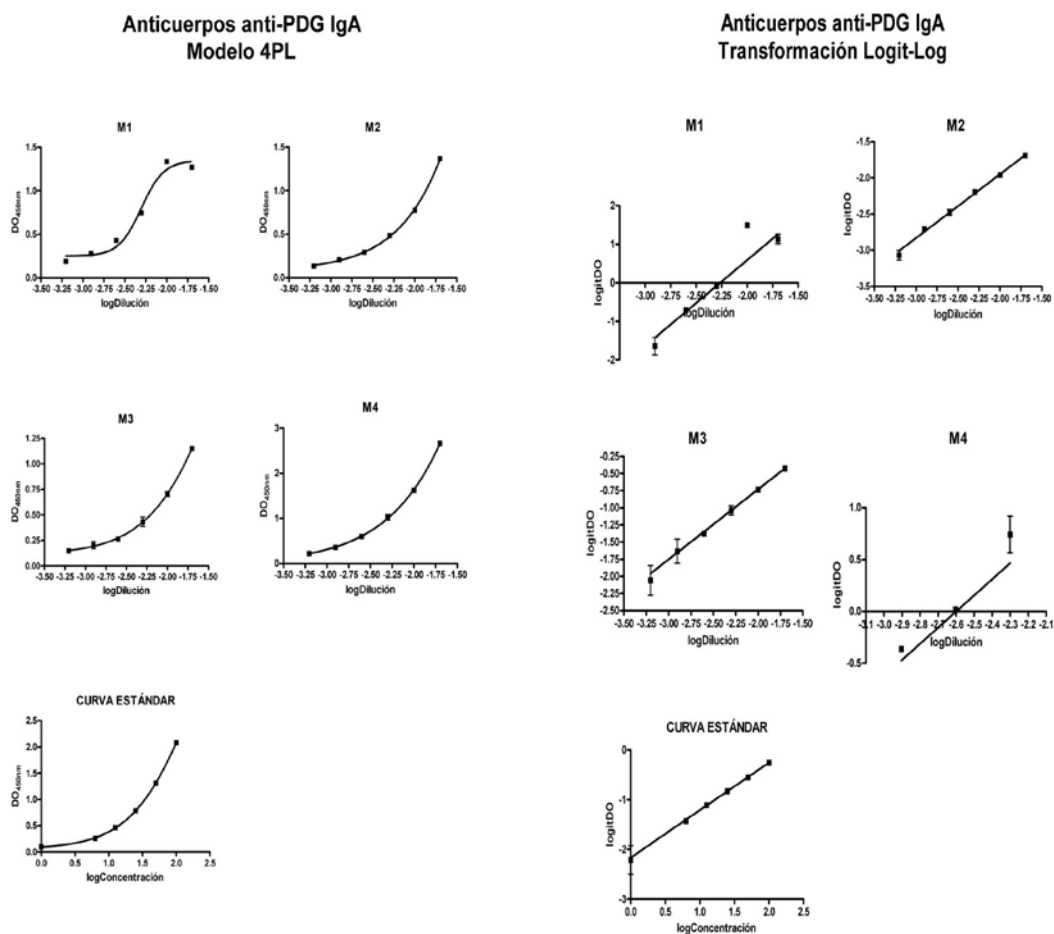
El análisis de paralelismo aborda estas cuestiones al examinar si los calibradores mimetizan el comportamiento del analito endógeno frente a los inmunorreagentes del kit. Si la reactividad es comparable, las curvas dosis -respuesta del analito y del estándar difieren únicamente en un desplazamiento horizontal⁹ y es válida la aplicación del kit con fines semicuantitativos. Pese al reconocimiento de su importancia crítica en etapas precoces del desarrollo de las técnicas de ELISA, hay discrepancia en la literatura en lo referido a la manera de conducir los experimentos de paralelismo y a cuáles deberían ser los criterios de aceptación o rechazo de un inmunoensayo diagnóstico.¹⁰

En este artículo, se plantea un esquema de verificación operativa del paralelismo aplicado a dos inmunoensayos comerciales para detección de anticuerpos contra los péptidos de gliadina desaminados, anti-PDG de clase IgA y anti-PDG de clase IgG. El análisis se articula en torno a dos enfoques: en primer lugar, aquel basado sobre las pruebas de significancia dependientes del valor p aplicado a parámetros derivados de ajustes de regresión tanto lineal como no lineal y, en segundo lugar, a una evaluación de la variabilidad en los resultados del cálculo inverso de niveles de analito contra un valor prefijado (CV = 20 %). Se analiza la congruencia entre estos abordajes alternativos y se sugieren lineamientos para que, dado el caso, el profesional bioquímico implemente desde una postura crítica su propio programa de verificación de este importante aspecto de los inmunoensayos en fase sólida.

Materiales y métodos

Se siguieron dos abordajes para el estudio del paralelismo: en primer lugar, se examinó el paralelismo entre muestras y calibradores empleando una prueba ANOVA para evaluar similitud de parámetros entre curvas dosis - respuesta. En este esquema de trabajo, se analizan parámetros descriptivos de los ajustes efectuados sobre la distribución de datos de las muestras y los estándares. Una vez comprobado que no difieren significativamente, se puede asumir que se cumple la condición de paralelismo entre las curvas.

El segundo enfoque indaga en el fenómeno de paralelismo entre muestras, siguiendo un procedimiento en el que, además, se examina la selectividad del ensayo y efecto de potenciales interferentes de la matriz.¹⁰ Se parte, en este caso, de la premisa según la cual en toda técnica inmunoquímica la

Figura 1. Anticuerpos IgA anti péptidos de gliadina desaminados (anti-PDG IgA).

► Panel izquierdo. Ajustes logísticos de 4 parámetros (4PL) sobre la distribución de datos de las muestras M1 a M4 y los estándares (curva estándar) para la prueba de ELISA que detecta anticuerpos anti - péptido deaminado de gliadina de clase IgA (PDG-A). Panel derecho. Regresión lineal sobre la distribución de datos de la transformación Logit - Log para las muestras M1 a M4 y los estándares (curva estándar). Se trabajó con la prueba de ELISA PDG-A.

selectividad no es absoluta: la señal analítica global depende de la interacción de elementos del ensayo con componentes de la matriz biológica y con el analito. El estudio del paralelismo entre muestras permite caracterizar la influencia de estos constituyentes de la matriz en los resultados.

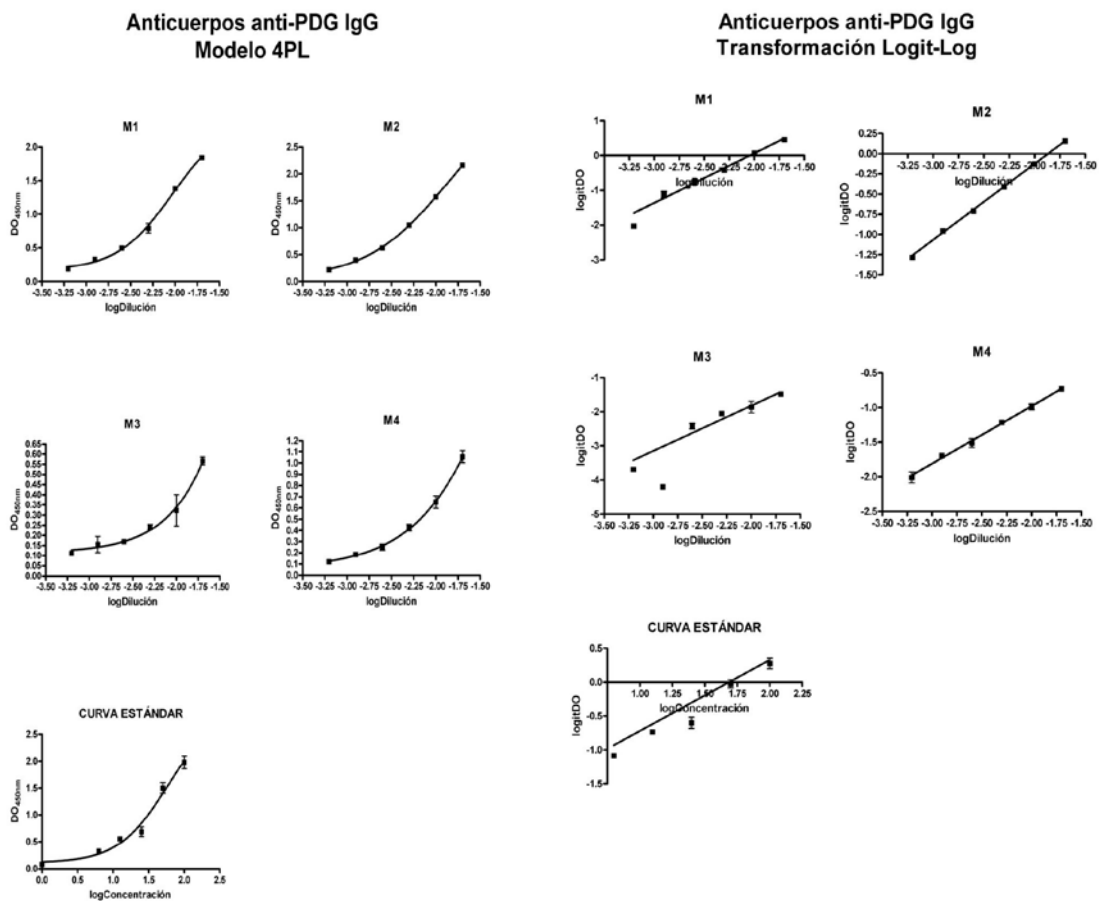
Para cumplir este objetivo, resultó adecuado el método basado sobre el cálculo inverso de niveles de anticuerpo para cada una de las diluciones seriadas de las muestras analizadas por ELISA. La excesiva variabilidad en las concentraciones finales calculadas siguiendo este procedimiento revelarían efectos de la matriz debido a interacciones espurias entre elementos del kit e interferentes, muchas veces de identidad desconocida.

Se trabajó con dos kits de ELISA disponibles comercialmente para determinación semicuantitativa de los niveles de anticuerpos anti - péptido deaminado de gliadina de clase IgA y anticuerpos anti-péptido deaminado de gliadina de clase IgG (PDG-A, PDG-G respectivamente; ORGENTEC Diagnostika, Mainz, GE). Los ensayos se ejecutaron de manera semiautomatizada con el analizador Alisei (RADIM Diagnostics, Freiburg, GE). El análisis

estadístico se llevó a cabo con el software *GraphPad Prism* v 4.03 (GraphPad Software, Inc.).

Se procesaron muestras de suero de adultos obtenidas por punción venosa en ausencia de anticoagulantes. Se procuró que las muestras seleccionadas no presentaran interferencias macroscópicas, tales como fenómenos de hemólisis, hiperbilirrubinemia o hiperlipemia. Además, el título de anticuerpos anti-PDG de clase IgA e IgG debía encontrarse en un nivel tal que facilitase la interpolación de la señal de densidad óptica (DO) en la curva de calibración correspondiente: si el nivel de analito endógeno está convenientemente alejado de los límites superior e inferior de cuantificación del método, se previene el incremento indeseado del coeficiente de variación en las determinaciones.¹¹ El título adecuado para el estudio es todo aquel que esté alejado de los límites de cuantificación. Se diluyeron las muestras de suero de forma seriada a 6 niveles¹², según los factores 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 y 1/1600, con el diluyente provisto por el kit y se llevó a cabo la técnica, según las recomendaciones del fabricante tal como constan en el inserto, a excepción de la etapa de siembra de la muestra, en

Figura 2. Anticuerpos IgG anti péptidos de gliadina desaminados (anti-PDG IgG).



► Panel izquierdo. Ajustes logísticos de 4 parámetros (4PL) sobre la distribución de datos de las muestras M1 a M4 y los estándares (curva estándar) para la prueba de ELISA que detecta anticuerpos anti - péptido deaminado de gliadina de clase IgG (PDG-G). Panel derecho. Regresión lineal sobre la distribución de datos de la transformación Logit-Log para las muestras M1 a M4 y los estándares (curva estándar). Se trabajó con la prueba de ELISA PDG-G.

la que se dispensó en el pocillo de la microplaca la dilución en estudio. El fabricante sugiere procesar toda muestra de suero por el método de dilución única a un nivel 1/100, por lo que se consideró el resultado obtenido a partir de esta dilución como la concentración nominal de las muestras. Todas las diluciones se analizaron por triplicado.

Para el análisis del paralelismo entre muestras y estándares, se representaron los datos de DO vs. log de dilución para las muestras, mientras que para los estándares se procesaron las DO vs. log de concentración (concentración declarada por el fabricante). A partir de la distribución aparentemente simétrica de los datos, tanto de las muestras como de los calibradores, se decidió ajustar un modelo de regresión no lineal logístico de 4 parámetros (4PL). Este ajuste dio lugar a una curva sigmoidea de acuerdo con la expresión:

$$DO = D + \frac{(A - D)}{1 + (X/C)^E} \quad (1)$$

A y D representan las asíntotas superiores e inferiores de la curva sigmoidea, respectivamente; X corresponde a la dilución del punto de inflexión de la curva en torno al cual existe simetría y E es la pendiente o coeficiente de Hill.

Una vez obtenido el ajuste, se determinó el paralelismo en-

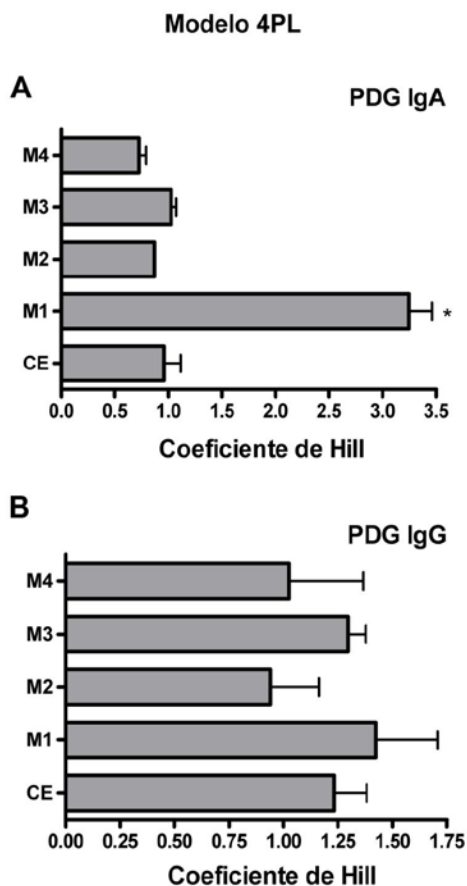
tre las curvas 4PL de las muestras y estándares a partir de un procedimiento de ANOVA basado sobre el análisis de las diferencias en la pendiente de Hill.¹³ Para continuar el análisis de paralelismo bajo el primer abordaje, se ajustaron a una recta los datos de las muestras y estándares al aplicar la transformación Logit-Log a los valores de DO¹⁴ según:

$$\text{logit } DO = \log \left(\frac{DO - D}{A - DO} \right) \quad (2)$$

A y D representan las asíntotas superiores e inferiores de la curva logística. Una vez que se representaron los valores de logit DO vs. log dilución (para las muestras) y logit DO vs log concentración (para los estándares) se consiguió ajustar con éxito un modelo lineal de la forma:

$$\text{log } DO = b + m \log X \quad (3)$$

En ella, b es la ordenada al origen, X, la dilución (muestras) o concentración declarada (estándares) y m, la pendiente de la recta. El ajuste del modelo lineal permitió hacer inferencias acerca de la similitud entre las pendientes de las rectas para las muestras en estudio y los estándares, nuevamente por el método basado en la prueba de ANOVA. El empleo de esta operación, que asume la pérdida de las asíntotas en la representación gráfica, se ha descrito en literatura como trans-

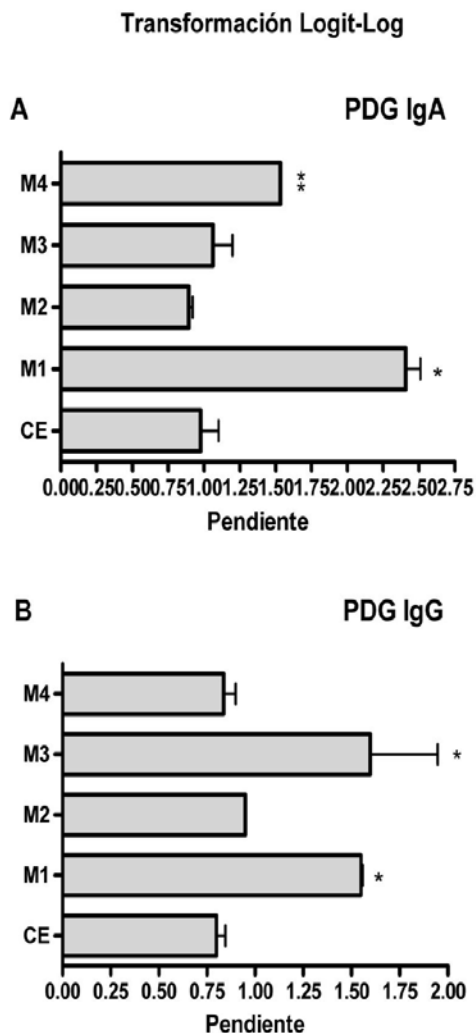
Figura 3. Representación del coeficiente o pendiente de Hill derivado de los ajustes 4PL.

► A. Representación del coeficiente o pendiente de Hill derivado de los ajustes 4PL para las muestras M1-M4 y la curva estándar (CE) en el trabajo con el kit PDG-A. Se compararon las pendientes de M1- M4 con la pendiente CE para analizar desvíos del paralelismo por la prueba de ANOVA de un factor. * $p < 0,01$.

► B. Representación del coeficiente o pendiente de Hill derivada de los ajustes 4PL para las muestras M1- M4 y la curva estándar (CE) en el trabajo con el kit PDG-G. Se compararon las pendientes de M1- M4 con la pendiente CE para analizar desvíos del paralelismo por la prueba de ANOVA de un factor. No se registraron diferencias significativas.

formación Logit - Log totalmente especificada.¹¹ Teniendo en cuenta la falta de homogeneidad en las varianzas (heterocedasticidad), la regresión lineal se hizo por el método de mínimos cuadrados ponderados.¹⁴

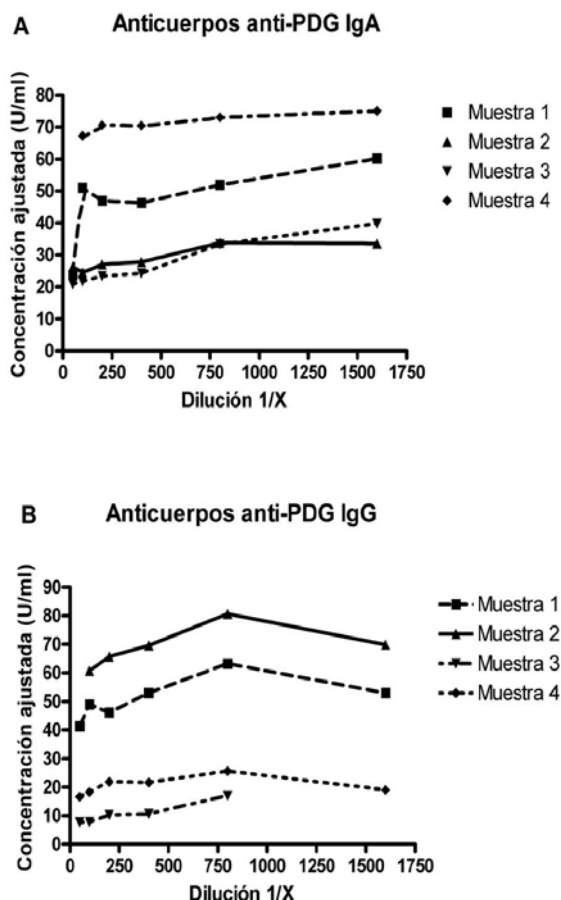
En el ensayo de paralelismo entre muestras, se trabajó con las mismas muestras de suero, partiendo de diluciones seriadas, según los factores 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 y 1/1600, empleando el diluyente provisto por el kit. Luego de ejecutar la técnica de ELISA para determinación de anticuerpos PDG-A y PDG-G, según las recomendaciones del fabricante, se

Figura 4. Representación de la pendiente de las rectas derivadas de los ajustes de regresión lineal.

► A. Representación de la pendiente de las rectas derivadas de los ajustes de regresión lineal ponderada para las muestras M1- M4 y la curva estándar (CE), en el trabajo con el kit PDG-A. Se compararon las pendientes de M1-M4 con la pendiente CE para analizar desvíos del paralelismo por la prueba de ANOVA de un factor. * $p < 0,01$. ** $p < 0,05$.

► B. Representación de la pendiente de las rectas derivadas de los ajustes de regresión lineal ponderada para las muestras M1- M4 y la curva estándar (CE) en el trabajo con el kit PDG-G. Se compararon las pendientes de M1- M4 con la pendiente CE para analizar desvíos del paralelismo por la prueba de ANOVA de un factor. * $p < 0,01$.

interpolaron los valores de DO de cada nivel de dilución en la curva estándar y se corrigió por factor de dilución: la concentración final de analito calculada a partir de este procedimiento inverso debería ser consistente en el rango de diluciones explorado y no exhibir desviaciones por fuera de valores prefijados para el coeficiente de variación (CV), cuyo valor tolerable en este trabajo se tomó como $CV < 20\%$. Las concentraciones obtenidas para M1-M4 a partir de cada uno de los seis niveles de dilución se representaron en una gráfica para examen de la tendencia de los datos.

Figura 5. Concentración ajustada de anticuerpos.

► A. Trazado de la concentración ajustada calculada por interpolación para seis diluciones seriadas de cada muestra M1- M4. Se trabajó con el kit PDG-A. 1/X: factor de dilución.

► B. Trazado de la concentración ajustada calculada por interpolación para seis diluciones seriadas de cada muestra M1- M4. Se trabajó con el kit PDG-G. No se representa para la muestra 3 el punto correspondiente a la dilución 1/1600 al estar la señal por debajo del límite de cuantificación. 1/X: factor de dilución.

Resultados

Se procesaron cuatro muestras de suero de adultos, M1-M4, según el esquema descrito en el apartado anterior. En las figuras 1 (panel izquierdo) y 3A se puede apreciar que, a partir del análisis del coeficiente de Hill, existe diferencia significativa en el comportamiento frente a los inmunorreagentes del kit PDG-A para la muestra M1 y los calibradores (3,23 vs 0,92, respectivamente, $p < 0,01$). Luego de ajustar a una recta los datos por medio de la transformación Logit - Log y efectuar una regresión lineal ponderada, tal como se muestra en la figura 1 (panel derecho), se encontró que las pendientes tanto de M1 (2,44, $p < 0,01$) como de M4 (1,60; $p < 0,05$) difieren de la pendiente de la curva estándar (0,93) (Figura 4A). Se puede asumir que M1 no reacciona de manera predecible con elementos del kit PDG-A, según los métodos de análisis de paralelismo basados sobre

la comparación de parámetros, empleando un modelo lineal y no lineal. Al indagar en el paralelismo entre muestras por el cálculo inverso de las concentraciones (Tabla 1), M1 y M3 exhiben una variabilidad en sus resultados (CV = 26,31 % y CV = 28,05 %) inaceptablemente alta en relación con el valor prefijado de $CV \leq 20$ %. En efecto, la tendencia creciente de las concentraciones calculadas para M1 y M3 con el factor de dilución (Figura 5A) sugiere que se está liberando al analito de la influencia de algún interferente con el que interacciona de forma inespecífica y que, a su vez, disminuye la posibilidad de unión con elementos de detección del ensayo. Estos hallazgos para M1 ponen en duda la confiabilidad de los resultados semicuantitativos que puedan obtenerse a partir su procesamiento con el kit PDG-A, por lo menos en el rango de las diluciones examinadas. En el caso del kit PDG-G, los coeficientes de Hill de las curvas 4PL no difieren significativamente al comparar el paralelismo entre M1 - M4 y la curva estándar (Figura 2, panel izquierdo y Figura 3B). Sin embargo, en la regresión lineal se encuentra que las pendientes de las rectas para M1 (1,62) y M3 (1,69) no son equivalentes ($p < 0,01$; Figura 2 panel derecho y Figura 4B) a la pendiente de los calibradores (0,76). En este caso, existe incongruencia entre las curvas logísticas y las rectas de la transformación Logit - Log. Se revela en este último ajuste una exagerada sensibilidad en la detección de desvíos del paralelismo al combinarse con la metodología de ANOVA: si se juzga el aspecto de las rectas en la figura 2, tanto M1 como M3 no parecen tener una pendiente tan disímil de la curva estándar como para descartar la hipótesis de reactividad comparable entre las muestras y calibradores. En la prueba de paralelismo entre muestras (Tabla 2), nuevamente M3 se destaca como la muestra que, al presentar un CV = 35,45 %, parece tener una matriz de composición tal que afecta de manera importante la señal. La tendencia general para las concentraciones de M1 - M4 es creciente, al menos hasta un nivel de dilución 1/800, después de la cual disminuyen. Este efecto se confirma en la figura 5B, donde se registra una oscilación del trazado muy acusada para M1 y M2 en relación al resto de las muestras. No obstante, se verifica en el último punto lo que parece ser una corrección de la interferencia con la dilución creciente, que termina atenuando el impacto sobre el CV (14,64 y 10,61 %, respectivamente).

En contraste, las razones metodológicas no permitieron interpolar los datos del último punto para M3, razón que tal vez justifique el incremento excesivo de su CV% a un nivel superior al tolerable.

Discusión

En etapas tempranas del desarrollo de las pruebas de ELISA es imprescindible emprender un estudio sistemático de la especificidad, selectividad, sensibilidad, determinación de la dilución mínima requerida y límites de cuantificación superior e inferior del ensayo.¹⁰ En el caso de kits adquiridos en el comercio, el interés puede orientarse a verificar de manera operativa las especificaciones técnicas declaradas por el fabricante¹⁵, examinar las variaciones entre lotes de reactivos o la validez del procedimiento recomendado. Es sabido que la adopción in-

Tabla 1. Concentraciones ajustadas de los anticuerpos IgA anti péptidos de gliadina desaminados: análisis del paralelismo entre muestras a partir de diluciones seriadas (1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 y 1/1600).

Muestras	Media (U/ml)	DE (U/ml)	CV %
1	46,70	12,29	26,31
2	28,87	3,91	13,57
3	27,23	7,64	28,05
4	71,31	2,94	4,12

► DE, desvío estándar; CV %, coeficiente de variación; anti-PDG, anti péptidos desaminados de gliadina; IgA, inmunoglobulina A.

discriminada de kits comerciales puede traer aparejada la generación de resultados confusos o discordantes con el resto de las pruebas que componen un panel diagnóstico y que causan muchas veces desconcierto en el profesional de la salud responsable de la toma de decisiones con base en los resultados serológicos. Es pertinente abordar estas cuestiones tomando como eje el estudio del paralelismo, si se pretende determinar que un inmunoensayo cumple con los fines para los que ha sido desarrollado.⁷

Aunque la importancia del paralelismo es reconocida en la industria farmacéutica y biotecnológica como requisito previo a la determinación de la potencia relativa de un producto, no existe consenso en cuanto a la forma de conducir los experimentos ni en los criterios de aceptación o rechazo para los bioensayos de diagnóstico. Más bien, se plantea en la literatura del tema una serie de lineamientos generales y recomendaciones, que derivan de distintas posturas, no siempre complementarias. Esto atenta contra la elaboración de procedimientos operativos estándar necesarios para generalizar el estudio del paralelismo en el área de inmunquímica.¹

El paralelismo como objeto de indagación en inmunoensayos ha sido escasamente explorado: estudios recientes plantean interrogantes acerca de la validez de las pruebas de significancia basadas sobre el valor *p*, tal como se aplica en el primer enfoque de este trabajo. En efecto, se ha puesto en duda que los resultados de las pruebas de comparación de parámetros considerados arbitrariamente relevantes, tales como la pendiente de Hill correlacionen con el fenómeno de equivalencia en la reactividad de muestras y estándares.¹⁶ Si bien éste se considera un parámetro de curvatura fundamental, hay posturas que reformulan el análisis en términos de la inclusión de las asíntotas superior e inferior del modelo 4PL para conseguir una descripción más completa de la curva.^{17,18} Más aún, la elección del ajuste parece condicionar los resultados: esto lo demuestra la falta de congruencia entre los resultados de las transformaciones Logit - Log y los modelos 4PL en este trabajo, evidente en el análisis del paralelismo para el kit PDG-G. En ese caso, la comparación de pendientes de las rectas parece tener una sensibilidad exagerada en la detección de desvíos del paralelismo que tal vez no se destaquen en la inspección visual. Razones del mismo orden llevaron a algunos autores a inclinarse por la valoración de la forma de las curvas 4PL como recurso

más conveniente en lugar de aplicar la técnica de ANOVA.¹¹ Esto plantea la controversia acerca de si es metodológicamente válida la comparación visual de las curvas 4PL o rectas, por el grado de subjetividad que implica el procedimiento¹¹, o más bien, si se debería seguir un análisis sistemático basado sobre la prueba de ANOVA.

Los resultados de este trabajo indican que M1 no reacciona de manera similar a los estándares para el kit PDG-A, así como tampoco lo hace M3 con el kit PDG-G. Al comparar los dos enfoques usados para evaluar el paralelismo, algunas conclusiones pueden ponerse de relieve. Si se da prioridad a la evaluación gráfica de las curvas 4PL, las diferencias presuntamente significativas del ANOVA parecen intrascendentes, razón por la que se recomienda dejar de lado las pruebas basadas sobre la hipótesis de similitud de parámetros en favor de la comparación visual de las curvas logísticas. No se sugiere el uso de la transformación Logit - Log porque su exagerada sensibilidad podría conducir a desestimar ensayos potencialmente útiles. En una segunda etapa, se puede complementar con el enfoque basado sobre el CV%, teniendo en cuenta que niveles de exigencia demasiado estrictos (CV < 10%) serían inapropiados en el contexto de un plan de validación aplicado a inmunoensayos.⁷ Los objetivos tal vez deban dirigirse a generar resultados semicuantitativos lo suficientemente confiables como para proveer de respaldo sólido a las conductas terapéuticas o actitudes médicas dependientes de su empleo.²

El acotado número de muestras procesadas en este estudio se relaciona con la dificultad de hallar positividad simultánea para ambas pruebas en niveles de anticuerpos, que permitan ejecutar seis diluciones seriadas e interpolar con comodidad la señal en las curvas de calibración, alejadas de efectos indeseables que pueda introducir sobre el CV % la proximidad a los límites de cuantificación superior e inferior.⁷ Por otro lado, algunos autores señalan la pérdida de precisión que paradójicamente se introduce al incorporar mayor número de muestras al diseño del ensayo.²⁰ Atendiendo a estas cuestiones y para hacer más intuitiva la interpretación gráfica de los resultados, es que se resolvió trabajar con las muestras M1- M4.

Sabiendo que todo ELISA tiene problemas de especificidad en su diseño y que existe siempre algo de incertidumbre acerca de la identidad de los elementos que dan origen a la señal¹⁹, el análisis de paralelismo entre muestras y estándares permite la

Tabla 2. Concentraciones ajustadas de los anticuerpos anti-PDG IgG: análisis de paralelismo entre muestras a partir de diluciones seriadas (1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 y 1/1600).

Muestras	Media (U/ml)	DE (U/ml)	CV %
1	50,89	7,45	14,65
2	69,30	7,35	10,61
3	10,65	3,78	35,45
4	20,49	3,22	15,71

► DE, desvío estándar; CV %, coeficiente de variación; anti-PDG, anti - péptidos desaminados de gliadina; IgG, inmunoglobulina G.

evaluación indirecta de este aspecto. En particular, frente a un inmunoensayo en el que las muestras evaluadas presenten reiterados desvíos del paralelismo con respecto a los estándares, se puede asumir que los problemas de especificidad ameritan el reemplazo de algún componente del kit, o bien, el cambio en la elección de la fuente a partir de la cual se prepara el material de referencia.

En caso de que surja la necesidad de introducir variantes en el ELISA debido a que su desempeño en las pruebas de paralelismo entre muestras no cumple con los criterios de aceptación prefijados, una serie de medidas dirigidas a extinguir interacciones inespecíficas se pueden poner en práctica: optimizar la composición de los reactivos del kit manipulando los niveles de aditivos (concentración de detergentes, dilución de colorantes) o adecuando la mínima dilución requerida de la muestra. Por otro lado, si el problema reside en la interacción específica del analito con componentes de la matriz, posiblemente deba plantearse un abordaje más radical que implique adaptar el formato del ELISA: la introducción de pasos de pretratamiento para extraer el analito en ciertas matrices biológicas ha demostrado ser un recurso útil.

En resumen, es nuestra intención motivar la discusión acerca del paralelismo en inmunoensayos de diagnóstico y brindar al bioquímico elementos de análisis que le permitan adoptar una postura crítica a la hora de desarrollar un plan de verificación o validación de los insumos que emplea en su ejercicio profesional.

La búsqueda continua de mejora y la interacción con profesionales de la estadística para evaluar aspectos ligados a su quehacer es esencial, si se pretende garantizar la calidad de las prestaciones del laboratorio clínico en entornos altamente competitivos.

Referencias bibliográficas

- Andreasson U, van Waalwijk PL, van Doorn A, Blennow L, Chiasserini K, Engelborghs D et al. A Practical Guide to Immunoassay Method Validation. *Fronti Neurol.* 2015; 6:179.
- Stevenson LF, Purushothama S. Parallelism: considerations for the development, validation and implementation of PK and biomarker ligand-binding assays. *Bioanalysis.* 2014; 6(2):185-98.
- Walker MM, Ludvigsson JF, Sanders DS. Coeliac disease: review of diagnosis and management. *Med J Aust.* 2017; 207(4):173-8.
- Tye-Din JA, Galipeau HJ, Agardh D. Celiac Disease: A Review of Current Concepts in Pathogenesis, Prevention, and Novel Therapies. *Front Pediatr.* 2018; 6:350.
- Monzani A, Rapa A, Fonio P, Tognato E, Panigati L, Oderda G. Use of Deaminated Gliadin Peptide Antibodies to Monitor Diet Compliance in Childhood Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011; 53(1):55-60.
- Vahedi K, Mascart F, Mary JY, Laberrenne JE, Bouhnik Y, Morin MC, et al. Reliability of antitransglutaminase antibodies as predictors of gluten-free diet compliance in adult celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2003; 98(5):1079-87.
- Valentin MA, Ma S, Zhao A, Legay F, Avrameas A. Validation of immunoassay for protein biomarkers: bioanalytical study plan implementation to support pre-clinical and clinical studies. *J Pharm Biomed Anal.* 2011; 55(5):869-77.
- Lee JW. Method validation and application of protein biomarkers: basic similarities and differences from biotherapeutics. *Bioanalysis* 2009; 1:1461-74.
- Fleetwood K, Bursa F, Yellowlees A. Parallelism in practice: approaches to parallelism in bioassays. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2015; 69(2):248-63.
- Tu J, Bennett P. Parallelism experiments to evaluate matrix effects, selectivity and sensitivity in ligand-binding assay method development: pros and cons. *Bioanalysis.* 2017; 9(14):1107-22.
- Plikaytis BD, Holder PF, Pais LB, Maslanka SE, Gheesling LL, Carlone GM. Determination of parallelism and nonparallelism in bioassay dilution curves. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(10):2441-7.
- Ciotti S, Purushothama S, Ray S. What is going on with my samples? A general approach to parallelism assessment and data interpretation for biomarker ligand-binding assays. *Bioanalysis* 2013; 5(16): 1941-3.
- O'Connell MA, Belanger BA, Haaland PD. Calibration and assay development using the four-parameter logistic model. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 1993; 20 (2):97-114.
- Rodbard, D. Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. *Clin. Chem.* 1974; 20:1255-70.
- Fischer SK, Carrasco-Triguero M, Hong K, Good J, Davancaze T, Nguy T, Li J, Darbonne W, Morimoto A, Zhu Y. Commercial biomarker assays: friend and foe. *Bioanalysis.* 2016; 8(22): 2351-62.
- Gottschalk PG, Dunn JR. Measuring parallelism, linearity, and relative potency in bioassay and immunoassay data. *J Biopharm Stati.* 2005; 15: 437-63.
- Jonkman, J, Sidik, K. Equivalence testing for parallelism in the four-parameter logistic model. *J Biopharm Stat.* 2009; 19 (5):818-37.
- Sidik K, Jonkman JN. Testing for parallelism in the heteroscedastic four-parameter logistic model. *J Biopharm Stat.* 2016; 26(2):250-68.
- Lee JW, Devanarayan V, Barrett YC. Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement. *Pharm Res.* 2006; 23(2), 312-28.
- Yang H, Kim HJ, Zhang L, Strouse RJ, Schenerman M, Jiang XR. Implementation of parallelism testing for four-parameter logistic model in bioassays. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2012; 66(3):262-9.

ARTÍCULO ORIGINAL

Clima de seguridad del paciente percibido en tres laboratorios de análisis clínicos hospitalarios. Estudio de corte transversal

Patient safety climate perceived in three hospital's clinical analysis laboratories. Cross-sectional study

Carral, Pilar^{1,2*}; del Valle, Marta Patricia^{2,3}; Serralunga, María Gabriela²

¹Área de Epidemiología, Hospital Municipal de Agudos "Dr. Leónidas Lucero". Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.

²Área de Análisis Epidemiológico de los Determinantes de la Salud, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.

³Centro de Estudios en Educación para Profesionales de la Salud, Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.

*Contacto: Carral, Pilar. Área de Análisis Epidemiológico de los Determinantes de la Salud, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional del Sur, Florida 1450. Bahía Blanca (B8000IHA), Buenos Aires, Argentina; pilar_carral@hotmail.com

Resumen Introducción: la seguridad del paciente ha sido identificada por la Organización Mundial de la Salud como un aspecto prioritario en la atención sanitaria. Los laboratorios de análisis clínicos no son ajenos a este concepto y la información proporcionada por ellos tiene un impacto directo sobre la misma. Objetivos: evaluar el clima de seguridad del paciente percibido por los integrantes de tres laboratorios de análisis clínicos hospitalarios. Comparar la percepción de seguridad del paciente (SP) según puesto de trabajo, años de experiencia y tipo de hospital. Materiales y métodos: se llevó a cabo un diseño cuantitativo y la aplicación de un cuestionario validado. Resultados: tasa de respuesta: 45 %. Mediana de edad: 43 años (rango intercuartílico = 9), 91,5 % femenino. Las puntuaciones más altas correspondieron al área 1 (factores individuales, sociales y culturales) con un valor promedio de 72,0 [IC 95%: 67,4 - 76,6], seguida por el área 2 (factores relacionados con la actividad), 70,0 [IC 95%: 66,1 - 73,9]; el puntaje más bajo y, por lo tanto, el área menos valorada fue la 3 (factores relacionados con el equipo y los recursos) con un valor promedio de 55,0 [IC 95%: 51,8 - 58,3]. La SP global evaluada en una escala de 0-10, tuvo puntuación media de 7,4 [IC 95% 6,9-7,8]. Según tipo de hospital, se obtuvo mejor valoración en el militar [7,90 ± 1,51], seguido del privado [7,39 ± 1,66] y último, el público. [6,47 ± 1,73] (p = 0,02). No se detectaron diferencias según sexo en la valoración global (p = 0,31); sí, entre edades (p = 0,04), con una puntuación más alta en mayores de 45 años. Según puesto de trabajo y años de experiencia, no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las seis áreas. Conclusiones: el clima de seguridad del paciente valorado según escala global fue favorable en las tres instituciones y no varía de acuerdo con el puesto de trabajo. La capacitación para fortalecer la cultura de seguridad del paciente debería estar orientada a todos los actores. No se encontraron fortalezas en ninguno de ítems relacionados con la comunicación, dimensión clave de una cultura orientada a la seguridad.

Palabras clave: cultura de seguridad del paciente, clima de seguridad, laboratorios de hospital.

Abstract Introduction: Patient safety has been identified by the World Health Organization as a priority aspect in health care. Clinical analysis laboratories are no stranger to this concept, and the information provided by them has a direct impact on it. Objective: To evaluate the patient safety climate perceived by the members of three hospital's clinical analysis laboratories and to compare the perception of patient safety according to their job position, years of experience, and type of hospital. Materials and methods: Quantitative design, applying a validated questionnaire. Results: 45% response rate, median age: 43 years (Interquartile Range = 9), 91.5% female. The highest scores corresponded to individual, social and cultural factors, with an average value of 72.0 [95% CI: 67.4-76.6], followed by activity-related factors [70.0 (95% CI: 66.1-73.9)]. The lowest score and therefore the least valued corresponded to factors related to equipment and resources, with an average value of 55.0 [95% CI: 51.8-58.3]. The overall patient safety evaluated on a scale of 0-10 had an average score of 7.4 [95% CI 6.9-7.8]. Depending on the type of hospital, the best assessment was obtained in the military hospital [7.90 ± 1.51], followed by the private [7.39 ± 1.66] and the public hospitals [6.47 ± 1.73] (p = 0.02). In the overall assessment, no differences were detected according to gender (p = 0.31), whereas differences were detected between ages (p = 0.04), with a higher score in people over 45 years. According to the job position and years of experience, no significant differences were found in any of the six areas studied. Conclusions: The patient safety climate valued according to a global scale was favorable in the three institutions and did not vary according to the job position. Training to strengthen the patient safety culture should be aimed at all actors. No strengths were found in any of the items related to communication, a key dimension of a security-oriented culture.

Key words: Culture of patient safety, Safety climate, Hospital laboratories.

Introducción

La preocupación por la seguridad del paciente (SP) no es un tema nuevo, ya que los primeros estudios datan de 1950, pero lo cierto es que, en los últimos años, desde que el Instituto de Medicina de los Estados Unidos publicó el libro *To err is human: Building a Safer Health System*, en 1999, el problema ha adquirido una dimensión mundial y se ha incorporado a las agendas políticas y al debate público.¹

Hasta hace poco tiempo, los aspectos relativos a la SP se circunscribían exclusivamente a los servicios con actividad clínica directa sobre el paciente, y el resto de los servicios asistenciales, incluido el laboratorio clínico, quedaban al margen de esta². Diferentes autores que han estudiado la influencia del laboratorio clínico en la SP concuerdan en que, de los sucesos adversos detectados, la responsabilidad directa del laboratorio alcanza el 60 %; dentro de ellos, el 71 % se localiza en la etapa preanalítica y, a su vez, el 74 % podían prevenirse.³⁻⁶ La mayoría de los autores coinciden en que la mayor parte son errores en la identificación del paciente y el retraso de las pruebas o entrega de resultados.⁷⁻¹⁰

La SP, entonces, se ha convertido en una prioridad para los laboratorios clínicos.¹¹ En la actualidad, la comunidad científica internacional la reconoce como un problema grave que requiere un enfoque global, con el propósito de minimizar las tasas de error y promover la mejora de la calidad. Por ésta razón, la *Education and Management Division* (EMD) de la *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC), en 2008, lanzó un grupo de trabajo específico llamado "Working Group on Laboratory Errors and Patient Safety" (WG-LEPS) como herramienta para mejorar el conocimiento en este campo a nivel internacional y recomendar el desarrollo y aplicación de protocolos operativos estandarizados¹²; a nivel nacional, se reconoce al Grupo Argentino para la Seguridad del Paciente (GASP), que aborda esta temática de una manera interlaboratorial.¹³

Si queremos minimizar los errores en la atención sanitaria, debemos comenzar por comprender los "factores humanos" y conocer las causas culturales, educacionales y de formación, así como los aspectos organizativos y estratégicos relacionados con las condiciones de trabajo. Conocer y monitorear en qué medida nos implicamos y qué grado de compromiso tenemos como bioquímicos respecto de la SP es el primer paso hacia la práctica de una atención sanitaria libre de daños evitables.

El objetivo del trabajo fue evaluar el clima de seguridad del paciente percibido por los integrantes (bioquímicos, técnicos y administrativos) de tres laboratorios clínicos hospitalarios.

Materiales y métodos

El estudio tiene un diseño observacional, descriptivo, de corte transversal, con aplicación de un cuestionario estructurado, durante el mes de junio de 2016.

La población de estudio se conformó con el personal estable de laboratorio: bioquímicos, técnicos y administrativos de tres hospitales de las ciudades de Bahía Blanca y Punta Alta. Para la aplicación del cuestionario, la muestra en cada uno de los tres hospitales fue no probabilística y se realizó por conveniencia.

Criterios de exclusión

Se excluyó al personal que trabajase menos de 20 horas semanales, a aquellos trabajadores con licencias prolongadas en los últimos 6 meses (licencias por enfermedad que implicaban ausencia laboral de, al menos, 3 meses) y a los que tuvieran menos de un año de antigüedad en su puesto de trabajo.

Técnica e instrumento de recolección de datos. Implementación

Se utilizó un cuestionario validado por el grupo español de Giménez y col. para evaluar la SP en los laboratorios clínicos integrado por 12 dimensiones que recogen las diferentes perspectivas sobre la SP que pueden darse en el ámbito de los laboratorios clínicos. Está formado de 62 ítems agrupados en 6 áreas específicas:

- Área 1- Factores individuales, sociales y culturales (9 ítems);
- Área 2- Factores relacionados con la actividad (17 ítems);
- Área 3- Factores de equipamiento y recursos (10 ítems);
- Área 4- Factores relacionados con las condiciones de trabajo (6 ítems);
- Área 5- Factores educacionales y de formación (10 ítems);
- Área 6- Factores relacionados con la comunicación (10 ítems).

La valoración de los ítems se realiza por medio de una escala de Likert de 0 - 5 puntos, que incluye la posibilidad "no sabe/no contesta" y, al final, presenta una escala de valoración global de SP de 0 - 10 puntos.¹⁴

La entrega del cuestionario se realizó de manera individualizada y estuvo a cargo de personal asignado en cada uno de los hospitales. Una vez respondido, se habilitaron urnas en los laboratorios de los diferentes hospitales para la recolección de los mismos. Los encuestados dieron el consentimiento informado.

Tabla I. Descripción de la población de estudio.

Característica hospital	Capital humano	Excluidos	Encuestados válidos (n = 52)
Militar	50	4	25
Público	31	3	19
Privado	14	0	8

Definición operacional de la variable principal

El clima de seguridad es definido por la percepción del estado de seguridad, en un determinado momento del tiempo, como una fotografía de la cultura de la seguridad relativamente inestable y sujeta al cambio, asociada a factores intangibles como factores situacionales y ambientales.¹⁵

El resultado del *score* de clima de seguridad (SCS) fue medido en una escala de 0 - 100, según lo propuesto por los autores, que toman como referencia los criterios de evaluación de la *Agency for Healthcare Research and Quality* (AHRQ), estableciendo un punto de corte > 75 % para las fortalezas y < 50 % para las debilidades.¹⁶

Análisis de datos

Se calcularon los puntajes por área, sumando los ítems que las componen y se expresaron como porcentaje del máximo valor posible en una escala de 0 - 100. Los ítems faltantes, es decir, los no respondidos fueron recodificados con el valor medio del ítem en cuestión, para no perder casos debido a que el software estadístico sólo permite el análisis de los casos en que están todos los valores de las variables que conforman esa dimensión.

Se tomó como referencia los criterios de evaluación de la AHRQ, según lo propuesto por los autores del cuestionario, que establecen un punto de corte de > de 75 % para las fortalezas y < 50 % para las debilidades o áreas que necesitan mejoras. Se agregó un punto de corte adicional de < 25 % para los ítems peor valorados.

Se evaluó cada uno de los ítems agrupando los valores extremos positivos (puntajes 4 y 5 o de 0 y 1 para los ítems inversos). Los ítems inversos son aquellos que por su significado o su formulación miden en sentido contrario al resto del cuestionario. La solución más sencilla con los ítems inversos es “desinvertirlos” antes de comenzar el análisis, es decir, que se da vuelta su escala numérica. Es por ello que estos fueron recodificados a 4 - 5 para su posterior análisis.

Se realizó un análisis descriptivo de las variables de estudio. Con el fin de comparar el puntaje entre diferentes variables independientes, estas fueron dicotomizadas para evitar categorías con muy baja representación. Se utilizó la prueba T de Student y el test no paramétrico de Mann - Whitney. Para la comparación entre hospitales se empleó el test de análisis de la varianza (ANOVA). Se utilizó un nivel de significación de 0,05. El análisis estadístico se realizó usando el software SPSS versión 17 (SPSS Science, Chicago, IL).

Resultados

Del total de la población en estudio de los tres hospitales (n = 95), 7 individuos cumplieron con los criterios de exclusión de la investigación. De los 88 restantes, el 45 % (52/88) respondió el cuestionario y la tasa de respuesta fue menor que la esperada (Tabla I). Los que no respondieron la encuesta tampoco dieron el consentimiento. El tiempo promedio de respuesta fue de 15 ± 7 minutos. El promedio de edad fue de 43 ± 9 años (46 ± 9 años, militar; 41 ± 10 años, público; 38 ± 8 años, privado)

y el 91,5 % fue del sexo femenino. Con respecto a su experiencia, el 53 % (26) ha trabajado en el laboratorio por más de 10 años. Según el puesto de trabajo, el grupo más numeroso correspondió a bioquímicos (58,1 %) seguido de técnicos de laboratorio (25,6 %) y administrativos (9,3 %) (Tabla II).

I) Análisis de la respuesta a cada ítem individual

El análisis de la relación y distribución de valores extremos (0 - 1 y 4 - 5) para cada ítem mostró que en el 85,4 % de los mismos (53/62) se obtuvo una tasa de respuesta superior al 90 % y solo en cinco ítems (8,1 %) esta tasa fue inferior al 85 %.

Según los encuestados, en el área 1 (factores individuales, sociales y culturales), se encontraron dos puntos fuertes; en el área 2 (factores relacionados con la actividad), se identificaron tres puntos fuertes y cinco puntos débiles; en el área 3 (factores de equipamiento y recursos), nueve de los diez ítems se identificaron como puntos débiles; en el área 4 (factores relacionados con las condiciones de trabajo), cuatro de los seis ítems se consideraron debilidades y no se encontraron fortalezas; en el área 5 (factores educacionales y de formación), se citaron tres puntos fuertes y cuatro como puntos débiles; finalmente, en el área 6 (factores relacionados con la comunicación), no hubo ningún punto fuerte.

En la figura 1, se resumen los porcentajes de encuestados que valoraron con 4 o 5 las aseveraciones de cada ítem del cuestionario. (n = 52). Se observan en color verde los ítems mejor valorados: 1.1 “Le gusta su trabajo”; 1.2 “Se siente satisfecho con la labor que realiza”; 2.1 “Conoce las funciones, competencias y responsabilidades de su puesto”; 2.2 “Su práctica diaria se adecua a los procedimientos y normativas”; 2.8 “Su laboratorio tiene implementados procedimientos y acciones para promover la correcta identificación del paciente (petición) y de las muestras; 5.6 “Es consciente de que su actuación puede generar errores que pueden perjudicar a la SP”; 5.7 “Tiene conocimiento de las repercusiones que tienen para los pacientes los errores del laboratorio”; 5.8 “Conozco y entiendo el por qué se implementan registros relacionados con la seguridad del paciente: calidad de las muestras, peticiones, tiempos de llegada, errores de identificación, etc.”. En color rojo aparecen los peor valorados: 3.3 “Se sustituye al personal ante bajas o permisos reglamentarios”, 3.6 “Valore la proporción de peticiones analíticas que llegan con etiquetas identificativas del paciente pero sin código de barras (sin captura automática de datos)”.

II) Análisis de la seguridad del paciente (SP) por área

Las puntuaciones más altas correspondieron al área 1 (factores individuales, sociales y culturales) con un valor promedio de 72,0 (IC 95%: 67,4 - 76,6), seguida por el área 2 (factores relacionados con la actividad) con un valor promedio de 70,0 (IC 95%: 66,1 - 73,9); el puntaje más bajo y, por lo tanto, el área menos valorada fue la 3 (factores relacionados con el equipo y los recursos), con un valor promedio de 55,0 (IC 95%: 51,8 - 58,3) (Figura 2).

Tabla II. Datos demográficos y características ocupacionales de los encuestados.

	n	% general	% encuestas válidas
Sexo			
Femenino	43	82,7	91,5
Masculino	4	7,7	8,5
Datos perdidos	5	9,6	-
Edad			
≤ 45	28	53,8	59,6
> 45	19	36,5	40,4
Datos perdidos	5	9,6	-
Años de experiencia en laboratorio			
> 5	8	15,4	16,3
5 – 10	15	28,8	30,6
10 – 20	12	23,1	24,5
≥ 20	14	26,9	28,6
Datos perdidos	3	5,8	-
Años en trabajo actual			
> 5	17	32,7	34,7
{ 5 - 10 }	8	15,4	16,3
{ 10 - 20 }	12	23,1	24,5
≥ 20	12	23,1	24,5
Datos perdidos	3	5,8	-
Puesto de trabajo			
Jefe de Servicio	2	3,8	4,7
Bioquímico	25	48,1	58,1
Residente Bqco.	1	1,9	2,3
Administrativo	4	7,7	9,3
Técnico de Lab.	11	21,2	25,6
Datos perdidos	9	17,3	-

► % encuestas válidas, porcentaje calculado con respecto a las encuestas sin datos faltantes; % general, porcentaje calculado teniendo en cuenta los datos faltantes.

III) Comparación de cada área según diferentes variables

No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las áreas según sexo. Al comparar según categorías de edad, se encontraron diferencias significativas en las áreas 1, 2, 3 y 6, que presentaron mejores valoraciones para los mayores de

45 años. Al evaluar la SP según años de experiencia en laboratorio, solo se encontraron diferencias ($p = 0,02$) en el área 4, "factores relacionados con las condiciones de trabajo", a favor de aquellos con más de 10 años de experiencia. Según años en trabajo actual y puesto de trabajo, no se detectaron diferencias

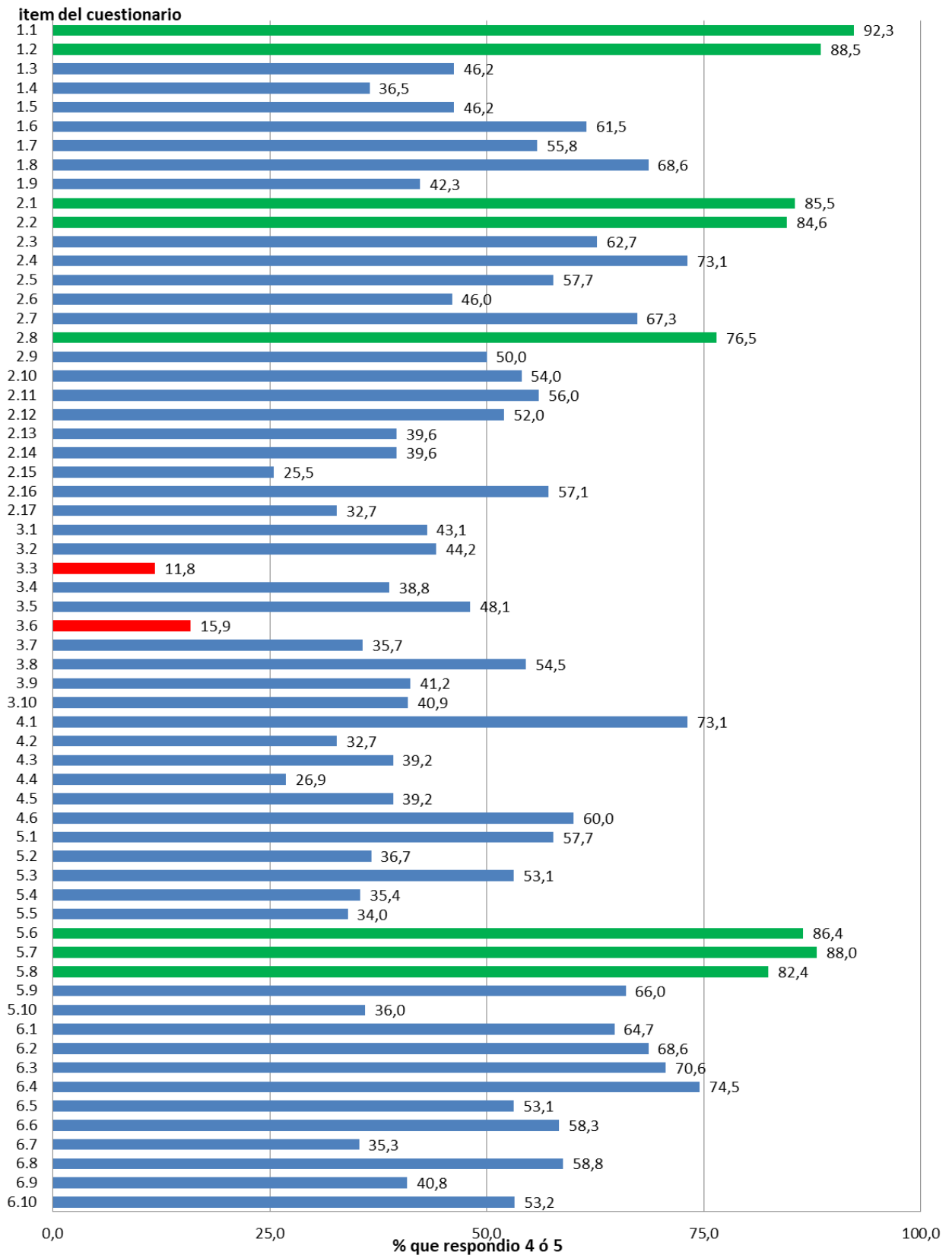
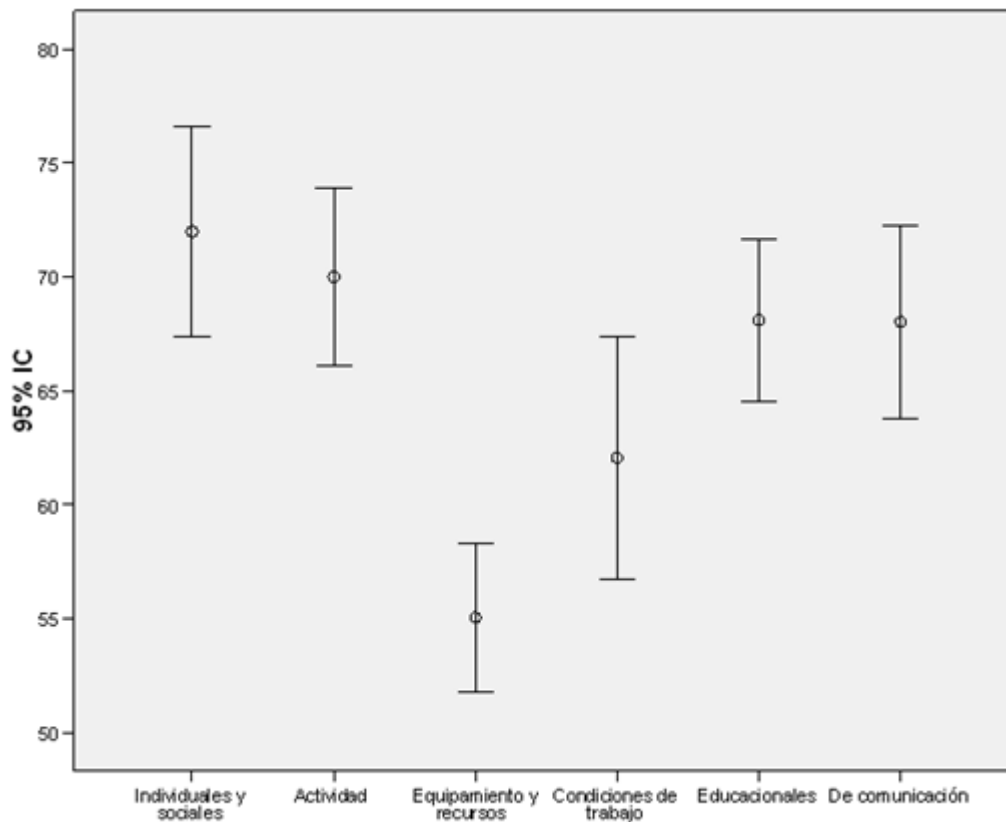
Figura 1. Porcentaje de encuestados que valoraron con 4 o 5 las aseveraciones de cada ítem del cuestionario.

Figura 2. Valor medio obtenido en cada área del cuestionario, representado con su intervalo de confianza 95 %.

significativas en ninguna de las seis áreas.

IV) Análisis de la valoración global de la seguridad del paciente

La SP evaluada de manera global en una escala de 0 a 10 recibió una puntuación media de 7,4 puntos [IC del 95%: 6,9 - 7,8].

V) Comparación de la valoración global de la seguridad del paciente según diferentes variables

Entre sexos no se detectaron diferencias en la valoración global de la SP ($p = 0,31$), pero sí, entre edades ($p = 0,04$), con una puntuación mayor entre los mayores de 45 años (Figura 3).

Según años de experiencia en laboratorio, se encontraron diferencias ($p = 0,04$) con una mejor valoración entre los que tienen más de 10 años de antigüedad.

Según puesto de trabajo y años de experiencia en el centro actual, no se encontraron diferencias significativas. ($p = 0,53$) ($p = 0,69$).

Según tipo de hospital, hubo una mejor valoración de la SP global en el militar ($7,90 \pm 1,51$), seguido del privado ($7,39 \pm 1,66$) y por último, del público. ($6,47 \pm 1,73$) ($p = 0,02$). En la figura 4 se visualiza cómo se distribuye la valoración global según puestos de trabajo en cada uno de los hospitales.

Discusión

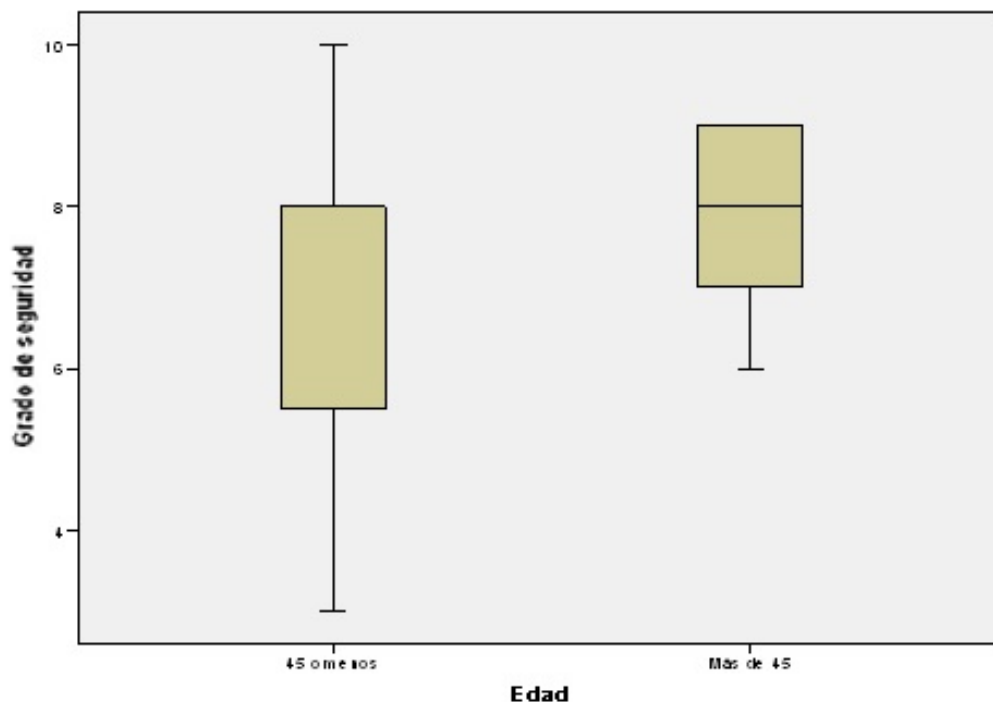
El personal, casi en su totalidad, es de sexo femenino, lo que condice con una fuerte tendencia a la feminización de la profesión bioquímica y de otras profesiones de la salud a lo largo

de los años.^{17,18} Aproximadamente la mitad tiene más de diez años de experiencia de trabajo en su laboratorio actual, hecho que puede ser visto como una ventaja, si analizamos en términos de antecedentes compartidos y experiencia de un aprendizaje en común.

Cuando se analiza la respuesta a cada ítem de manera individual, se destaca la alta valoración respecto del conocimiento y conciencia del error en el laboratorio y sus consecuencias sobre el paciente. Esto sumado a una alta satisfacción del trabajo que realizan, se interpreta como una ventaja o un facilitador a la hora de abordar la implementación de estrategias de mejora.

Uno de los ítems peor valorados correspondió al relacionado con la sustitución del personal (ítem 3.3), que es sabido tiene un fuerte impacto en los trabajadores y constituye un aspecto de alto riesgo, que muchas veces no es tenido en cuenta como una amenaza a la SP. La baja valoración del ítem 3.6, "Valore la proporción de peticiones analíticas con los datos del paciente rellenos a mano", puede interpretarse de tal manera, por el hecho de que solo uno de los tres laboratorios posee tecnología para etiquetado de muestras. Cabe destacar que no se encontraron fortalezas en ninguno de los ítems relacionados con la comunicación, dimensión clave de una cultura orientada a la seguridad.

Del análisis por área, los resultados coinciden con el trabajo de Giménez et al.¹⁹, donde los peores puntajes son para las áreas 3 (Factores de equipamiento y recursos) y 4 (Factores relacionados con las condiciones de trabajo). Respecto de las

Figura 3. Grado de seguridad del paciente según valoración global por categoría de edad.

mejores valoradas también hay coincidencias, pero con un menor puntaje.

Del análisis de las áreas según variables, un hallazgo importante es que, para todas las áreas de análisis, la percepción de la SP no varía de acuerdo con el puesto de trabajo del encuestado.

Del análisis según escenario hospitalario, la percepción fue diferente en los hospitales participantes. El grado de SP según valoración global, fue mejor para el hospital militar, seguido del privado y, por último, del público. Esta diferencia podría ser explicada por la distinta composición del personal con respecto a la edad. El hospital militar cuenta con una población con una media de edad estadísticamente mayor (46 ± 9 años), probablemente más involucrada en temáticas como la SP, cuya instalación en la agenda actual y en las organizaciones de salud de nuestro país es cada vez más vigente.

Al momento de interpretar los resultados es necesario tener en cuenta ciertas limitaciones en el presente trabajo. El diseño del estudio (corte transversal) y el tipo de variable principal (clima de seguridad) obligan a señalar que los resultados son solo válidos al momento del estudio y no son extrapolables, pues clima y cultura de seguridad son constructos inherentes a cada institución y poseen un carácter dinámico que obliga a monitorearlos con periodicidad.

Luego de la aplicación del cuestionario, se esperaba obtener una tasa de respuesta superior al 70 % de la totalidad de la población, sin embargo, si bien se realizaron recordatorios periódicos y visitas de refuerzo a los diferentes laboratorios, no se alcanzó a llegar al porcentaje propuesto.

A pesar de que el clima de SP valorado según escala global fue favorable, con una puntuación media de 7,4, en el análisis de los ítems individuales, los puntos débiles superan amplia-

mente a las fortalezas. Por lo tanto, no podemos concluir que los resultados globales sean realmente favorables. Esta disparidad en los resultados puede interpretarse a partir de que, muchas veces, una escala global da una impresión general e intuitiva sobre lo que se pregunta, y en este caso, los encuestados tienen una mejor impresión global de la SP de lo que realmente valoran cuando responden ítem por ítem de manera individual. La percepción del clima de SP fue diferente en los hospitales participantes: fue mejor valorada en el hospital militar, seguida del privado y por último del público. La percepción de la SP no varía de acuerdo con el puesto de trabajo en el laboratorio. El área menos valorada fue la relacionada con factores de equipamiento y recursos.

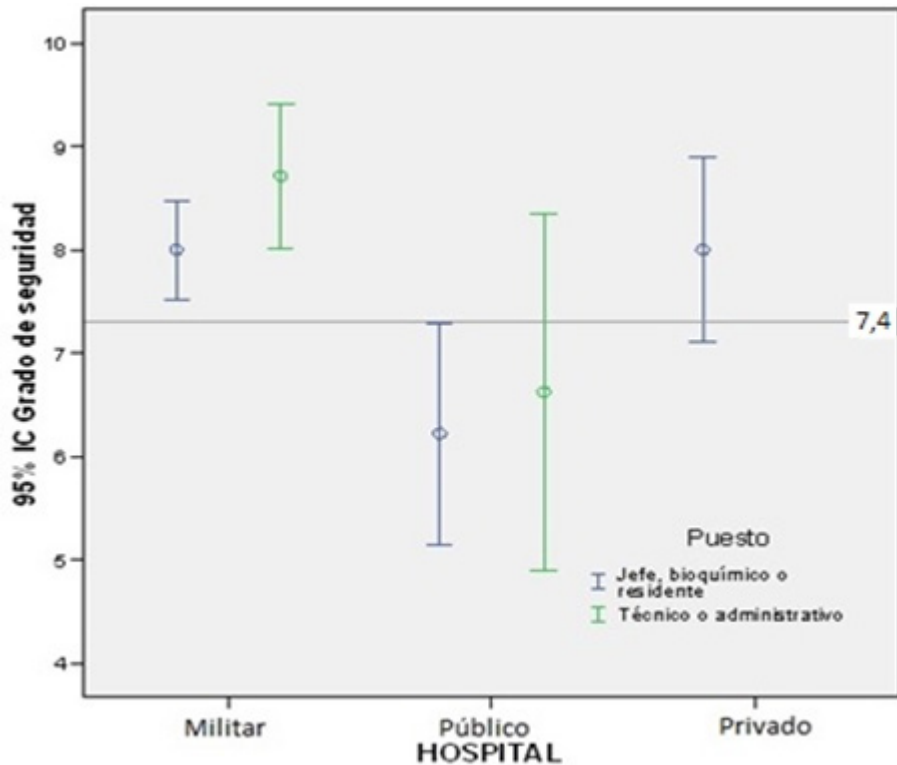
Existe una alta valoración respecto del conocimiento y conciencia del error en el laboratorio y sus consecuencias sobre el paciente. Se evidencia una ausencia de procedimientos y normativas relacionadas con el trabajo en el laboratorio en general, que atenta contra la SP.

La mayoría de los participantes optó por un enfoque del error centrado en la persona y muchos de ellos no identificaron elementos del sistema que tienen impacto en la seguridad: notificación, registro formal, análisis errores.

Para lograr un laboratorio clínico más seguro, el desafío será primero realizar intervenciones efectivas que mejoren la cultura de seguridad para poder implementar luego las estrategias específicas y adecuadas.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Figura 4. Intervalo de confianza 95 % para el grado de seguridad del paciente, según valoración global por hospital y según puesto de trabajo.

Referencias Bibliográficas

- Kohn L, Corrigan J, Donaldson MS. To Err Is Human: Building a Safer Health System. Committee on Quality of Health Care in American Institute of Medicine. Washington: National Academy Press; 2000.
- Mérida de la Torre FJ, Moreno Campoy EE. Fundamentos de Seguridad del Paciente. Análisis y Estrategias en el Laboratorio Clínico. Madrid: Médica Panamericana; 2012.
- Plebani M, Ceriotti F, Messeri G, Ottomano C, Bonini P. Laboratory Network of Excellence: Enhancing Patient Safety and Service Effectiveness. Clin Chem Lab Med 2006; 44(2):150-60.
- Ventura Pedret S, Chueca Rodríguez P, Rojo Vizcaíno I, Castaño Vidriales JL. Errores relacionados con el laboratorio clínico. Quim Clin 2007; 26(1):23-8.
- Leape LL. Error in medicine. JAMA 1994; 272(23):1851-7.
- Howanitz PJ. Errors in Laboratory Medicine: Practical Lessons to improve Patient Safety. Arch Pathol Lab Med 2005; 129(10):1252-61.
- Plebani M, Carraro P. Mistakes in a stat laboratory: types and frequency. Clin Chem 1997; 43(8 Pt 1):1348-51.
- Witte DL, VanNess SA, Angstadt DS, Pennell BJ. Errors, mistakes, blunders, outliers, or unacceptable results: how many?. Clin Chem 1997; 43(8 Pt 1):1352-6.
- Astion ML, Shojania KG, Hamill TR, Kim S, Ng VL. Classifying laboratory incident reports to identify problems that jeopardize safety. Am J Pathol 2003; 120(1):18-26.
- Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, Rubboli F. Errors in laboratory medicine. Clin Chem 2002; 48(5):691-8.
- Alvarez C, Ortega Madueño I, Cuadrado Cenzual MA. La seguridad del paciente en el laboratorio clínico. Implantación de un protocolo de identificación inequívoca de paciente. Rev Lab Clin 2012; 5(1):3-9.
- Sciacovelli L, O'Kane M, Skaik YA, Caciagli P, Pellegrini C, Da Rin G, et al. Quality indicators in laboratory medicine: from theory to practice. Preliminary data from the IFCC Working Group Project "Laboratory errors and patient safety". Clin Chem Lab Med 2011; 49(5):835-44.
- Trunzo C. Experiencia del Grupo Argentino para la Seguridad del Paciente. [Internet]. [Último acceso 2 Jun 2019]. Disponible en: <https://www.aba-online.org.ar/sitio/72congreso/jornadaprecongreso/3a.pdf>
- Giménez-Marín A, Rivas-Ruiz F. Validación de un cuestionario para evaluar la seguridad del paciente en los laboratorios clínicos. Gac Sanit 2012; 26(6):560-5.
- Wiegmann D, Zhang H, Von Thaden F, Sharma G, Mitchell A. A synthesis of Safety Culture and SafetyClimate Research. [Internet]. 2002 [Último acceso 5 Jul 2019]. Disponible en: <https://www.nrc.gov/docs/ML1025/ML102500649.pdf>
- Sexton JB, Helmreich RL, Neilands TB, Rowan K, Vella K, Boyden J, et al. The Safety Attitudes Questionnaire: Psychometric Properties, Benchmarking Data and Emerging Research. BMC Health Services Research 2006; 6:44.
- Arca MA. El ejercicio profesional bioquímico en Latinoamérica y en Argentina. Acta Bioquím Clín Latinoam 2008; 42(3):339-59.
- Eiguchi K. La feminización de la Medicina. Rev Argent Salud Pública 2017; 8(30):6-7.
- Gimenez-Marín A, Rivas-Ruiz A, García-Raja AM, Venta R. Assessment of patient safety culture in clinical laboratories in the Spanish National Health System. Biochimica Medica 2015; 25(3):363-76.

ARTÍCULO ORIGINAL

Diagnóstico molecular en biopsias de sarcoma de Ewing y rhabdomyosarcomas pediátricos: experiencia en el Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez

Molecular diagnosis applied to Ewing's sarcoma and alveolar rhabdomyosarcoma biopsies: experience at the "Dr. Ricardo Gutiérrez" Children's Hospital, Buenos Aires, Argentina

Massone, Carla Antonella^{1,4*}; Colli, Sandra²; García Lombardi, Mercedes³; De Matteo, Elena^{1,2}; Preciado, María Victoria¹.

¹Instituto Multidisciplinario de Investigación en Patologías Pediátricas (IMIPP), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

²División Patología, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

³Unidad de Oncología, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

⁴Instituto Nacional del Cáncer (INC). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*Contacto: Massone, Carla Antonella. Instituto IMIPP-CONICET-GCBA, División Patología, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, Gallo 1330 [C1425EFD]. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina; carlamassonehp@gmail.com

Resumen Introducción: los tumores de partes blandas representan el 6% de los cánceres pediátricos anuales, según el Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino. Para sarcoma de Ewing (SE) y rhabdomyosarcoma (RMS) se describieron translocaciones cromosómicas específicas, aplicadas a la clasificación molecular, diagnóstico diferencial y/o pronóstico. Objetivos: realizar la clasificación molecular de casos con sospecha diagnóstica de SE y RMS y evaluar el impacto de conservación de biopsias sobre la integridad de ácidos nucleicos. Materiales y métodos: se enrolaron niños menores de 18 años con sospecha de SE y RMS. Se estudiaron biopsias de tumor primario, algunas conservadas a -70°C y otras embebidas en parafina (FFEP) y, además, aspirados de médula ósea. Se extrajo el ARN con 1) *Trizol* y 2) *Recover All Total Nucleic Acid Isolation*. Se realizaron las técnicas de FISH (*fluorescence in situ hybridization*), RT-PCR-secuenciación para *EWS-FLI1* [t(11;22)(q24;q12)]/*EWS-ERG* [t(21;22)(q22;q12)] en SE y *PAX3-FOXO1* [t(2;13)(q35;q14)]/*PAX7-FOXO1* [t(1;13)(p36;q14)] en RMS. Resultados: Se incluyeron pacientes con SE (n = 13) y RMS (n = 4). Se estudiaron 17 biopsias de tumor primario: 7 conservadas a -70°C y 12 FFEP y 2 aspirados de médula ósea. Se detectó por FISH el rearreglo de *EWS1*: 9/13 SE y *FOXO1*: 3/4 RMS. Se amplificó el gen *PGK* por RT-PCR y se obtuvo positivo en 8/12 biopsias FFEP y 7/7 muestras congeladas (5 biopsias y 2 aspirados medulares); se detectó RT-PCR en SE *EWS-FLI1* en 7/8 muestras (2 tipo 1; 3 tipo 2; 1 tipo 4 y 1 translocación *EWS* exón 7/*FLI1* exón 4). En RMS se detectó *FOXO1-PAX3* en 1/3 y *FOXO1-PAX7*, en 0/3. En RMS 1/3 se confirmó subtipo embrionario por RT-PCR, en discordancia con FISH. En SE 2/2 se confirmó ausencia de infiltración en médula ósea (MO). Conclusiones: la biopsia en fresco a -80°C demostró mejor preservación de ARN que la FFEP. La secuenciación permitió identificar los puntos de ruptura y en SE., detectar un rearreglo infrecuente. En RMS la discordancia plantea considerar valores de corte en FISH.

Palabras clave: sarcoma de Ewing, rhabdomyosarcoma alveolar, FISH, *fluorescence in situ hybridization*, transcritos de fusión, RT-PCR, retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa.

Abstract Introduction: In Argentina, soft tissue tumors represent about 6% of the annual pediatric cancer cases (*Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino*). Chromosomal translocations described for Ewing's sarcoma (ES) and rhabdomyosarcoma (RMS) can be applied to molecular classification and differential diagnosis and/or prognosis. Aims: To confirm diagnosis of pediatric ES and RMS by means of molecular classification and to evaluate the impact of the biopsy preservation procedure on the integrity of nucleic acids. Materials and methods: Children younger than 18 years with ES (n=13) and RMS (n=4) were enrolled. Seventeen primary tumor biopsies [(7 stored at -70°C and 12 formalin-fixed paraffin-embedded (FFEP))] and two bone marrow aspirates were studied. RNA was isolated by *Trizol* or *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation*. *EWS-FLI1* [t(11;22)(q24;q12)]/*EWS-ERG* [t(21;22)(q22;q12)] in ES and *PAX3-FOXO1* [t(2;13)(q35;q14)]/*PAX7-FOXO1* [t(1;13)(p36;q14)] in RMS were assessed by fluorescent *in situ hybridization* (FISH) and RT-PCR followed by sequencing. Results: The rearrangement of *EWS1* was detected by FISH in 9/13 ES, whereas that of *FOXO1* was detected in 3/4 RMS. *PGK* amplification by RT-PCR was positive in 8/12 FFEP and 7/7 frozen samples (five biopsies and two bone marrow aspirates). In ES, *EWS-FLI1* was detected by RT-PCR in 7/8 samples (two type 1, three type 2, one type 4 and one *EWS* exon 7/*FLI1* exon 4 translocation). In RMS, *FOXO1-PAX3* was present in 1/3 and *FOXO1-PAX7* in 0/3 samples. One RMS was diagnosed as embryonic subtype by RT-PCR, but FISH failed to accurately classify the case. In 2/2 samples, the absence of BM infiltration was confirmed. Conclusions: RNA integrity was better conserved in frozen than in FFEP biopsies. Fusion transcripts allowed identifying the breakpoints and, in ES cases, an uncommon rearrangement was detected. The mismatch in RMS led to reconsider the FISH cut-off value.

Keywords: Ewing's sarcoma, alveolar rhabdomyosarcoma, *in situ hybridization fluorescence*, fusion transcripts, reverse transcriptase polymerase chain reaction

Introducción

La patología oncológica es poco frecuente en la edad pediátrica, sin embargo, es la primera causa de muerte por enfermedad en el grupo etario de 5 a 15 años, por lo cual el desarrollo de estrategias diagnósticas y abordajes terapéuticos de gran especificidad son una necesidad. Según el Registro Onco-pediátrico Hospitalario Argentino (ROHA), cada año, alrededor de 1322 niños son diagnosticados con cáncer, con una tasa de incidencia anual de alrededor de 130 casos por millón de niños menores de 15 años. Los diagnósticos más frecuentes son: leucemias (37%), tumores del Sistema Nervioso Central (SNC), intraespinales (19%) y linfomas (12%), seguidos por tumores de partes blandas (6%; dentro de este grupo, un 48% corresponde a rhabdomiomas -RMS-), neuroblastomas (5,7%), tumores renales (4,8%) y óseos (4,7%; dentro de este grupo, el sarcoma de Ewing (SE) corresponde al 33%). Del total de niños incluidos en el ROHA, el 74% fueron registrados por hospitales públicos, 16%, por centros privados y 10%, por otras fuentes (registros poblacionales, servicio de patología, certificados de defunción, etc.). El Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez como reflejo de estos datos y como centro de referencia recibe la demanda de atención y de diagnóstico de gran parte de los casos derivados.¹

El SE se presenta como un tumor óseo, en el 80% de los casos (con mayor incidencia en pelvis, fémur, tibia y costillas), o de partes blandas, en el 10 a 20% de las ocasiones (predominantemente en pared torácica, glúteos, cavidades pleurales y músculos cervicales), que afecta principalmente a niños, adolescentes y adultos jóvenes con una incidencia de 1,5 casos por millón a nivel global.² El 85% de los SE clásicos presentan una translocación recurrente t(11;22) (q24;q12), la cual ocasiona la fusión del gen *EWSR1* con el gen *FLI1*. El *EWSR1* codifica una proteína de unión a ARN involucrada en la transcripción del ADN y *FLI1* es miembro de una gran familia de factores de transcripción de ADN que contiene dominios de ETS altamente conservados. Sin embargo, la variabilidad en la ubicación del punto de ruptura lleva la transcripción de ARNs de fusión diversos que se traducen en proteínas quiméricas de diferente tamaño y con actividad anómala. En la mayoría de los casos, el rearrreglo cromosómico se presenta entre los intrones 7 u 8 del gen *EWSR1* y los intrones 5 o 4 del gen *FLI1*, lo cual origina la fusión entre el exón 7 del gen *EWSR1* con el exón 6 del gen *FLI1* (transcripto de fusión tipo 1: 50% de los casos) o con el exón 5 del gen *FLI1* (transcripto de fusión tipo 2: 27% de los casos). En la mayoría de los casos restantes no tipo 1/ no tipo 2, la porción *EWSR1* del transcripto se extiende hasta el exón 10. Ocasionalmente, se pueden observar isoformas de fusión más cortas que carecen de los exones 6, 7 y 8 de *FLI1*.^{3,4}

Los genes de fusión generan la transcripción de factores quiméricos aberrantes que alteran la expresión génica. *EWSR1* proporciona un poderoso dominio de activación, que resulta en la alteración de vías de señalización moleculares necesarias para la proliferación y diferenciación celular.⁵ La oncoproteína *EWSR1-FLI1* funciona como un factor de transcripción aberrante, sin embargo, alrededor del 10% de los SE muestran

translocaciones análogas y genes de fusión que involucran al gen *EWSR1* y a un miembro de la familia de factores de transcripción ETS.

Por otra parte, el RMS es el sarcoma de partes blandas más frecuente. Representa el 5% de todos los cánceres pediátricos y es el tercer tumor sólido extracraneal más frecuente luego del neuroblastoma y el tumor de Wilms⁶. El rhabdomioma alveolar (RMSA) y el embrionario (RMSE) constituyen los dos principales subtipos histopatológicos. El RMSE es un tumor de niños pequeños, con una distribución principalmente axial y se presenta en sitios desprovistos de músculo esquelético maduro. El RMSA se presenta comúnmente en tejidos blandos de las extremidades. A pesar de estos perfiles tan diferentes, existen casos complejos de RMSE y RMSA que se superponen tanto clínica como morfológicamente.⁷ Estos datos evidencian que la evaluación morfológica resulta insuficiente para el diagnóstico diferencial de ambas entidades y su correcta clasificación es indispensable para la asignación de riesgo y para seleccionar el régimen terapéutico apropiado, ya que cada uno de ellos tiene un protocolo de quimioterapia diferente. La identificación de las translocaciones recurrentes t(2;13) (q35;q14) y t(1;13) (p36;q14) y sus transcriptos de fusión asociados entre los genes *PAX3-FOXO1* y *PAX7-FOXO1* se observa en el 80% de los casos de RMSA: en general, *PAX3-FOXO1* se halla en el 60% de los casos y *PAX7-FOXO1*, en el 20% restante.^{8,9} Se ha demostrado que el status de fusión *PAX-FOXO1* es un marcador de peor pronóstico de supervivencia libre de eventos (SLE).^{10,12}

La mayoría de los sarcomas se tratan aún según estándares tradicionales¹³; no obstante, los marcadores moleculares vinculados a su patogénesis han allanado el camino para un diagnóstico más preciso, además de proporcionar la oportunidad de explorar otras estrategias terapéuticas.⁵

La identificación de estos marcadores moleculares en la práctica clínica se basa sobre dos técnicas, principalmente: la Hibridación *In Situ* Fluorescente (FISH) y la reacción en Cadena de la Polimerasa a partir de retrotranscripción (RT-PCR); ambas se complementan y constituyen importantes herramientas que permiten definir con precisión las líneas de diferenciación tumoral.¹⁴⁻¹⁶

Los objetivos de este estudio fueron detectar las alteraciones moleculares en SE y RMS mediante la complementación de dos técnicas: FISH con sondas específicas para detectar alteraciones cromosómicas y RT-PCR seguida de secuenciación para la identificación de transcriptos de fusión originados a partir de translocaciones génicas, y, además, evaluar el impacto de la conservación de biopsias sobre la integridad de los ácidos nucleicos.

Materiales y Métodos

Población y muestras en estudio

Se realizó un estudio observacional analítico, de corte transversal. Los criterios de inclusión fueron: la sospecha o diagnóstico confirmado de SE o RMS; edad menor a 18 años y que el paciente no hubiera ya recibido tratamiento previo con radio y/o quimioterapia. Se enrolaron en este estudio sólo aquellos individuos que

Tabla I. Cebadores utilizados para la caracterización de los transcritos de fusión.

Tipo tumor	Translocación	Fusión	Tamaño frag. (pb)	Secuencia cebadores (5' - 3')
SE	t(11;22)(q24;q12)	EWSR1/FLI1	tipo 1: 154 tipo 2: 220	EWS-F TCCTACAGCCAAGCTCCAAGTC
			tipo 3: 406 tipo 4: 472	FLI1-R GGCCGTTGCTCTGTATTCTTACTGAT
			tipo 1: 368 tipo 2: 434	EWS-F TCCTACAGCCAAGCTCCAAGTC
			tipo 3: 620 tipo 4: 686	FLI1B-R GTTGGGCTTGCTTTCCGCTC
	t(21;22)(q22;q12)	EWSR1/ERG	variable según puntos de ruptura	EWS-F TCCTACAGCCAAGCTCCAAGTC ERG-R GAGAAGGCATATGGCTGGTGG
RMSA	t(2;13)(q35;q14)	PAX3- FOXO1	173	PAX3 AGCTATACAGACAGCTTTGT FOXO1 CTCTGGATTGAGCATCCACC
	t(1;13)(p36;q14)	PAX7- FOXO1	163	PAX7 GCTTCTCCAGCTACTCTGAC FOXO1 CTCTGGATTGAGCATCCACC
	PCR anidada	PAX3/7-FOXO1	146/136	FOXO1 semi TCCAGTTCCTTCATTCT

► SE, Sarcoma de Ewing; RMSA, rhabdomyosarcoma alveolar; EWSR1, proteína de unión a ARN involucrada en la transcripción del ADN; FLI1, factor de transcripción de la integración de leucemia 1; ERG, gen relacionado con ETS; FOXO1, Forkhead box protein O1; PAX3/7, Paired box 3/7; (pb) pares de base.

Tabla II. Casos de Sarcoma de Ewing estudiados.

Material	FISH	Estudio molecular		Diagnóstico
		PGK	Transcripto de fusión	
P	EWSR1 POS (60 %)	NEG	No se realiza	SE
P	EWSR1 POS (50 %)	NEG	No se realiza	SE
F	EWSR1 POS	POS	EWS-FLI1 tipo 2	SE
P	EWSR1 POS	POS	EWS-FLI1 tipo 1	SE
P	EWSR1 POS (25 %)	POS	EWS-FLI1 tipo 1	SE
F	EWSR1 POS (80 %)	POS	EWS-FLI1 (ex7/ex4)	SE
PAMO	No se realiza	POS	NEG	Sin infiltrado tumoral (SE)
F	EWSR1 POS (80 %)	POS	EWS-FLI1 tipo 4	SE
PAMO	No se realiza	POS	NEG	Sin infiltrado tumoral (SE)
P	EWSR1 POS (90 %)	POS	EWS-FLI1 tipo 2	SE
F	EWSR1 POS	POS	EWS-FLI1 tipo 2	SE
P	EWSR1 NEG	POS	NEG	No SE
P	EWSR1 NEG	POS	NEG	No SE
P	EWSR1 NEG	POS	NEG	No SE
P	EWSR1 NEG	NEG	No se realiza	No SE

► P, tejido fijado en formol e incluido en parafina; F, tejido en fresco conservado a -70°C; PAMO, médula ósea; NEG, negativo; POS, positivo; PGK: fosfoglicerato quinasa; SE, Sarcoma de Ewing.

Tabla III. Casos de rhabdomyosarcoma estudiados.

Material	FISH	Estudio molecular		Diagnóstico
		PGK	Transcripto de fusión	
P	FOXO1 POS	POS	FOXO1-PAX3	RMS alveolar
F	FOXO1 POS	POS	NEG	RMS embrionario
P	FOXO1 POS (30 %) amplificación de la señal	POS	NEG	RMS embrionario
P	FOXO1 POS (30 %)	NEG	No se realiza	RMS alveolar

► P, tejido fijado en formol e incluido en parafina; F, tejido en fresco conservado a -70°C; NEG, negativo; POS, positivo; RMS, rhabdomyosarcoma.

presentaron un consentimiento informado o asentimiento, según la edad, siguiendo las recomendaciones del Comité de Ética en Investigación del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.

Se incluyeron en el estudio niños con sospecha clínica y/o histopatológica de SE y RMS. Se estudiaron biopsias de tumor primario: en fresco conservadas en *Trizol*[®] a -70°C y biopsias fijadas en formol-buffer y embebidas en parafina (FFEP). Además, se incluyeron punciones-aspiraciones de médula ósea (PAMO) de pacientes diagnosticados con SE y con sospecha de infiltración de células neoplásicas en médula ósea, que se conservaron en *Trizol*[®] a -70°C. Estas muestras de PAMO se procesaron solo para estudios moleculares, pero no citomoleculares, con el objetivo de descartar la infiltración tumoral en la médula ósea (Tablas II y III).

FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*)

El rearreglo de los genes *EWSR1* [OTS *EWSR1* (22q12)] y *FOXO1* [OTS *FOXO1* (13q14)] se detectó con sondas de diseño *break apart* doble color (LIVE-LEXEL *in Vitro Experience*). Se desparafinaron los cortes de biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina con xilol 100 % y se rehidrataron con etanol en concentraciones decrecientes. Se procedió según lo descrito previamente en el trabajo de Colli y colaboradores.¹⁷

Para el análisis, se consideró como positivo cuando al menos un 20 % de los núcleos tumorales mostraron señales separadas por una distancia equivalente de, al menos, el diámetro de 1 a 2 señales.

Análisis de transcritos de fusión

Se realizó el aislamiento de ARN a partir de biopsias en fresco y biopsias incluidas en parafina. En el caso de las biopsias en fresco, el ARN total se extrajo con *Trizol*[®] (*Invitrogen*), según instrucciones del fabricante. En el caso de muestras fijadas en formol y embebidas en parafina, se extrajo el ARN con el kit *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE* (*Ambion*), específico para parafinas. Se procedió según las instrucciones del fabricante, con la única salvedad de que se eluyó en 20 uL para favorecer la concentración del ARN extraído.

La cuantificación del ARN presente en las muestras se realizó determinando la absorbancia a 260 nm en el equipo *Nanodrop One* (*Thermo Scientific*), a partir de 1 µl de la muestra. Se registró, además, la absorbancia a 280 y 230 nm para calcular

los índices de pureza del ácido nucleico extraído (A260/A280 y A260/230), considerándose adecuados valores entre 1,8 y 2.

A partir del ARN, se realizó la reacción de retrotranscripción (RT). Se utilizaron cebadores *random* hexámeros y la enzima transcriptasa reversa *Superscript II* (*Invitrogen*). El ARN extraído se desnaturalizó durante 5 minutos a 70°C en presencia de los hexámeros y la mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 90 minutos con buffer de reacción (MgCl₂), inhibidores de RNAsa y la retrotranscriptasa. Finalmente, la mezcla se incubó 5 minutos a 95°C y se guardó a -20°C.

Se verificó en todas las muestras la integridad del ARN extraído mediante la retrotranscripción y la amplificación del gen de la fosfoglicerato quinasa (PGK), que se expresa en forma ubicua en las células, con los cebadores PGKfwd (5'CAGTTTGAGCTCCTGGAAG3') /PGKrev (5'TGCAAATCCAGGGTGCAAGT3') y se obtuvo un producto de amplificación de 247 pb. Si el ARN de PGK se encuentra intacto, se asume que se pueden detectar igualmente los transcritos de fusión. Además, la amplificación por RT-PCR de PGK permitió verificar que la misma correspondiera a ARN y no a ADN contaminante, que da un producto de 600 pb.¹⁸

A partir del ADNc total, se amplificaron por PCR con cebadores específicos los fragmentos correspondientes a los diversos transcritos de fusión, según se detalla en la tabla I. En la figura 1, se ilustra la puesta a punto de la estrategia de detección de los transcritos de fusión para SE utilizando la línea celular TC71, que contiene la translocación *EWS-FLI1 tipo 1* (exón 7 de *EWS* con exón 6 de *FLI1*).

En particular, para aumentar la sensibilidad y especificidad, se aplicó una estrategia de RT-PCR anidada para la detección de transcritos de fusión *PAX3/7-FOXO1*. Todos los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa 2 % teñido con bromuro de etidio.

Los productos obtenidos se purificaron con el reactivo *QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol* (*QIAGEN*). Luego, se secuenciaron de manera automatizada utilizando el reactivo comercial *ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (*Applied Biosystems, USA*) en un equipo *Applied Biosystems 3500*, según instrucciones del fabricante. Se secuenciaron ambas hebras, *forward* y *reverse*, utilizando los mismos cebadores usados para la amplificación inicial (Tabla I). Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando el software *BioEdit* y bases de datos de referencia (*Ensembl, Gen-*

Bank NCBI). También se utilizó el programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) disponible en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).¹⁹

Resultados

En el estudio se incluyeron 13 niños con sospecha de SE y 4 con sospecha de RMS. En total se trabajó sobre 17 biopsias de tumor primario, de las cuales 7 fueron conservadas a -70°C y 12 FFEP. Además, se incluyeron 2 aspirados de médula ósea.

Detección de rearrreglos génicos por FISH

Mediante la técnica de FISH se ensayaron 13 biopsias de tumores con sospecha de SE y se detectó el rearrreglo del gen *EWSR1* solo en 9 (Figura 2a). De todos los casos con rearrreglo, dos mostraron patrones diferentes, a saber: uno presentó el rearrreglo con un patrón de señales atípicas y el otro, monosomía del gen *EWSR1* en un 10 % de los núcleos evaluados (Tabla II). Las PAMO no se estudiaron con esta metodología.

Respecto de los casos con sospecha diagnóstica de RMS, a partir de los estudios morfológicos de la biopsia, se evidenció el rearrreglo del gen *FOXO1* en 3/4 biopsias estudiadas, como lo muestra la tabla III (Figura 2b).

Detección de transcritos de fusión por RT-PCR

Como se resume en las tablas II y III, se extrajo ARN de buena calidad para estudios moleculares, según la determinación del gen control *PGK* en 8/12 (67 %) de las biopsias fijadas en formol y embebidas en parafina. Con respecto a las muestras conservadas a -70°C, en las 7 (100 %) muestras ensayadas el ARN extraído fue apto para el estudio molecular por RT-PCR. De estas, 5 correspondían a biopsias de tumores primarios y 2, a PAMO de pacientes con SE y con sospecha de infiltración de células neoplásicas en médula ósea.

Para SE se detectó por RT-PCR el transcripto de fusión *EWS-FLI1* en 7/13 tumores (54%), de los cuales 2/7 correspondieron al rearrreglo tipo 1 (*EWS* exón 7 con *FLI1* exón 6); 3/7, al tipo 2 (*EWS* exón 7 con *FLI1* exón 5); 1/7 al tipo 4 (*EWS* exón 10 con *FLI1* exón 5) y 1/7, a una translocación inusual que involucra al exón 7 del gen *EWS* con el exón 4 del gen *FLI1*. En la figura 3 se ilustra a modo de ejemplo un electroferograma que muestra esta translocación. Ningún caso presentó translocación *EWS-ERG*. Por otra parte, en las dos muestras de PAMO se confirmó molecularmente la ausencia de infiltración neoplásica observada por histopatología. Cuando se analizaron los casos de RMS, 1/4 resultó no evaluable por técnicas moleculares, ya que la amplificación del gen control, *PGK*, fue negativa. Con respecto a los 3 casos evaluables, en 1/3 se detectó por RT-PCR el transcripto de fusión de los genes *FOXO1-PAX3*, que así confirmó el diagnóstico de RMSA. En otro caso, se confirmó el diagnóstico de RMS embrionario por ausencia de la translocación con ambos métodos, RT-PCR y FISH negativos (fusión negativa). Por último, se observó un resultado discordante en un caso con RT-PCR negativa que por FISH evidenció el rearrreglo de *FOXO1*; en consecuencia, este caso se asumió como RMSE (fusión negativa). Ninguno de los casos estudiados (0/3) evidenció la translocación *FOXO1-PAX7*.

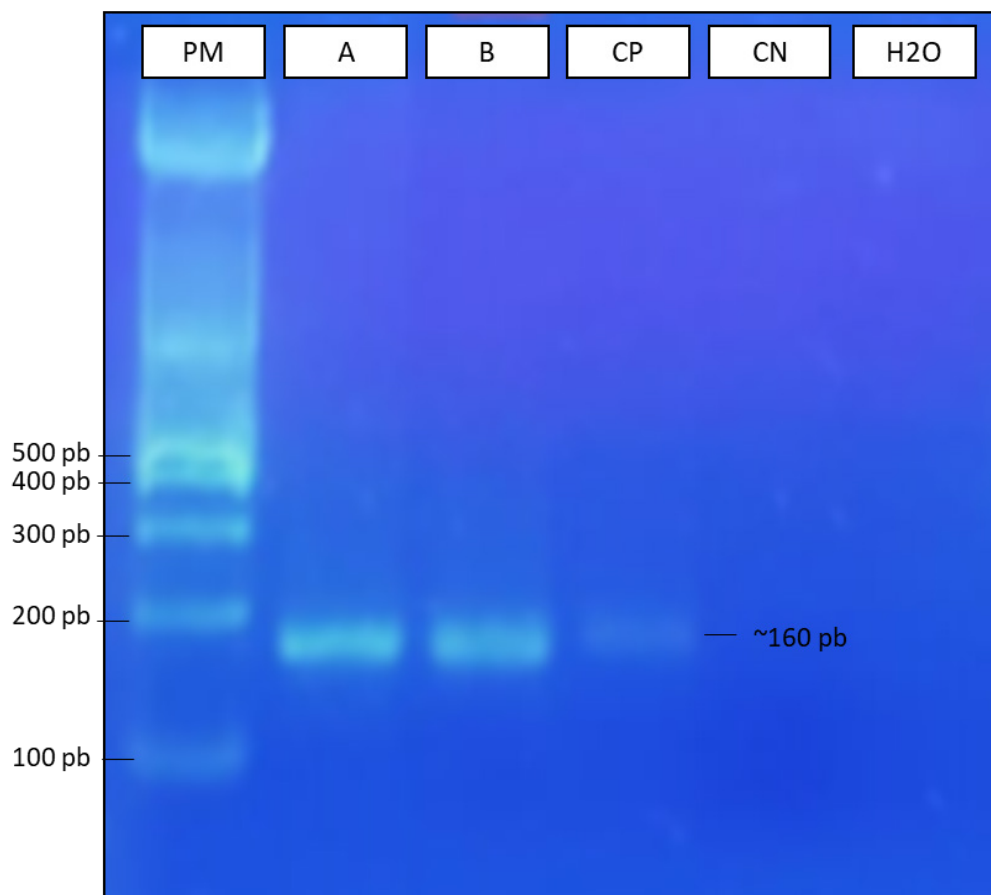
Discusión

Los tumores de la familia de SE y los RMS forman parte del 6% de los casos de cáncer anuales en niños menores de 15 años, según el Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino. La complementación entre diferentes técnicas diagnósticas representa la base de los sistemas de clasificación actuales para estos tumores e incluye entre sus criterios los aspectos clínicos, morfológicos, inmunofenotípicos y genéticos para lograr finalmente un diagnóstico de certeza.²⁰

Los datos aquí presentados son el resultado de la primera experiencia en la detección de mutaciones o alteraciones genéticas en tumores de partes blandas en la población pediátrica que asiste al hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez.

En este estudio se realizaron los diagnósticos mediante dos técnicas: FISH y RT-PCR-secuenciación, sin embargo, no siempre todos los resultados fueron coincidentes. En particular en los tumores de Ewing de esta serie, el abordaje realizado mediante la técnica de FISH nos permitió identificar la translocación del gen *EWSR1*, inclusive en un caso en el que solo un 25 % de núcleos lo presentaba, porcentaje muy cercano al valor de corte por bibliografía. Esta observación fue corroborada por RT-PCR-secuenciación mediante la cual se caracterizó el transcripto de fusión *EWS-FLI1*, lo que pone en evidencia la utilidad de esta técnica molecular para confirmar el diagnóstico, en especial en aquellos casos con valor cercano al corte. Por otra parte, en un caso con diagnóstico morfológico de RMS, se encontró una discrepancia entre FISH y RT-PCR similar a lo descrito por Qian X. y colaboradores.²¹ Mediante la técnica de FISH se evidenció el rearrreglo de *FOXO1* en un 25% de los núcleos, pero el ensayo de RT-PCR resultó negativo para ambos transcritos de fusión *PAX3-FOXO1* y *PAX7-FOXO1*. La discordancia observada llevó a establecer un diagnóstico final de rhabdomyosarcoma embrionario debido a la ausencia del transcripto de fusión. Este resultado discordante plantea diversas situaciones: por un lado, se pueden reconsiderar los valores de corte para la técnica de FISH con respecto al gen *FOXO1*. Por otro lado, dado que se partió de una biopsia incluida en parafina, existe la posibilidad de que el ARN se haya estado parcialmente degradado y esto llevó a una disminución de la sensibilidad de la técnica. Al respecto, es importante tener en cuenta que la reacción de control para el ARN amplificable utilizó como blanco el transcripto del gen *PGK*, correspondiente a una enzima que se expresa a niveles significativamente más altos que los transcritos de fusión *FOXO1*. Esto plantea la posibilidad a futuro de incluir genes reporteros con diferente nivel de expresión del transcripto, según el transcripto de fusión que se quiera diagnosticar.

Por otra parte, es importante señalar que la forma de conservación de la muestra ensayada puede condicionar el resultado obtenido y por ello se debe considerar la calidad de biopsias conservadas en fresco a -70°C vs. FFPE. Se demostró que el ARN obtenido a partir de las biopsias preservadas a -70°C fue de mejor calidad que el de las fijadas en formol e incluidas en parafina en cuanto a la integridad de los ácidos nucleicos. Esto se vio reflejado en la amplificación del gen control *PGK*, elegido especialmente para este tipo de biopsias, ya que en todos los

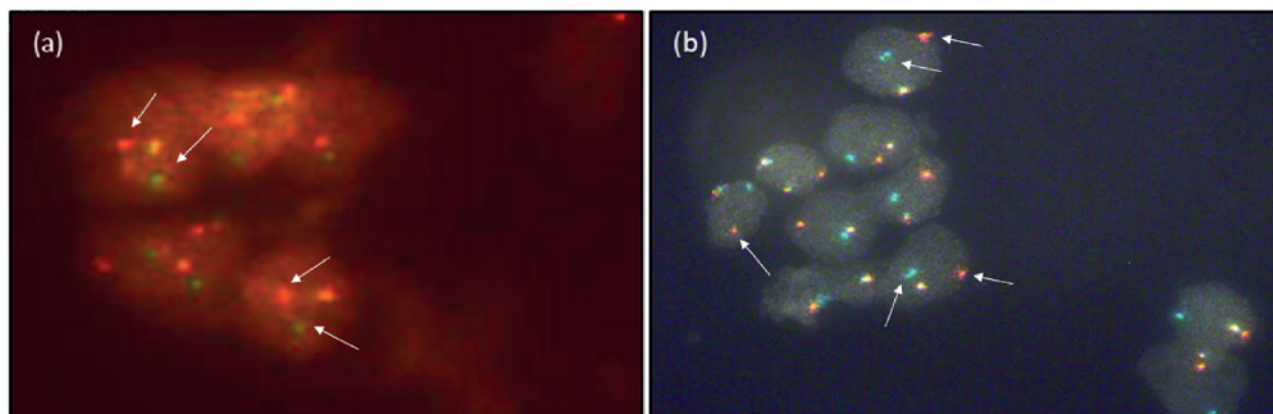
Figura 1. Gel de agarosa 2 % revelado con *GelGreen*.

► PM, marcador de peso molecular 100pb; A y B, Línea celular TC71, las cuales presentan el rearreglo EWS-FLI1 tipo 1 (exón 7 de EWS con exón 6 de FLI1); CP, control positivo; CN, control negativo; H2O, agua.

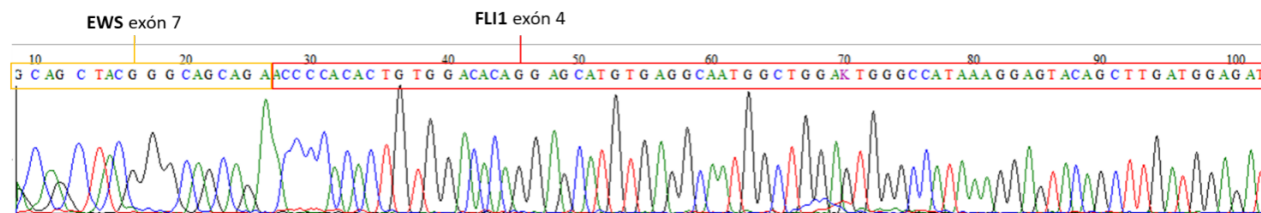
casos en que partimos de material en fresco, se recuperó ARN de calidad, mientras que el ARN recuperado a partir de parafinas fue apto en un 66 %. Otro inconveniente que se puede presentar al ensayar biopsias fijadas es la imposibilidad de detectar transcritos de fusión de mayor longitud, tal como lo describen Bridge y col.²² en su trabajo sobre SE, en aquellas biopsias en las cuales los diversos puntos de translocación del exón *EWS-FLI1* pueden producir transcritos de fusión muy extensos (mayores a 650 pb), dependiendo del sistema de cebadores utilizados, que no se amplifiquen de manera eficiente a partir de tejido fijado y embebido en parafina.

Las dos técnicas aquí utilizadas, FISH y RT-PCR-secuenciación, presentaron ventajas y desventajas diagnósticas. Los ensayos citomoleculares permiten detectar los rearreglos con una sola sonda para un gen específico [por ejemplo, *EWS1* o *FOXO1*] sin la necesidad de conocer el segundo gen de la fusión, lo cual representa una ventaja, dado que permite detectar una alteración genética sin necesidad de conocer el gen con el cual se translocó, pero su sensibilidad es menor que la de las técnicas moleculares. Por su parte, los ensayos de RT-PCR son más sensibles, pero dado que es necesario conocer ambos genes que participan de la fusión, hay que diseñar una estrate-

gia específica para cada punto de ruptura. Esto podría ser un inconveniente, por ejemplo, para el SE, donde el gen *EWS* puede translocarse con numerosos genes candidatos. Por lo tanto, se evidencia la importancia de contar con ambas técnicas complementarias en estos casos para arribar al diagnóstico de certeza y así dirigir los tratamientos de manera óptima. Los casos de SE confirmados fueron incluidos en el protocolo de tratamiento específico Euro EWING 2012.²³ En los casos con diagnóstico de RMS, los estudios moleculares nos permitieron realizar su clasificación molecular para incluir a los pacientes con RMSA con fusión de genes positivo en el grupo de alto riesgo e incorporarlos a un régimen terapéutico más intensivo. Cabe señalar también la importancia de secuenciar los genes de fusión detectados, dado que esto permite la identificación certera de los puntos de ruptura de los genes implicados, ya sea en el caso de los SE o de los RMS. La justificación de la secuenciación surge del hecho de que, si bien se requiere de mayor evidencia, la bibliografía sugiere que conocer el tipo de transcrito de fusión generado podría brindarnos información de pronóstico adicional; y este tipo de información solo está disponible con este método.^{22,24} En esta serie en particular, se detectó un rearreglo genético infrecuente en uno de los SE correspondiente a

Figura 2: Microscopía de fluorescencia [100X].

- (a) Hibridación in situ fluorescente (FISH, Fluorescent in situ hybridization) de un tumor correspondiente a un sarcoma de Ewing con sondas break apart para el gen *EWSR1*, donde se observa la separación de las señales en los núcleos neoplásicos; (b) FISH con sondas break apart donde se muestra el gen *FOXO1* rearrreglado/translocado. Flechas blancas: separación de la señal fluorescente, que indica la presencia del rearreglo del gen contra el que se dirigen las sondas.

Figura 3. Gráfico de una secuencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) obtenida por electroforesis capilar (electroferograma).

- Secuenciación del transcrito de fusión entre los genes *EWSR1-FLI1* del exón 7 con el exón 4, respectivamente, en un caso de SE.

la unión del exón 7 del gen *EWS* con el exón 4 del gen *FLI1*.

En lo referente al SE, otros autores han descrito que el transcrito *EWS-FLI1* tipo 1 fue el que se detectó en la mayoría de los casos²⁴⁻²⁶, sin embargo, en la pequeña serie estudiada, aún no se ha observado esa distribución, por lo cual se propone estudiar un mayor número de casos para evaluar el transcrito predominante en los casos de nuestro centro.

Como conclusión final, destacamos que la evaluación conjunta de los resultados mediante la complementación de los estudios moleculares y citomoleculares con los datos morfológicos e inmunohistoquímicos permitió arribar a los diagnósticos definitivos de los casos estudiados y generó la oportunidad de tratamiento adecuado en los casos prospectivos. Respecto de los tumores que fueron analizados en forma retrospectiva, que fueron oportunamente diagnosticados, su reevaluación nos brindó la posibilidad de revalidar las técnicas empleadas, así como de ampliar la información genética de la enfermedad y correlacionar con la evolución de estos pacientes.

Referencias bibliográficas

- Moreno F, Dussel V, Orellana L; ROHA network. Childhood cancer in Argentina: Survival 2000-2007. *Cancer Epidemiol.* 2015; 39(4):505-10.
- Ewing sarcoma. Grünwald TGP, Cidre-Aranaz F, Surdez D, Tomazou EM, de Álava E. *Ewing sarcoma. Nat Rev Dis Primers.* 2018; 4(1):5.
- Barr FG1, Chatten J, D'Cruz CM, Wilson AE, Nauta LE, Nycum LM, et al.

- Molecular assays for chromosomal translocations in the diagnosis of pediatric soft tissue sarcomas. *JAMA.* 1995; 273(7):553-7.
- Llombart-Bosch A, Machado I, Navarro S, Bertoni F, Bacchini P, Alberghini M, et al. Histological heterogeneity of Ewing's sarcoma/PNET: an immunohistochemical analysis of 415 genetically confirmed cases with clinical support. *VirchowsArch.* 2009; 455:397-411.
- Hameed M. Molecular diagnosis of soft tissue neoplasia: clinical applications and recent advances. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2014; 14(8):961-977.
- Dasgupta, R.; Fuchs, J.; Rodeberg, D. Rhabdomyosarcoma. *Semin. Pediatr. Surg.* 2016; 25:276-83.
- Rudzinski ER, Anderson JR, Chi YY, Gastier-Foster JM, Astbury C, Barr FG, et al. Histology, fusion status and outcome in metastatic rhabdomyosarcoma: A report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer.* 2016; 63(4): 634-639
- Arnold MA, Anderson JR, Gastier-Foster JM, Barr FG, Skapek SX, Hawkin DS, et al. Histology, Fusion Status, and outcome in alveolar Rhabdomyosarcoma with Low-Risk Clinical Features: A Report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer.* 2016; 63:634-39.
- Parham DM, Barr FG. Classification of rhabdomyosarcoma and its molecular basis. *Adv Anat Pathol.* 2013; 20(6):387-97.
- Skapek SX, Anderson J, Barr FG, Bridge JA, Gastier-Foster JM, Parhamet DM et al. PAX-FOXO1 fusion status drives unfavorable outcome for children with rhabdomyosarcoma: a children's oncology group report. *Pediatr Blood Cancer.* 2013; 60(9):1411-17.
- Le Deley MC, Delattre O, Schaefer KL, Burchill SA, Koehler G, Hogendoorn PC, et al. Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial. *J Clin*

- Oncol. 2010; 28(12):1982-8.
12. Marino-Enriquez A, Fletcher CD. Round cell sarcomas – biologically important refinements in subclassification. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014; 53:493-504.
 13. Borinstein SC, Steppan D, Hayashi M, Loeb DM, Isakoff MS, Binitie O et al. Consensus and controversies regarding the treatment of rhabdomyosarcoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2018; 65(2):e26809.
 14. Bridge JA. The role of cytogenetics and molecular diagnostics in the diagnosis of soft-tissue tumors. *Mod Pathol.* 2014; 27(1):80-97.
 15. Mertens F, Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. The emerging complexity of gene fusions in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015; 15(6):371-381.
 16. Barr F. Fusion genes in solid tumors: the possibilities and the pitfalls. *Exp Review Mol Diag.* 2016; 16(9):921-23.
 17. Collie S, Furfur L, Room Paparelli E, Maidana M, Martín C, Bordone J, et al. A der(11)t(4;11)(q21;p15) in a T-ALL/LBL patient. *Cancer Genet.* 2016; 209(4):166-70.
 18. Fritsch M, Bridge JA, Schuster AE, Perlman EJ, Argani P. Performance characteristics of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the detection of tumor-specific fusion transcripts from archival tissue. *Pediatric Dev Pathol.* 2002; 6(1):43-53.
 19. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(D1):D41-D47.
 20. Fletcher C, Unni K, Mertens F. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press [Internet] 2002. Disponible en: <https://aaot.org.ar/docs/pdfs/who-classification.pdf>
 21. Qian X, Jin L, Shearer BM, Ketterling RP, Jalal SM, Lloyd RV. Molecular diagnosis of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by RT-PCR and fluorescence in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol.* 2005; 14(1):23-28.
 22. Bridge RS, Rajaram V, Dehner LP, Pfeifer JD, Perry A. Molecular diagnosis of Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor in routinely processed tissue: a comparison of two FISH strategies and RT-PCR in malignant round cell tumors. *Modern Pathology.* 2006; 19(1):1-8.
 23. Anderton J, Moroz V, Marec-Bérard P, Gaspar N, Laurence V, Martín-Broto J, et al. International randomised controlled trial for the treatment of newly diagnosed EWING sarcoma family of tumours – EURO EWING 2012 Protocol. *Trials* 2020; 21:96.
 24. Allegretti M, Casini B, Mandoj C, Benini S, Alberti L, Novello M, et al. Precision diagnostics of Ewing's sarcoma by liquid biopsy: circulating EWS-FLI1 fusion transcripts. *Ther Adv Med Oncol.* 2018; 10:1-9.
 25. Gautam U, Srinivasan R, Rajwanshi A, Bansal D, Marwaha RK, Vasishtha RK. Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction as an Ancillary Molecular Technique in the Diagnosis of Small Blue Round Cell Tumors by Fine-Needle Aspiration Cytology. *Am J Clin Pathol.* 2010; 133(4):633-45.
 26. Van Doorninck JA, Ji L, Schaub B, Shimada H, Wing MR, Krailo MD, et al. Current Treatment Protocols Have Eliminated the Prognostic Advantage of Type 1 Fusions in Ewing Sarcoma: A Report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2010; 28(12):1989-94.

ARTÍCULO ORIGINAL

Rbdomiólisis: causas y consecuencias de CPK elevada desde el laboratorio de análisis clínicos

Rhabdomyolysis: causes and consequences of increased CK

Steccone, Marina Andrea^{1*}; Cattani, Alejandra²; Imbelloni, Mariano Ivan³

¹Departamento de Hematología y Hemostasia, Sanatorio de la Trinidad Mitre. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

²Jefatura y Dirección Técnica del Laboratorio de Análisis Clínicos, Sanatorio de la Trinidad Mitre. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

³Servicio de Terapia Intensiva, Sanatorio de la Trinidad Mitre. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*Contacto: Steccone, Marina Andrea. Departamento de Hematología y Hemostasia, Sanatorio de la Trinidad, Mitre 1237, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina; maruandrea@live.com

Resumen Introducción: la rbdomiólisis es un síndrome clínico que resulta de la necrosis de las fibras musculares con pasaje de sus componentes a la circulación (creatinquinasa, mioglobina, aldolasa). Se define con niveles de creatinquinasa (CK) mayores que 1000 UI/L o cinco veces superiores a su valor normal. Las complicaciones tempranas incluyen disfunción hepática y arritmias, y las complicaciones tardías abarcan la coagulación intravascular diseminada y la injuria renal aguda (IRA). Objetivos: analizar cómo varían los valores de creatinquinasa (CK), según la causa de la rbdomiólisis y evaluar a los pacientes que desarrollan injuria renal aguda (IRA) en el contexto de los picos máximos de dicha enzima. Materiales y Métodos: se procesaron sueros de pacientes atendidos en la guardia con sintomatología compatible con rbdomiólisis. Se les determinó creatinquinasa (CK), urea y creatinina (equipo *Abbott Architect c8000*, 26440). Resultados: se analizaron 15 pacientes (46 % entre 25 y 35 años), de los cuales la mayoría correspondía al género masculino (73 %). Las causas de rbdomiólisis fueron, por orden decreciente de frecuencia: práctica de spinning, politrauma, consumo de cocaína e intoxicación con estatinas. El 46 % de los pacientes evolucionó con injuria renal aguda (IRA). Conclusión: los pacientes que desarrollaron injuria renal aguda (IRA) presentaron valores más elevados de creatinquinasa (CK). El grado de disfunción renal se correlacionó con el valor total de creatinquinasa (CK) alcanzado.

Palabras clave: rbdomiólisis, injuria renal aguda, creatinquinasa, creatinina, spinning, politrauma, cocaína.

Abstract Introduction: Rhabdomyolysis is a clinical syndrome that results from the necrosis of muscle fibers with passage of its components (creatinine kinase [CK], myoglobin, aldolase) into the circulation. It is defined as CK levels greater than 1000 IU/L or five times higher than the normal values. Early complications include liver dysfunction and arrhythmias, whereas late complications include disseminated intravascular coagulation and acute kidney injury. Objective: To analyze how CK values vary depending on the cause of rhabdomyolysis and to evaluate how many of the patients analyzed develop acute kidney injury in the context of the maximum peaks of this enzyme. Materials and Methods: Sera from fifteen patients (without manifestation of basic pathology and/or previous history of disease) who attended the emergency room with compatible symptoms were processed. CK, urea and creatinine were determined with the *Abbott Architect c8000 26440* equipment. The methods used for these determinations were NAC activated for CK, the urease/UV method for urea, and the alkaline kinetic picrate method for creatinine. Results: The analysis of the data showed that 46% of the patients studied were young people between 25 and 35 years old, and that 73% of them were male. The most frequent cause of rhabdomyolysis was the practice of spinning, secondly polytrauma cases, and thirdly cocaine use and statin poisoning. The results also showed that 46% of the patients developed acute kidney injury. Conclusion: Patients who developed acute kidney injury presented higher values of CK, and the grade of renal dysfunction was related to the total amount of CK reached.

Key Words: rhabdomyolysis, acute kidney injury, creatine kinase, creatinine, spinning, polytrauma, cocaine.

Introducción

La rabdomiólisis es, literalmente, la disolución de la fibra de músculo estriado. Este es un síndrome clínico caracterizado por la citólisis y la necrosis de las fibras musculares con pasaje de sus componentes a la circulación (electrolitos, creatinquinasa, mioglobina, aldolasa, lactato deshidrogenasa, alanino aminotransferasa, etc.)¹. Se define con una creatinquinasa (CK) mayor que 1000 UI/L o cinco veces superior a su valor normal.

La CK es una enzima que se encuentra ampliamente distribuida en todos aquellos tejidos que tienen una gran demanda de energía. Es especialmente abundante en el tejido esquelético (70 %, del cual un 98 % es, en su forma, CK-M), en el músculo cardíaco (20 - 30%, del cual 70 % es, en su forma, CK-MM) y en tejido nervioso (5 % - 10%, del cual el 100 % es CK-BB)².

La necrosis masiva se manifiesta como debilidad de las extremidades, mialgias, edema y, comúnmente, como pigmenturia sin hematuria. Como hallazgos en la exploración médica y resultados de laboratorio encontramos hipertermia, fiebre, leucocitosis, mioglobinuria, hipotensión, hipovolemia, sepsis, hipokalemia³. Según detallan Jason Warren y colaboradores, las anomalías electrolíticas que pueden darse debido a la rabdomiólisis incluyen: hiperkalemia, hiperfosfatemia, hiperuricemia, acidosis metabólica con incremento de fracción *anion gap* e hipermagnesemia, principalmente cuando la injuria renal ya se hizo presente³.

Dentro de las complicaciones tempranas, se incluyen la disfunción hepática y arritmias, mientras que entre las tardías se encuentran la coagulación intravascular diseminada y la injuria renal aguda (IRA)⁴. Esta última es la complicación potencial de la rabdomiólisis severa, sin importar si es resultado de un traumatismo u otra causa, y el pronóstico es substancialmente peor, si se desarrolla¹.

Entre los mecanismos expuestos en la patogénesis de la rabdomiólisis, se halla la injuria sarcolémica directa o la depleción de ATP, que lleva a un incremento no regulado del calcio intracelular. Los niveles continuamente altos de calcio ocasionan una contracción persistente y una activación dependiente de calcio de las proteasas y lipasas intracelulares, que resultan en la eventual destrucción de las miofibrillas, el citoesqueleto y las proteínas de membrana, seguida de la digestión lisosomal del contenido de las fibras. Finalmente, se produce la rotura de la red miofibrilar con la desintegración del miocito¹. La mioglobina sólo se libera en el contexto de rabdomiólisis. Esta es una proteína de color rojo oscuro de 17,8 kDa, que es filtrada libremente por el glomérulo. Aparece en la orina cuando el rango entre 0,5 y 1,5 mg es excedido y se observa como una coloración roja amarillada ("orina color té"), cuando los niveles superan los 100 mg/dl¹. Posee actividad tipo peroxidasa debido a su grupo Fe⁺², con lo que su efecto tóxico es directo debido a la generación de especies reactivas del oxígeno, que genera al ser endocitada.

El estudio clínico realizado por Gburek y colegas demues-

tra que la captación de mioglobina a nivel renal es mediada por receptores endocíticos tales como megalina y cubilina. Estos mismos receptores de membrana juegan un papel importante en la nefrotoxicidad como, por ejemplo, en el caso de los antibióticos⁵. No obstante, la mioglobina también contribuye de forma indirecta, puesto que causa obstrucción a nivel del asa de Henle y del túbulo contorneado distal luego de ser filtrada, precipitando junto a la proteína de Tamm Horsfal.

Según Xavier Bosch *et al.*¹, la IRA se desarrolla en varias etapas, que llevan al daño renal permanente como consecuencia de un conjunto de mecanismos. En primer lugar, la vasoconstricción renal está dada por la depleción intravascular debido al secuestro de fluido dentro del músculo dañado, que promueve una activación del sistema renina-angiotensina, vasopresina y el sistema nervioso simpático. En segundo lugar, mediadores renales como la endotelina-1, el tromboxano-A2, el factor de necrosis tumoral, la tromboplastina, causan una disminución del flujo renal asociados a un déficit de óxido nítrico, que causa vasodilatación. Colectivamente, estos mecanismos se unen al efecto oxidante y la respuesta inflamatoria y culminan en el daño renal visto también en otras formas de injuria renal aguda.

El objetivo de este estudio fue analizar cómo varían los valores de CK, dependiendo de la causa de rabdomiólisis y del grupo etario, y evaluar cuántos pacientes desarrollaron injuria renal aguda en el contexto de los picos máximos de dicha enzima. Para ello, tomamos como base una de las definiciones de injuria renal aguda utilizada en el artículo de Peter K. Moore y cols.⁶, en donde, según el consenso internacional, se pueden establecer tres clasificaciones o definiciones de la misma (KDIGO, AKIN, RIFLE), las cuales se han ido modificando a lo largo de los años.

La utilizada en este estudio fue la propuesta por KDIGO (*Kidney Disease Improving Global Outcomes*) que establece el grado de afectación renal sobre la base del aumento de la creatinina sérica. Esta estipula tres estadios dentro de la IRA. En el primer estadio, el valor de creatinina del paciente debe ser entre 1,5 y 1,9 veces mayor con respecto a su valor de base y mantenerse por el lapso de siete días o incrementar su valor de base en 0,3 mg/dL, dentro de las 48 horas. El segundo estadio se caracteriza por un valor de creatinina que se incrementa entre 2,0 y 2,9 veces respecto de su valor de base. En el tercer estadio, el valor de creatinina es 3 veces mayor que su valor de base o bien, la creatinina es mayor que 4 mg/dL, y/o se evidencia el requerimiento de terapia de reemplazo renal⁶.

Materiales y métodos

Este es un estudio retrospectivo, observacional y descriptivo, que se desarrolló entre junio de 2016 y mayo de 2019. Se procesaron sueros de pacientes (sin manifestación de patología de base y/o antecedentes de enfermedad previa) que acudieron a la guardia de emergencias con sintomatología compatible, a los cuales se les realizaron determina-

Tabla I. Valores de creatinina y creatinquinasa en pacientes de 27 a 37 años.

Mujer 27 años		Hombre 29 años		Hombre 30 años		Hombre 37 años		Hombre 30 años		Hombre 30 años		Hombre 33 años	
Spinning		Crossfit		Politrauma		Cocaína		Electrocución		Politrauma		Spinning	
CR (mg%)	CK (UI/L)	CR (mg%)	CK (UI/L)	CR (mg%)	CK (UI/L)	CR (mg%)	CK (UI/L)	CR (mg%)	CK (UI/L)	CR (mg%)	CK (UI/L)	CR (mg%)	CK (UI/L)
0,7	35600	1	10566	1,2	17016	0,8	36934	0,8	8613	1,2	19590	1,2	9663
0,7	20863	1	7758	1	16832	0,8	36700	0,8	8591	1,2	18270	0,9	6431
0,6	20142	1	4155	1	14861	0,8	13543	0,8	6597	1,1	17250	0,9	5177
0,6	20052	1	1425	0,9	14848	0,8	4686	0,8	3937	1,1	15698	0,8	5045
0,6	14900	1	499	0,9	13582			0,8	368	1,1	15480	0,8	3100
0,6	3158	0,9	70	0,8	10609					1,1	14370	0,8	1983
				0,8	7194					1	14321	0,8	1070
				0,7	5041					1	10030		
				0,7	3939					0,9	6381		
				0,7	3161					0,9	5495		
				0,7	2973					0,9	3236		
				0,7	2129					0,9	2487		
				0,7	1944					0,9	2249		
				0,7	1797					0,9	2126		
				0,7	977					0,9	1905		
				0,7	942					0,9	1733		
				0,7	212					0,8	1462		
				0,7	109					0,8	1093		
				0,7	84								
				0,6	76								
				0,6	57								
				0,6	50								
				0,6	49								

► Cr: creatinina; CK: creatinquinasa; mg %: miligramospor ciento; UI: unidades internacionales; L: litro.

ciones de creatinquinasa (CK), urea y creatinina. Se empleó el equipo *Abbott Architect c8000*, 26440. Para dosaje de CK, el método utilizado fue NAC activado; para la determinación de urea, el método fue ureasa/UV y para la creatinina, fue picrato alcalino- cinético.

Muchos de los pacientes resultaron internados en Unidad de Cuidados Críticos debido a la gravedad del caso, mientras que otros permanecieron en Sala General o Guardia de Emergencias con posterior seguimiento de forma ambulatoria. Debido a esto, determinados pacientes, cuyo cuadro revestía gravedad, permanecieron internados, por lo que los controles se realizaron de forma diaria, mientras que otros recibieron controles más espaciados debido a la menor gravedad del cuadro clínico. Las muestras de sangre fueron tomadas por extraccionistas ,que remitían las mismas en tubos BD Vacutainer para suero con gel separador

al laboratorio, donde se procesaban de manera inmediata.

Se consultó al Servicio de Cuidados Críticos del Sanatorio de la Trinidad Mitre con el fin de recopilar información sobre los antecedentes y la historia clínica, así como la evolución y el tratamiento recibido por los pacientes internados por rbdomiólisis. Dichos datos nos fueron indispensables para poder confeccionar las tablas y gráficas, así como para lograr establecer las relaciones entre elevación de la CK y los niveles de creatinina sérica.

No existen conflictos éticos en cuanto a la manipulación de datos, ya que los mismos fueron tratados por personal de salud y médicos tratantes a cargo, quienes mantienen el criterio de confidencialidad correspondiente a las leyes nacionales.

Tabla II. Valores de creatinina y creatinquinasa en pacientes de 42 a 48 años.

Hombre 45 años Cocaína		Hombre 42 años Crossfit		Hombre 46 años Spinning		Mujer 48 años Isquemia intestinal aguda	
CREAT (mg%)	CK (UI/L)	CREAT (mg%)	CK (UI/L)	CREAT (mg%)	CK (UI/L)	CREAT (mg%)	CK (UI/L)
7,8	136640	1	107250	4,6	121900	3,1	65778
7,6	64400	1	74000	4,5	102340	2,7	46285
6,9	57600	0,9	69740	4,3	90620	2,5	26004
6,7	55290	0,9	68440	4,3	54200	2,4	4972
6,6	28800	0,9	65000	4,1	41710	2	649
6,5	11720	0,8	60100	4,1	5162	2	603
6,4	7856	0,8	59540	3,9	4075	1,9	444
6,3	5659	0,8	58480	3,7	2735	1,6	416
6,3	4900	0,8	58413	3,5	2540	1,2	305
6,2	3130	0,8	42513	3,2	1548	0,9	81
6,2	1243	0,7	33509	2,9	1237	0,9	78
6,2	1240	0,7	17957	2,4	884	0,9	65
6,1	1220	0,7	8235	2,1	740		
6,1	826			1,4	563		
5,9	811						
5,7	395						
5,6	390						
5,5	381						
5,3	210						
5,1	175						
5	116						
4,5	115						
3,1	95						
3,1	73						
3	70						
2,9	41						

► Creat: creatinina; CK: creatinquinasa; mg %: miligramos por ciento; UI: unidades internacionales; L: litro.

Resultados

Se analizaron los resultados de laboratorio (dosaje de creatinina sérica, uremia y CK) obtenidos diariamente de quince pacientes, durante su lapso de internación en el Sanatorio de la Trinidad Mitre, entre junio de 2016 y mayo de 2019.

Con los datos obtenidos, se confeccionaron tres tablas en las cuales se agrupó a los pacientes según rango etario, tomando en cuenta que, por ejemplo, en el caso de los pacientes más jóvenes (27 - 37 años) y adultos jóvenes (42 - 48 años) se encuentran como causas más comunes de rabdomiólisis el consumo de cocaína y la práctica de ejercicio extremo; mientras que en los rangos etarios que com-

prenden adultos mayores (57 - 89 años), es muy común encontrarnos con que la causa más frecuente de rabdomiólisis es el consumo de estatinas, TEC (traumatismo encefalocraneano) o incluso politrauma. En la tabla I se incluyen pacientes de 27 - 37 años; en la tabla II, pacientes de 42 - 48 años y en la tabla III, pacientes de 57 - 89 años.

Los datos plasmados en las tablas incluyen valores diarios de CK, uremia y creatinemia para cada paciente. Los valores de estas tres pruebas fueron ordenados de forma decreciente, siguiendo el orden lógico de la evolución del paciente. Es decir, al ingreso del paciente al servicio de terapia intensiva nos encontramos con valores de creatinina, uremia y CK muy elevados, que es lo que se observa en las

Tabla III. Valores de creatinina y creatinquinasa en pacientes de 57 a 89 años.

Hombre 73 años		Mujer 89 años		Mujer 57 años		Hombre 64 años	
Tec leve		Intoxicación medicamentosa		Mialgias		Estatinas /alcohol	
CREAT (mg%)	CK (UI/L)	CREAT (mg%)	CK (UI/L)	CREAT (mg%)	CK (UI/L)	CREAT (mg%)	CK (UI/L)
1,6	63180	1,1	3487	0,8	13698	5,0	45820
1,5	39655	0,9	3106	0,8	12695	4,7	43680
1,1	2709	0,8	2145	0,8	10541	4,7	20040
0,8	749	0,8	2060	0,8	5812	4,5	17220
		0,8	954	0,8	4820	4,4	13470
		0,8	362	0,7	4408	3,8	13150
		0,7	239	0,6	3889	3,8	10862
				0,6	3171	3,2	10680
						2,5	7917
						2,3	7650
						2,1	7258
						1,8	3703
						1,3	1723
						1,2	791

► Creat: creatinina; CK: creatinquinasa; mg %: miligramos por ciento; UI: unidades internacionales; L: litro; TEC: Traumatismo encéfalo craneano.

primeras filas de las tablas. A medida que vamos descendiendo en las filas vemos el estadio de mejora del paciente y, en algunos casos, de resolución de la enfermedad, según el avance del tratamiento recibido tras los días de internación. Acorde con ello, vemos al final de las tablas los valores ya restaurados a su valor de base para cada paciente con los cuales han sido dado de alta.

Se dividió a los pacientes en tres grupos, según rango etario, y se analizaron las distintas causas de rabdomiólisis, como se observa en las tablas I, II y III. El 46 % correspondía a jóvenes de entre 27 y 37 años, el 27 %, a pacientes entre 42 y 48 años, y el 27 % restante, a pacientes de entre 57 y 89 años. El 73 % de los afectados son individuos de género masculino. Tras analizar a los 15 pacientes, la causa más frecuente de rabdomiólisis resultó ser la práctica de spinning (33 %); en segundo lugar, los casos de politrauma (20 %); y el consumo de cocaína (13 %) y la intoxicación con estatinas (13 %), en tercer lugar.

De los quince pacientes analizados, siete de ellos (46 %) evolucionaron con IRA. Solo tres de ellos (20 % de la población estudiada), alcanzaron el tercer estadio de esta, superando valores de creatinina de 4 mg/dL, y requiriendo terapia de reemplazo renal, por lo que fueron internados en Unidad de Cuidados Críticos.

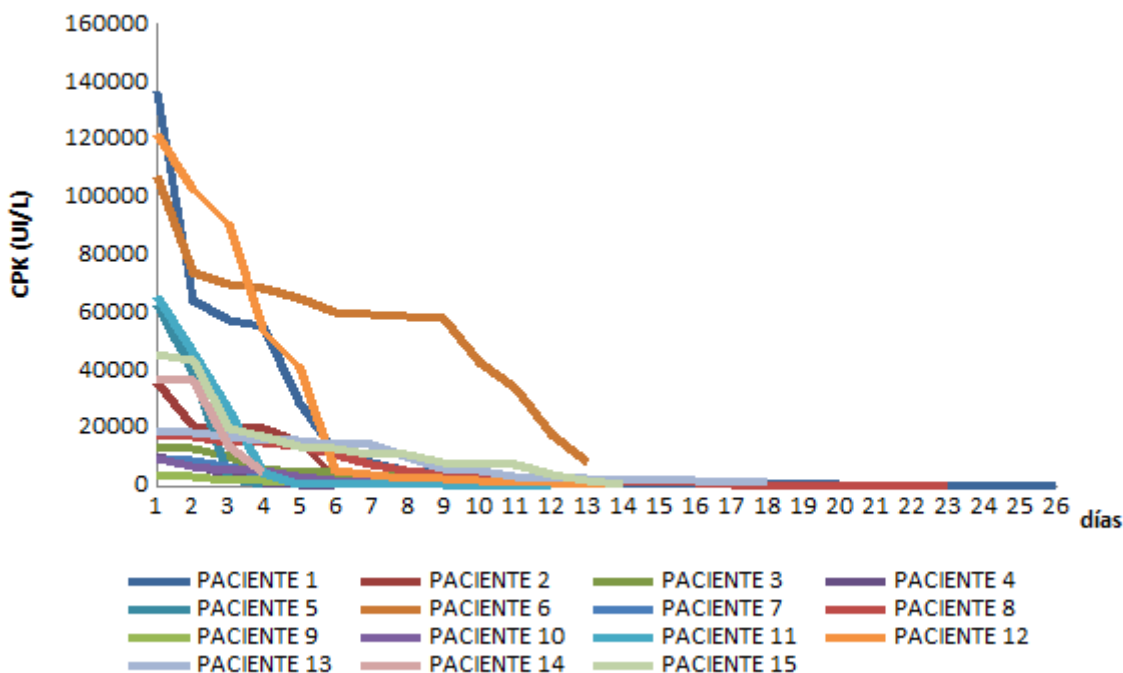
Las causas que registraron los valores de CK y creatinina más elevados fueron el consumo de cocaína y la práctica de spinning.

Discusión

Como dato curioso a destacar, sobresale el citado por Giuseppe Lippi y colegas. En su trabajo hace alusión a que, históricamente, los primeros casos de rabdomiólisis se relataron en atletas y personal militar, pero ahora se acepta universalmente que esta enfermedad, probablemente incluya y afecte a todo aquel que no esté acostumbrado a realizar ejercicio, especialmente a las personas que no están previamente entrenadas².

Con base en lo detallado previamente, podemos establecer que el rango etario en donde más frecuentemente se desarrolla rabdomiólisis corresponde al grupo entre 27 y 33 años, con un 46 % de los casos. Esto parece ser atribuible a las actividades de riesgo que los pacientes realizan (consumo de drogas recreativas o ejercicio desmesurado) y no, a las comorbilidades que presentan, al ser una población joven.

Como analiza Álvarez-Cordoves, hay que tener en cuenta que, en la actualidad, los nuevos patrones de consumo implican a personas socialmente normalizadas, jóvenes y sanas, que recurren con poca frecuencia a los servicios sanitarios, y, cuando lo hacen, es a través del médico de familia. Por esto, la relación médico - paciente debe fomentarse y el médico debe tener formación adecuada sobre estos aspectos. Es importante también mejorar la relación con otros niveles asistenciales necesarios como centros de salud mental y centros específicos para el tratamiento de drogadependencias⁴.

Figura 1. Variación de creatinquinasa en función del tiempo.

► CK, creatinquinasa; UI, unidades internacionales; L, litro.

Si observamos los datos que aporta Laura Alconcher en su artículo, el 24 % de los consumidores de cocaína en cualquiera de sus formas habituales, inhalada, intravenosa o fumada, pueden desarrollar rbdomiólisis. Y cabe destacar como dato no menor, que los pacientes que tengan déficit de pseudocolinesterasa tienen mayor riesgo de desarrollar toxicidad y mostrar reacciones tóxicas, incluso con bajas dosis⁷.

Según el informe de Mastrapasqua S y col. de la Revista Argentina de Nefrología del año 2018, el 5,3 % de la población (el 2,4 % de los varones y el 0,7 % de las mujeres) consumió cocaína alguna vez en su vida. La región patagónica parece concentrar el mayor porcentaje de prevalencia, con un 9 % y la cifra es aún mayor entre el grupo de 25 - 34 años con un alarmante 14 %⁸.

Por otra parte, el género masculino se vio asociado a mayor propensión a evolucionar con rbdomiólisis, lo que podría corresponderse con el hecho sociocultural del tipo de actividades realizadas por los hombres, como ocurre en la casuística del politraumatismo. Según refiere Veenstra J en su trabajo, la preponderancia masculina solo puede ser explicada por una mayor exposición a los factores de riesgo⁹. Siguiendo el mismo lineamiento, se explicarían las causas de rbdomiólisis, ya que la práctica de spinning y el politraumatismo son las más frecuentes.

Si analizamos otros estudios, vemos que la causa más frecuente de rbdomiólisis varía, como ocurre en el trabajo de Veenstra J, en el cual concluye que la más frecuente es la isquemia a consecuencia de eventos vasculares, que

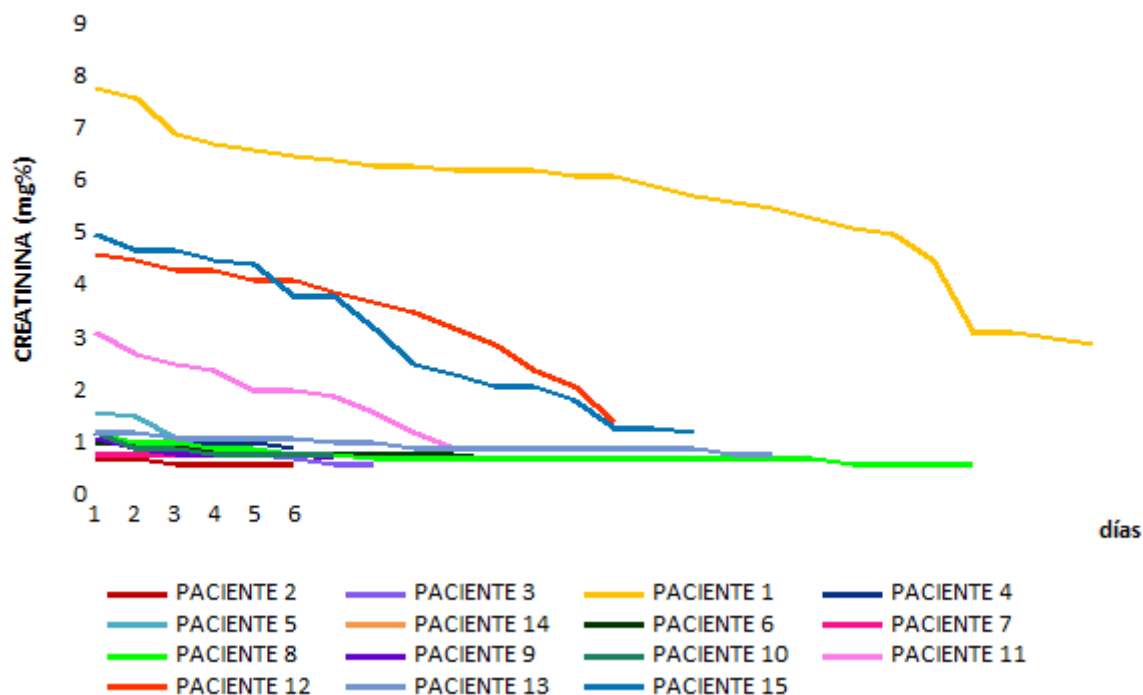
ocasiona a esos pacientes alta mortalidad. Como segunda causa más común aparecen las drogas de abuso y, en último lugar y menos frecuente, el abuso de alcohol en combinación con hipofosfatemia e hipokalemia⁹.

Por otro lado, se evidenció que siete de los quince (46 %) pacientes desarrollaron IRA. Aquí se puede destacar que el músculo dañado, ya sea por excesivo trabajo físico, por vasoconstricción a causa de drogas de abuso, como es la cocaína, o por politraumatismo, libera hacia la sangre circulante el contenido proteico y enzimático de sus células ocasionando el deterioro a nivel de los túbulos renales.

Similar es el resultado que hallaron Veenstra y sus colegas en su estudio, en el cual la injuria renal aguda estuvo presente en un 51 % de los pacientes estudiados y se relacionó con aquellos que presentaron los valores de CK más elevados⁹.

Otro estudio que arrojó conclusiones similares a las de nuestro trabajo, es el de Giorgia Melli y col. en el cual el 46 % de los pacientes desarrollaron injuria renal aguda como complicación principal de la rbdomiólisis, porcentaje levemente aumentado sobre el reportado en otros trabajos (15 - 33 %), según remarca la autora¹⁰.

Como se mencionó al comienzo, entre los agentes liberados durante la rbdomiólisis se encuentra la tromboplastina. La tromboplastina aumenta la posibilidad de coagulación intravascular diseminada, por lo tanto, las posibles bases del tratamiento propuestas por Jesús Duarte y colaboradores son: en primer lugar, la reposición intensiva de líquidos; en segundo término, la corrección intensiva de

Figura 2. Variación de creatinina en función del tiempo.

► mg %, miligramos por ciento.

alteraciones electrolíticas y por último, la vigilancia y tratamiento tempranos de los problemas por coagulopatía¹¹.

Como segundo punto a destacar, se observó que valores más elevados de CK se correlacionan con una mayor posibilidad de desarrollar rbdomiólisis y con un ascenso de la creatinina sérica.

Dependiendo del estadio de injuria renal, de acuerdo con la elevación de creatinina sérica será el tratamiento que se reciba: en los casos más leves, con hidratación y reposo es probable que el paciente recupere su función renal habitual en el transcurso de los días; en otros, será necesaria la hidratación endovenosa o por vía oral como fluidoterapia. Finalmente, en aquellos que alcancen el último estadio de la enfermedad y cursen con injuria renal anúrica, el tratamiento aplicable es el de terapia de reemplazo renal. Así, vemos en nuestro estudio que sólo un 20 % (tres) de los pacientes alcanzaron el último estadio y requirieron internación en Unidad de Cuidados Críticos. Este porcentaje obtenido es muy similar al arrojado por el estudio de Pasquale Esposito y colaboradores, donde concluyen que la injuria renal aguda se desarrolla en un 10 % a 40 % de los pacientes con rbdomiólisis severa, considerando a la mioglobina como causante principal de daño al formar precipitados y contribuir a la acumulación de especies oxidativas a nivel del túbulo proximal¹².

En nuestro caso particular, de esos quince pacientes analizados, solo uno solo resultó muerto (6 %) y fue quien

presentó, como se observa en los datos expuestos en la tabla II, los valores de CK más elevados y requirió terapia de reemplazo renal. Lo expuesto estaría en concordancia con lo registrado en trabajos como el de Giorgia Melli, en donde se aclara que la rbdomiólisis conduce a la muerte en el 10 % de los casos¹⁰.

Por último, queda remarcar que, si bien la definición de rbdomiólisis está basada sobre la elevación de la CK, esta solo es un parámetro indirecto de la lesión muscular y las consecuencias originadas por la mioglobina. Además, de acuerdo con la elevación de la primera se podrá correlacionar la probabilidad de injuria renal que el paciente podrá desarrollar.

Agradecimientos

Se agradece el soporte de la jefatura del Departamento de Análisis Clínicos y la coparticipación en el proceso de investigación y organización de datos, asesoría científica y revisión crítica de los propósitos del estudio, a la Dra. Alejandra Cattani. También se agradece la participación en el ensayo clínico y la recolección de la información al Dr. Mariano Imbelloni y al equipo de Terapia Intensiva del Sanatorio de la Trinidad Mitre y la contribución científica de las Dras. Laura Vrdoljak y Paula Tempra del Servicio de Hematología y Hemostasia del Laboratorio, al igual que la contribución técnica a Celia Flores y Jorge Rivero.

Referencias bibliográficas

1. Bosch X, Poch E, Grau JM. Rhabdomyolysis and Acute Kidney Injury. *N Engl J Med* 2009; 361:62-72.
2. Lippi G, Schena F, Ceriotti F. Diagnostic biomarkers of muscle injury and exertional rhabdomyolysis. *Clin Chem Lab Med* 2018; 57(2):175-182.
3. Warren J, Bumbergs P, Thompson P. Rhabdomyolysis: A review. *Wiley Periodicals. Muscle Nerve* 2002; 25(3):332-47.
4. Álvarez-Cordovés MM, Mirpuri-Mirpuri PG, Pérez-Monje AJ. Rabdomiólisis asociada al consumo de cocaína. *Semergen* 2012; 38(2):102-106.
5. Gburek J, Birn H, Verroust PJ. Renal uptake of myoglobin is mediated by the endocytic receptors megalin and cubilin. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285:451-458.
6. Moore PK, Hsu RK, Liu KD. Management of Acute Kidney Injury: Core Curriculum 2018. *Am J Kidney Dis* 2018; 72(1):136-148.
7. Alconcher L, Meneguzzi MB, Rudolf G, Criado F. Rabdomiólisis asociada a consumo de alcohol y cocaína. *Arc Argent Pediatr* 2008; 106(5):454-57.
8. Mastrapasqua SC, Dell'Orfano MM. Lesiones renales asociadas al consumo de cocaína. *Rev Nefrolog Arg* 2018; 16(3): 1-15.
9. Veenstra J, Smit WM, Krediet RT, Arisz L. Relationship between elevated creatine phosphokinase and the clinical spectrum of rhabdomyolysis. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9(6):637-41.
10. Melli G, Chaudhry V, Cornblath DR. Rhabdomyolysis: an evaluation of 475 hospitalized patients. *Medicine [Baltimore]* 2005; 84(6):377-85.
11. Duarte-Mote J, Díaz-Meza S, Lee VE. Rabdomiólisis e Insuficiencia Renal Aguda. *Med Int Mex* 2007; 23(1):47-58.
12. Esposito P, Estienne L, Serpieri N. Rhabdomyolysis-Associated Acute Kidney Injury. *Am J Kidney Dis* 2018; 71(6):A12-A14.
13. Pavan L, Mashal S, Afua K. Exceptionally high creatine kinase (CK) levels in multicausal and complicated rhabdomyolysis: A case report. *Am J Case Rep* 2017; 18:746-49.
14. Ofer H, Rezkalla SH, Kloner RA. The cardiovascular effects of cocaine. *J Am Coll Cardiol* 2017; 70(1):101-13.
15. Ward MM. Factors predictive of acute renal failure in rhabdomyolysis. *Arch Intern Med* 1988; 148(7):1553-7.
16. Giannoglou GD, Chatzizisis YS, Misirli G. The syndrome of rhabdomyolysis: pathophysiology and diagnosis. *Eur J Intern Med* 2007; 18(2):90-100.
17. Reeder BJ, Wilson MT. Hemoglobin and myoglobin associated oxidative stress: from molecular mechanisms to disease states. *Curr Med Chem* 2005; 12(23):2741-51.
18. Mikkelsen TS, Toft P. Prognostic value, kinetics and effect of CVVHDF on serum of the myoglobin and creatine kinase in critically ill patients with rhabdomyolysis. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005; 49(6):859-64.
19. KIDGO AKI Workgroup. KDIGO clinical practice guideline for AKI. *Kidney Int Suppl.* 2012; 2:1-138.
20. Darmon M, Ostermann M, Cerda J, Dimopoulos MA, Forni L, Hoste E et al. Diagnostic work-up and specific causes of AKI. *Intensive Care Med.* 2017; 43(6):829-40.
21. Moledina DG, Perazella MA. Drug-induced acute interstitialnephritis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2017; 12(12):2046-49.
22. Davison D, Junker C. Advances in critical care for the nephrologist: hemodynamic monitoring and volume management. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3(2):554-61.
23. Cury SC, Chaig D, Connor D. Drug and toxin induced rhabdomyolysis. *Ann Emerg Med* 1989; 18(10):1068-84.
24. Duarte Mote J, Díaz Mesa S, Lee Eng Castro VE. Rabdomiólisis e insuficiencia renal aguda. *Med Int Mex* 2007; 23:47-58.
25. Lima RS, da Silva Junior GB et al: Acute kidney injury due to rhabdomyolysis. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 2008; 19(5):721-29.

ARTÍCULO ORIGINAL

Alteraciones neurológicas y su asociación con el estado inmunoviológico en niños infectados con VIH: 20 años de experiencia

Neurological abnormalities and their association with immunological status in HIV-infected children: 20 years of experience

Fernández, María Eugenia^{1*}; Prado, Damián¹; Sánchez, Ma. Florencia¹; Balbaryski, Jeanette¹; Gaddi, Eduardo¹; Barboni Graciela¹.

¹División Inmunología Clínica, Hospital General de Niños Dr. Pedro de Elizalde. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*Contacto: Fernández Ma. Eugenia. División Inmunología Clínica, Hospital General de Niños Dr. Pedro de Elizalde, Av. Montes de Oca 40, Ciudad Autónoma de Buenos Aires; eugenia.bioq.fernandez@gmail.com.

Resumen Introducción: las manifestaciones neurológicas observadas durante la infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) están directamente relacionadas con la acción del virus sobre el sistema nervioso central o el desarrollo de infecciones oportunistas a consecuencia de la inmunodepresión. Objetivo: describir la prevalencia y tipo de manifestaciones neurológicas y la asociación con el estado inmunoviológico en una población pediátrica infectada con VIH. Materiales y métodos: se analizaron historias clínicas de niños VIH (+) seguidos en el Hospital de Niños Dr. Pedro de Elizalde en los últimos 20 años. Se evaluaron niveles de linfocitos TCD4+ (LT CD4+) y carga viral, al momento de aparición de manifestaciones neurológicas. Resultados: Del total de 487 historias clínicas analizadas, diecinueve pacientes presentaron alteraciones neurológicas confirmadas (3,9%). Doce pacientes (63 %) desarrollaron encefalopatía por VIH, mientras que tres (15,8 %) presentaron infección por *Cryptococcus neoformans*. En cinco pacientes, la aparición de signos neurológicos fue el hallazgo clínico que llevó a la sospecha de infección por VIH. Diecisiete niños (89 %) presentaron inmunosupresión moderada o severa, según la Clasificación Pediátrica del Centro de Control y Prevención de Enfermedades, al momento de la manifestación neurológica. La falta de correcta adherencia al tratamiento antirretroviral fue la característica común en todos los pacientes que presentaron diferentes tipos de manifestaciones neurológicas. Conclusión: la encefalopatía por VIH fue la alteración neurológica con mayor prevalencia en la población pediátrica estudiada. Su presencia, junto con la de otras entidades con diferente grado de afectación del sistema nervioso central, se asociaría a la depleción de LT CD4+ y a la falta de adherencia al tratamiento antirretroviral.

Palabras clave: VIH, pediatría, trastornos neurológicos, linfocitos T.

Abstract Introduction. The neurological manifestations observed in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients are directly related to the activity of the virus on the central nervous system (CNS) or to the development of opportunistic infections as a result of immunosuppression. Objective. To describe the prevalence and type of neurological manifestations and the association with the immunological and virological status in a pediatric population infected with HIV. Materials and methods. Medical records of HIV-positive children followed at Dr. Pedro de Elizalde Children's Hospital, Buenos Aires, Argentina, during the last 20 years were analyzed. CD4 + T- lymphocyte levels and HIV viral load at the time of appearance of neurological manifestations were evaluated. Results. A total of 487 medical records were analyzed. Nineteen (3.9 %) of the patients had neurological abnormalities, twelve (63 %) developed HIV encephalopathy, and three (15.8 %) presented *Cryptococcus neoformans* infection. In five patients, the appearance of neurological signs was the first clinical finding that led to the suspicion of HIV infection. At the time of neurological manifestation, seventeen children (89 %) had moderate or severe immunosuppression, according to the Pediatric Classification of Center for Disease Control and Prevention. The common characteristic in all patients who presented different types of neurological manifestations was the lack of appropriate adherence to antiretroviral treatment. Conclusion. The neurological disorder with the highest prevalence in the pediatric population studied was HIV encephalopathy. Its presence, together with other entities with different degrees of CNS involvement, would be associated with CD4 + T cell depletion and deficient adherence to the antiretroviral treatment.

Key words: HIV, pediatrics, neurological disorders, T lymphocytes

Introducción

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), primordialmente linfotrópico, se caracteriza además, por tener un alto tropismo por el sistema nervioso central (SNC), al que puede infectar provocando distinto tipo de alteraciones neurológicas. Los linfocitos, los monocitos y macrófagos son células diana del VIH; debido a esto, en el SNC la microglía es el tejido más afectado, ya que sus células son portadoras del receptor CD4 y del correceptor CCR5, los cuales permiten que el virus penetre en la célula. Esto lleva a que la microglía secrete citoquinas proinflamatorias que, a su vez, estimulan la síntesis de interleuquinas y prostaglandinas, iniciándose así una cascada de reacciones de tipo inflamatorio.¹⁻⁵

La invasión prematura del SNC afecta el desarrollo cerebral del feto y el niño y resulta en la complicación más común del SNC asociada al virus, la encefalopatía por VIH (EVIH). Este término alude al compromiso primario del cerebro debido al propio retrovirus, en ausencia de otras enfermedades o comorbilidades. La prevalencia de esta alteración en niños que no reciben terapia antirretroviral ha sido reportada entre un 20 y un 60 %; puede aparecer incluso antes de la inmunosupresión severa y ser la primera manifestación del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).⁶⁻⁸

Las alteraciones neurológicas causadas por el VIH en niños pueden ser primarias, directamente relacionadas con la acción del VIH sobre el SNC, o bien, secundarias al desarrollo de infecciones oportunistas, alteraciones metabólicas relacionadas con el VIH y efectos secundarios al tratamiento antirretroviral (TARV).

Si bien el tratamiento ha permitido reducir las secuelas de la infección sobre el SNC, aún no hay un criterio establecido para definir el momento de inicio o implementación en la población pediátrica. Esto ubica en un lugar de riesgo a los niños no tratados o con mala adherencia al tratamiento, particularmente en relación a las secuelas en el SNC.^{9,10}

Como las manifestaciones neurológicas en el contexto de la infección pediátrica por VIH no se encuentran lo suficientemente estudiadas, nuestro objetivo fue describir la prevalencia y el tipo de manifestaciones neurológicas que presentaron los pacientes pediátricos infectados por VIH atendidos en el Hospital General de Niños Pedro de Elizalde. Asimismo, se trató de asociar la presencia de tales alteraciones con el estatus inmunológico medido a través de los niveles de linfocitos T CD4+ (LT CD4+) y la adherencia al TARV.

Materiales y métodos

Se realizó un trabajo retrospectivo, descriptivo, analítico, en donde se evaluaron las historias clínicas de pacientes infectados con VIH, atendidos en la División Inmunología del Hospital General de Niños Pedro de Elizalde, y que presentaron algún tipo de alteración neurológica, en el período 1998 - 2018. Los pacientes fueron agrupados con base en las características clínicas e inmunológicas de las Clasificaciones Pediátricas y para Adolescentes del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) 1994 y 2008.^{11,12}

La adherencia al TARV fue evaluada a través del conteo de la medicación administrada y de datos obtenidos por el profesional a cargo. Los criterios provistos por la Organización Mundial de la Salud fueron usados como guía para estimar la adherencia al TARV. EL cumplimiento fue considerado adecuado cuando la adherencia al tratamiento fue mayor o igual al 95 %.¹³⁻¹⁵

Los niveles de LT CD4⁺ fueron evaluados en sangre entera obtenida con anticoagulante EDTA.K3, mediante citometría de flujo (Citómetro *FACSCalibur Becton Dickinson*). Se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos CD45 y CD3 conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), y CD14 y CD4 conjugados con ficoeritrina (PE). Para el análisis de los datos, se utilizó el programa *CellQuest Pro*, seleccionando la población de linfocitos de acuerdo con el tamaño (FSC) y complejidad (SSC). Los niveles de LT CD4⁺ se expresaron en porcentaje y en valor absoluto.

Los niveles del ácido ribonucleico (ARN) de VIH (carga viral) fueron determinados mediante la técnica de PCR en tiempo real, *Nuclisens EasyQ VIH* versión 1.2 (bioMérieux, *Marcy l'Étoile, France*). Los resultados se expresaron como log₁₀ del número de UI/ml, con un umbral de detección de 50 UI/ml (log < 1.70).

Dado el carácter insidioso de varias de las alteraciones neurológicas y su definición diagnóstica en el mediano plazo, se tomaron como referencia para la selección de los datos de LT CD4⁺ y carga viral aquellas determinaciones más próximas a la aparición de los primeros signos de alteraciones neurológicas.

Consideraciones éticas: el estudio fue realizado en concordancia con las normativas éticas de la Declaración de Helsinki de 1975 y fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Hospital General de Niños Dr. Pedro de Elizalde. Número de registro en el Consejo de Investigaciones en Salud del Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires: 189/2018.

Consideraciones estadísticas: se calculó la prevalencia de patología neurológica en la totalidad de pacientes infectados con VIH en el intervalo de tiempo descripto. Se determinó, además, la frecuencia de los diferentes tipos de alteraciones neurológicas.

Resultados

Prevalencia y características de las patologías neurológicas observadas

Durante un lapso de 20 años, se siguieron 486 pacientes pediátricos infectados con VIH en la División Inmunología del Hospital General de Niños Dr. Pedro de Elizalde. El total de pacientes pediátricos VIH + con alteraciones neurológicas confirmadas fue de 19 y se estableció una prevalencia de 3,9 %, con un intervalo de confianza del 95 %, entre 2,5 y 6,1. Estudios electroencefalográficos, de líquido cefalorraquídeo, evaluación neuropsicométrica y por neuroimágenes fueron los diversos métodos utilizados para la confirmación diagnóstica, según la sospecha clínica.

De los 19 pacientes, 10 eran niños y 9, niñas. Todos ellos adquirieron la infección por VIH por transmisión vertical. La mediana de edad al momento de presentación de la afección neurológica fue de 7,7 años, con un rango de edad entre 3 me-

Tabla I. Frecuencia de las patologías neurológicas en los pacientes VIH+ estudiados.

Patología neurológica	Nº pacientes afectados	Frecuencia (%)
Encefalopatía por VIH	12	63,0
Infección por <i>C. neoformans</i>	3	15,8
Complejo Agiria-Paquirigia	1	5,30
Encefalopatía por Toxoplasmosis	1	5,30
Leucoencefalopatía multifocal	1	5,30
Accidente cerebrovascular	1	5,30

► *C. neoformans*, *Criptococcus neoformans*.

ses y 17 años. Catorce de los niños se encontraban en TARV con diferentes esquemas terapéuticos y niveles de adherencia. El TARV incluyó inhibidores nucleósicos y no nucleósicos de la transcriptasa reversa e inhibidores de proteasa.

En 5 pacientes (26 %), la aparición de los signos neurológicos fue la primera manifestación clínica que llevó a la sospecha de infección por VIH.

Los 19 pacientes presentaron 6 tipos diferentes de patologías neurológicas, de las cuales la EVIH fue la de mayor frecuencia, en concordancia con los datos reportados para la población pediátrica [Tabla I].⁶

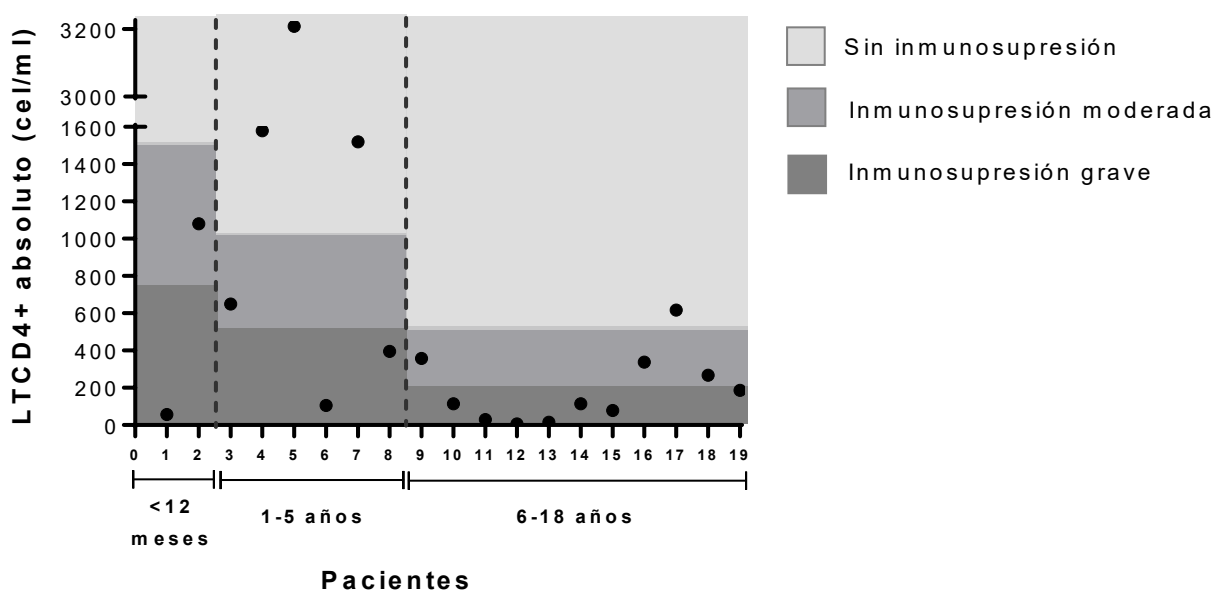
Las manifestaciones neurológicas presentes en las patologías anteriormente mencionadas fueron de diversa índole, observadas como manifestación única o bien en forma combinada. El retraso madurativo y la dificultad en el habla fueron las manifestaciones presentes en mayor número de pacientes [Tabla II].

Estado inmunológico y virológico de la población evaluada

Los niveles de LT CD4+ y de carga viral fueron evaluados en forma retrospectiva, a fin de relacionar dichos niveles con el momento inicial y complejidad del cuadro neurológico observado.

En 13 de los 19 pacientes (68 %), se observó inmunosupresión grave al momento de los primeros indicios de la alteración neurológica. Nueve de los niños de este grupo (69 %), presentaban EVIH. Los pacientes con inmunosupresión moderada representaron el 21 % de la población estudiada (4 pacientes) y solo el 10 % de la misma (2 pacientes) se encontraba sin evidencia de inmunosupresión al momento de las primeras manifestaciones del cuadro neurológico [Tabla III]. De todos modos, a pesar de tener un buen recuento de LT CD4+, estos dos últimos pacientes tenían cargas virales plasmáticas detectables, lo que era indicativo de actividad viral.

Al tener en cuenta los niveles absolutos de LT CD4+ y te-

Figura 1. Clasificación de pacientes VIH+ con alteraciones neurológicas, según criterios del CDC.¹¹

► LTCD4+, linfocitos T CD4+; pacientes VIH+, pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana.

Tabla II. Manifestaciones neurológicas de los pacientes VIH+ con patología neurológica confirmada.

Pac.	Dif. en la marcha	Retraso mad.	Dif. en el habla	Hipotonía	Nistagmus	Hiper reflexia	Otros
1						X	
2						X	
3							Convulsión tónico clónica
4							Parálisis facial
5							Hemicorea
6		X	X				
7		X					
8		X					
9			X				
10	X	X		X		X	
11		X					
12		X	X				Hemiparesia
13	X						
14							Parestesia
15	X	X	X				
16		X		X	X		
17		X					
18							Hemiparesia
19		X	X				
Frec.	3/19	10/19	5/19	2/19	1/19	3/19	6/19

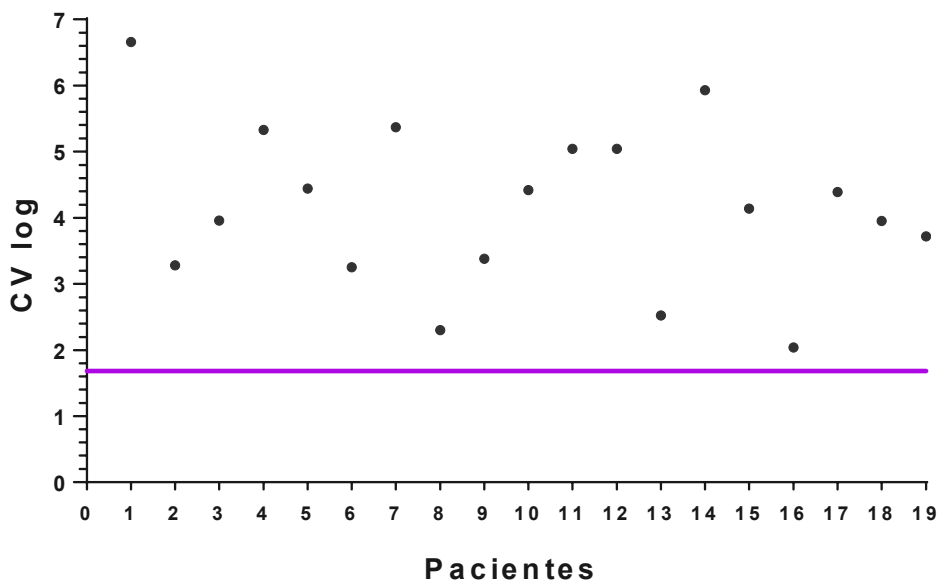
► Pac., paciente; frec., frecuencia; dif. en la marcha, dificultad en la marcha; dif. en el habla, dificultad en el habla; retraso mad., retraso madurativo.

niendo presente los valores de referencia adecuados a la edad, se obtuvo una distribución ligeramente diferente de la observada con los valores porcentuales, si bien la inmunosupresión grave asociada a la primera manifestación neurológica estuvo presente en 10 de los pacientes (Figura 1).

Por otra parte, es de destacar que todos los pacientes presentaron al momento de la aparición de la alteración neurológica cargas virales detectables con valores muy variables y por encima del nivel de detección del método (Figura 2). Esto se asoció de modo directo al hecho de que los pacientes estaban sin TARV, o bien, presentaban una adherencia discontinuada al mismo, evaluada según lo indicado en "Materiales y Métodos".

Discusión

El VIH se caracteriza por un gran neurotropismo, que está en relación con la heterogeneidad del virus. El mecanismo por el cual invade el SNC puede variar de un niño a otro, dependiendo probablemente del estado de maduración cerebral y del progresivo agotamiento inmune asociado a la replicación viral. Este último aspecto es un proceso mucho más complejo que la simple reducción en el número de LT CD4+, con marcadas diferencias observadas en el curso natural de la infección entre niños y adultos. En los adultos, el nivel de virus circulante alcanza un pico durante la infección aguda y disminuye después de 6 a 8 semanas y, en forma ocasional, la carga viral puede ser mantenida en niveles indetectables por varios años. En contraste, en niños sin TARV, la carga viral alcanza niveles muy altos du-

Figura 2. Niveles de carga viral de pacientes infectados con VIH, con alteraciones neurológicas.

► CV, carga viral. La línea de base sobre la ordenada representa el umbral de detección del método de 50 UI/ml correspondiente a $\log < 1.70$.

rante los dos primeros años de vida y no disminuye en forma rápida como en los adultos.^{16,17}

El análisis de las historias clínicas mostró una prevalencia del 3,9 % de diferentes tipos de manifestaciones neurológicas, y la EVIH fue la observada con mayor frecuencia. El riesgo de desarrollar esta patología se incrementa cuando la infección se presenta en edades tempranas y con altas cargas virales. Ambas características, transmisión vertical y niveles incrementados de virus circulante, se dieron en los pacientes estudiados y más del 60 % de los mismos presentaron encefalopatía con diferentes grados de compromiso. Es importante el diagnóstico precoz de la misma, ya que la presencia de la encefalopatía en sí es un indicador de severidad y progresión de la enfermedad. Incluso, la tasa de mortalidad es superior en niños con EVIH, particularmente en aquellos que la hayan desarrollado tempranamente.¹⁸⁻²⁰

Otra característica observada durante la infección por VIH es la presencia de infecciones oportunistas asociadas con el

grado de inmunosupresión. Tres infecciones por *Cryptococcus neoformans* y una por *Toxoplasma gondii*, responsables de las manifestaciones neurológicas, fueron observadas en nuestra población y asociadas a una disminución importante en los niveles porcentuales y absolutos de LT CD4+. Con respecto a la infección por toxoplasma, cabe destacar que la madre de la paciente, infectada con VIH, tuvo un embarazo no controlado y desarrolló toxoplasmosis durante el mismo.

A diferencia de estos pacientes en donde la asociación enfermedad oportunista y manifestación neurológica fue evidente, en otros pacientes estudiados, no siempre fue posible relacionar la presencia de alteración neurológica con el desarrollo de la infección por VIH.

En el paciente que presentó el accidente cerebro vascular, no se pudieron descartar al ingreso trastornos trombóticos familiares, si bien se observó una buena resolución del cuadro neurológico, con el reinicio del TARV. En el niño con complejo agrieta-paquirieta denominado también lisencefalia, no se ob-

Tabla III. Distribución según los niveles porcentuales de LTCD4+ de pacientes infectados con VIH con alteraciones neurológicas.

Estadio inmunológico	Pacientes (N = 19)	Frecuencia (%)
Inmunosupresión grave LTCD4+ < 15 %	13	68
Inmunosupresión moderada LTCD4+ 15-24 %	4	21
Sin evidencia de inmunosupresión LTCD4+ > 25 %	2	11

► LTCD4+: Linfocitos T CD4+; n: número de pacientes

tuvo información de otras posibles noxas durante la gestación, debido a la falta de controles durante el embarazo.

Varios niños presentaron un cuadro neurológico como manifestación de sospecha de la infección por VIH, lo cual es indicativo de la variedad en las formas de presentación de esta infección viral. Esto implica la necesidad de un correcto diagnóstico diferencial frente a otros cuadros clínicos que presenten distintos tipos de manifestaciones neurológicas. El hecho de que 17 de 19 pacientes (89 %) estuvieran, de acuerdo con sus niveles porcentuales de LT CD4+, en un estado de inmunosupresión grave o moderado durante el desarrollo de estas alteraciones sugiere que podría existir una relación entre el estatus inmunológico del niño y la susceptibilidad a desarrollar algún tipo de neuropatología.^{21,22} En el caso de los niveles absolutos, si bien la inmunosupresión grave o moderada se consignó en el 74 % de los niños, las consideraciones con respecto a la relación inmunosupresión y susceptibilidad serían similares. La diferencia observada entre los valores porcentuales y absolutos de LT CD4+ en los niños más inmunocomprometidos se relaciona con la modificación fisiológica por la edad en el número de leucocitos y linfocitos totales, motivo por el cual el valor porcentual de LT CD4+ tiene menor variabilidad que el recuento absoluto.

Este es un concepto que tiene en cuenta la clasificación del CDC, y que establece niveles de referencia para ambos valores, a partir de los cuales se realizan cambios en la conducta terapéutica a fin de anticiparse, por ejemplo, al desarrollo de infecciones oportunistas.¹¹⁻¹²

Previo a la implementación del TARV, la tasa de encefalopatía progresiva por VIH llegaba hasta el 50 % de los pacientes pediátricos. Distintos autores demostraron que la incidencia y prevalencia de EIVH y otras alteraciones neurológicas han disminuido luego de la introducción de las terapias antirretrovirales. También se comprobó que, una vez establecida la encefalopatía, el TARV puede detener su curso e incluso revertirla. Por lo tanto, la supresión de la carga viral y la reconstitución del sistema inmune podrían tener un efecto protector contra el desarrollo de estas alteraciones.⁷

Relacionados directamente con el nivel de inmunosupresión, evaluados a través de los LT CD4+, se encuentran los niveles de virus circulante, asociados, a su vez, con la adherencia al tratamiento antirretroviral. Una característica común en todos los pacientes evaluados fue la falta de adherencia al tratamiento, factor que agrega vulnerabilidad y predispone a diferentes tipos de alteraciones, no sólo neurológicas. El incremento en la incidencia de infecciones oportunistas y neoplasias ha sido reportado en diversos estudios y asociado a un bajo nivel de adherencia.²³⁻²⁴

La adherencia es un proceso dinámico, influido por múltiples variables de tipo social, cultural, cognitivo, económico y de salud. En pediatría, a todas estas variables se les debe sumar el hecho de que los niños no son autosuficientes en relación con la administración de las drogas y esto condiciona enormemente la adherencia, dado que dependen de un tercero responsable que asegure la toma correspondiente. Otro factor influyente está relacionado con las presentaciones farmacéuticas

parcialmente accesibles para la población pediátrica, lo que dificulta, junto con todo lo anteriormente descrito, la adherencia al tratamiento. En nuestro trabajo, todos los pacientes con manifestaciones neurológicas presentaron cargas virales detectables, lo cual implica una profunda falla en la adherencia al tratamiento antirretroviral.

A diferencia de otras enfermedades crónicas, la rápida replicación y mutación del VIH hace que se requieran grados muy elevados de adherencia ($\geq 95\%$) para lograr una supresión duradera de la carga viral. Paterson y colaboradores encontraron que la adherencia en grados menores que el 95 % predijo, independientemente, la resistencia viral, los ingresos hospitalarios y las infecciones oportunistas.²⁵

Es importante destacar que el desarrollo del sistema nervioso en pacientes infectados con VIH podría verse comprometido no solo por la existencia de una noxa, sino por una variedad de factores agregados. Una mala calidad de alimentación, pobres condiciones habitacionales, la falta de estimulación temprana, el contexto sociocultural, entre otras, son variables condicionantes para el adecuado desarrollo del niño. Aquellos expuestos a cualquiera de estas situaciones, son más vulnerables y tienen mayor probabilidad de desarrollar alteraciones neurológicas o neurocognitivas.^{26,27}

El análisis de todos los resultados nos permite sacar varias conclusiones. Se encontraron seis tipos de alteraciones neurológicas diferentes y se calculó su prevalencia en la población estudiada. La EIVH fue la patología más prevalente. En más del 25 % de los niños estudiados, la aparición de signos y síntomas neurológicos fue la primera manifestación clínica que llevó a la sospecha de infección por VIH. Estos pacientes perdieron oportunidades para el diagnóstico temprano y la implementación del tratamiento antirretroviral. En los demás, la presentación neurológica estuvo asociada a fallo virológico y, en su gran mayoría, acompañada con inmunosupresión severa debido a una adherencia subóptima a los antirretrovirales.

La reconstitución del sistema inmune, inducida por la supresión de la carga viral, disminuiría considerablemente la predisposición al desarrollo de patología neurológica y las secuelas asociadas.

Referencias bibliográficas

1. Van Rie A, Harrington P, Dow A, Robertson K. Neurologic and neurodevelopmental manifestations of pediatric HIV/AIDS: A global perspective. *Eur J Paediatr Neurol.* 2007; 11(1):1-9.
2. Wilmshurst J, Burgess J, Hartley P, Eley B. Specific neurologic complications of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in children. *J Child Neurol.* 2006; 21(9):788-94.
3. Nakasujja N, Musisi S, Robertson K, Wong M, Sacktor N, Ronald A. Human immunodeficiency virus neurological complications: an overview of the Ugandan experience. *J Neurovirol.* 2005; 11(Suppl. 3):26-9.
4. Alexaki A, Wigdahl B. HIV-1 infection of bone marrow hematopoietic progenitor cells and their role in trafficking and viral dissemination. *PLoS Pathog.* 2008; 4(12):e1000215.
5. Fischer-Smith T, Bell C, Croul S, Lewis M, Rappaport J. Monocyte/macrophage trafficking in acquired immunodeficiency syndrome encephalitis: lessons from human and non-human primate studies. *J Neurovirol.* 2008; 14(4): 318-26.
6. Donald KA, Hoare J, Eley B, Wilmshurst J. Neurologic complications of pe-

- diatric human immunodeficiency virus: implications for clinical practice and management challenges in the African setting. *Semin Pediatr Neurol* 2014; 21(1):3-11.
7. Mitchell C. HIV-1 encephalopathy among perinatally infected children: neuropathogenesis and response to highly active antiretroviral therapy. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2006; 12(3):216-22
 8. Donald K, Walker K, Kilborn T, Carrara H, Langerak N, Eley B, et al. HIV Encephalopathy: pediatric case series description and insights from the clinic coalface. *AIDS Res Ther*. 2015; 12(1):2.
 9. Belman AL, Muenz LR, Marcus JC, Goedert J, Landesman S, Rubinstein A, et al. Neurologic status of human immunodeficiency virus 1-infected infants and their controls: a prospective study from birth to 2 years. *Mothers and Infants Cohort Study*. *Pediatrics*. 1996; 98(6 Pt 1):1109-18.
 10. Laughton B, Cornell M, Grove D, Kidd M, Springer P, Dobbels E, et al. Early antiretroviral therapy improves neurodevelopmental outcomes in infants. *AIDS* 2012; 26(13):1685-90.
 11. Centers for Disease Control and Prevention. Revised Classification system for human immunodeficiency virus infection in children less than 13 years of age. *MMWR* 1994; 43 [RR-12]:1-10.
 12. Centers for Disease Control and Prevention. Revised Surveillance Case Definitions for HIV Infection Among Adults, Adolescents, and Children Aged <18 Months and for HIV Infection and AIDS Among Children Aged 18 Months to < 13 years. *MMWR Recomm Rep*. 2008; 57 [RR-10]:1-9.
 13. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for using antiretroviral agents among HIV-infected adults and adolescents: recommendations of the Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV. *MMWR Recomm Rep*. 2002;51 [RR-7]:1-56.
 14. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for the use of antiretroviral agents in Pediatric HIV-infection. *MMWR Recomm Rep*. 1998;47 [RR-4]; 1-31.
 15. Paintsil E. Monitoring antiretroviral therapy in HIV-infected children in resource-limited countries: A tale of two epidemics. *AIDS Res Treat*. 2011; 2011:280901.
 16. Mirza A, Rathore M. Pediatric HIV infection. *Adv Pediatr*. 2012; 59(1): 9-26.
 17. Palumbo PE, Kwok S, Waters S. Viral measurement by polymerase chain reaction-based assays in human immunodeficiency virus-infected infants. *J Pediatr*. 1995; 126(4):592-95.
 18. Chiriboga C, Fleishman S, Champion S, Gaye-Robinson L, Abrams E. Incidence and prevalence of HIV encephalopathy in children with HIV infection receiving highly active anti-retroviral therapy (HAART). *J Pediatr* 2005; 146(3):402-07.
 19. Mitchel W. Neurological and developmental effects of HIV and AIDS in children and adolescents. *MRDD Research Reviews*. 2001; 7(3):211-16.
 20. Nozyce M, Hittelman J, Muenz L, Durako S, Fischer M, Willoughby A. Effect of perinatally acquired human immunodeficiency virus infection on neurodevelopment in children during the first two years of life. *Pediatrics*. 1994; 94(6 Pt 1):883-91.
 21. Heaton R, Franklin D, Ellis R, McCutchan J, Letendre S, LeBlanc S, et al. HIV-associated neurocognitive disorders before and during the era of combination antiretroviral therapy: differences in rates, nature, and predictors. *J Neurovirol*. 2011; 17(1):3-16.
 22. Ambrosioni J, Artigues F, Nicolás D, Peñafiel J, Agüero F, Manzano C, et al. Neurological involvement in patients with acute/recent HIV-1 infection. A case-control study. *J Neurovirol* 2017; 23(5):679-85.
 23. Xiao J, Gao G, Li Y, Zhang W, Tian Y, Huang Y, et al. Spectrums of opportunistic infections and malignancies in HIV-infected patients in tertiary Care Hospital, China. *PLoS One*. 2013; 8(10):e75915.
 24. Soh C, Oleske M, Brady T, Spector S, Borkowsky W, Burchett S, et al. Long-term effects of protease-inhibitor-based combination therapy on CD4 T-cell recovery in HIV-1-infected children and adolescents. *Lancet*. 2003; 362(9401):2045-51.
 25. Paterson D, Swindells S, Mohr J, Brester M, Vergis E, Squier C, et al. Adherence to protease inhibitor therapy and outcomes in patients with HIV infection. *Ann Intern Med*. 2000; 133(1):21-30.
 26. Govender R, Eley B, Walker K, Petersen R, Wilmshurst JM. Neurologic and neurobehavioral sequelae in children with human immunodeficiency virus (HIV-1) infection. *J Child Neurol*. 2011; 26(11):1355-64.
 27. Knox J, Arpadi S, Kauchali S, Craib M, Kvalsvig J, Taylor M, et al. Screening for developmental disabilities in HIV positive and HIV negative children in South Africa: Results from the Asenze Study. *PLoS One*. 2018; 13(7):e0199860.

REVISIÓN

Bioquímica de la oxigenación hiperbárica

Biochemistry of hyperbaric oxygenation

Fraga, Pilar María Emilia¹; Jordá-Vargas, Liliana^{1,2*}

¹Asociación Argentina de Medicina Hiperbárica (AAMHEI). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

²Área Microbiología, Centro de Trasplante CRAI-Norte, Centro Único Coordinador de Ablación e Implante Provincia de Buenos Aires (CUCAIBA).

*Contacto: Jordá-Vargas, Liliana. Ceretti 3320 (C.P. 1429), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina; liliana.jorda@aamhei.org

Resumen La terapia de oxigenación hiperbárica (TOHB) consiste en la respiración de altas concentraciones de oxígeno presurizado a más de 1 atm de presión, para lograr un estado de hiperoxia. Esto se traduce en un aumento de concentración de oxígeno a nivel sanguíneo y aumento del radio de perfusión del oxígeno desde los capilares hacia los tejidos, que alcanza incluso a oxigenar zonas hipóxicas. TOHB se utiliza en el tratamiento de distintas patologías que impliquen hipoxia. La meta terapéutica de este tratamiento coadyuvante es la reactivación mitocondrial, el efecto antiinflamatorio, antioxidante y analgésico, la regeneración tisular y la rehabilitación neuronal. El conocimiento de los eventos bioquímicos desarrollados permite analizar en el contexto de cada paciente, los beneficios y aplicaciones de la oxigenación hiperbárica. El objetivo de esta revisión es describir la cascada de eventos bioquímicos terapéuticos, desencadenados por la hiperoxia hiperbárica, que se producen gracias al aumento transitorio de la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS) y nitrógeno (ERNS). Entre los efectos bioquímicos obtenidos con TOHB, se describe la vasoconstricción no hipoxemiante, la angiogénesis y vasculogénesis, la osteogénesis, el efecto antiinflamatorio y antioxidante, la actividad bactericida, el fortalecimiento del sistema inmune, la neuroprotección y la regeneración axonal periférica. TOHB tiene un efecto antiinflamatorio al disminuir el edema, la producción de algunas citoquinas inflamatorias y la adhesión endotelial leucocitaria. La hiperoxia hiperbárica se indica en muchos trastornos relacionados con hipoxia, para la regeneración de diferentes tejidos y cicatrización de heridas complejas, patologías con dolor crónico o base inflamatoria y rehabilitación neuronal y física.

Palabras clave: oxigenación hiperbárica, cámaras hiperbáricas, bioquímica de la hiperoxia.

Abstract Hyperbaric oxygenation therapy (HBOT) consists in providing high concentrations of pressurized oxygen at more than 1 atm of pressure to achieve a state of hyperoxia. This translates into an increase in the concentration of oxygen in the blood, an increase in the oxygen perfusion radius from the capillaries to the tissues, and the oxygenation of hypoxic areas. HBOT is used in the treatment of different pathologies that involve hypoxia. The therapeutic objective of this adjuvant treatment is mitochondrial reactivation, anti-inflammatory, antioxidant and analgesic effects, tissue regeneration and neuronal rehabilitation. The knowledge of the biochemical events developed allows analyzing the benefits and applications of hyperbaric oxygenation in the context of each patient. The objective of this review is to describe the cascade of therapeutic biochemical events triggered by hyperbaric hyperoxia, which are produced by a transient increase in reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS). The biochemical effects induced by HBOT include non-hypoxemic vasoconstriction, angiogenesis and vasculogenesis, osteogenesis, anti-inflammatory and antioxidant effects, bactericidal activity, immune system strengthening, neuroprotection and peripheral axonal regeneration. HBOT has an anti-inflammatory effect by reducing edema, the production of some inflammatory cytokines, and the endothelial adhesion of leukocytes. Hyperbaric hyperoxia is indicated in many hypoxia-related disorders, for the regeneration of different tissues and healing of complex wounds, pathologies with chronic pain or inflammation, and neuronal and physical rehabilitation.

Key words: hyperbaric oxygenation, hyperbaric chambers, biochemistry of hyperoxia.

Introducción

La terapia de oxigenación hiperbárica (TOHB) consiste en respirar altas concentraciones de oxígeno presurizado a más de 1 ATA (atmósfera absoluta). Según la ley de Henry, esto genera un aumento de la disolución del oxígeno en el plasma sanguíneo. La concentración de oxígeno sumada a la presión elevada genera hiperoxia y aumento de generación de especies reactivas de oxígeno, lo que se traduce en distintos efectos sobre la fisiología del individuo.¹

TOHB se desarrolló inicialmente, como tratamiento para la enfermedad de descompresión. Posteriormente, se utilizó para potenciar los efectos de la radio-terapia, tratar infecciones por microorganismos anaeróbicos y envenenamiento.¹ Actualmente, se utiliza como tratamiento para diversas patologías en diferentes centros médicos de salud pública y privada.

El mecanismo terapéutico de TOHB consiste en generar hiperoxia y un aumento temporal de la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas de nitrógeno (ERNs).² De esta manera, resuelve condiciones adversas como la hipoxia y el edema y favorece las respuestas normales o fisiológicas frente a procesos infecciosos e isquémicos.¹

En condiciones controladas (presión y tiempo de exposición), además de generar EROs y radicales libres (RL), TOHB estimula la expresión y actividad de enzimas antioxidantes para mantener la homeostasis del estado "redox" [reductivo/oxidativo] y asegurar la inocuidad del tratamiento.¹⁻³

A nivel celular y en condiciones fisiológicas, el O₂ participa en múltiples procesos y reacciones bioquímicas. La más importante de estas reacciones es la producción de energía, a través de procesos oxidativos, que confluyen en la síntesis de compuestos con enlaces de alta energía, como ATP (Adenosina Tri Fosfato). Todos los procesos vitales requieren de energía para poder ser ejecutados.¹

Los principales efectos beneficiosos producidos por la terapia de oxigenación hiperbárica (TOHB) están relacionados con procesos de transporte de O₂ hemodinámicos e inmunológicos.¹ Cuando se encuentra bloqueada esta producción de energía por falta de transporte o aporte de O₂ a los tejidos (anemias severas, intoxicación con monóxido de carbono), TOHB realiza el aporte, independientemente de la hemoglobina, con el aumento del oxígeno diluido en plasma. Si se necesita un mayor aporte periférico en tejidos isquémicos o en trastornos relacionados con hipoxia, TOHB aumenta la perfusión para llegar a ese tejido isquémico y reactiva la función mitocondrial, disminuyendo la hipoxia e inflamación local.⁴

El objetivo de esta revisión es describir la cascada de eventos bioquímicos terapéuticos desencadenados por la hiperoxia, con base en los efectos fisiológicos que puedan estar involucrados en sus diferentes aplicaciones terapéuticas.

Los efectos bioquímicos más relevantes o más estudiados de la hiperoxia se presentan en la figura 1. A medida que se recaude más evidencia experimental se descubrirán nuevos efectos y potenciales aplicaciones para ser investigadas en ensayos clínicos y ampliar las indicaciones de TOHB.

Materiales y métodos

La búsqueda bibliográfica de los trabajos publicados hasta 2020 se realizó en las bases de datos científicas MEDLINE, EMBASE, Lilacs y Latindex.

Los términos MeSH (*Medical Subject Headings*) utilizados fueron: *Hyperbaric Oxygen Therapy benefits, Hyperbaric Oxygen Therapy effects, Osteogenesis and hyperbaric oxygenation, angiogenesis and HBOT, neurological effects in HBOT, antimicrobial activity of HBOT, antiinflammatory effect of HBOT, oxidative stress and HBOT.*

Los trabajos fueron divididos por efectos. Las autoras estudiaron los trabajos experimentales y realizaron la recopilación de algunos efectos bioquímicos prevalentes en la oxigenación hiperbárica.

Resultados

Vasoconstricción no hipoxemiante

Está demostrado que la TOHB genera vasoconstricción. La vasoconstricción producida se denomina "no hipoxemiante", ya que no contrarresta el efecto de hiperoxia ni profundiza la hipoxia en tejidos isquémicos o mal perfundidos. Esto se debe a que el oxígeno que alcanza el tejido se encuentra disuelto en la sangre. Está favorecida por el aumento de O₂ disponible en pequeñas arterias y capilares y se produce en tejidos sanos, sin deterioro de la oxigenación, estimulando una redistribución de flujo hacia zonas hipoperfundidas.¹ Estudios llevados a cabo por Saltzman en 1968 evidenciaron en exploraciones fundoscópicas realizadas en medio hiperbárico que, a pesar de la acusada vasoconstricción, la hiperoxigenación se manifestaba.⁵

Este mecanismo también está involucrado en la disminución y el alivio del dolor mediado por la reducción en los niveles del vasodilatador óxido nítrico (NO) en condiciones de hiperoxia.¹⁻³ Además, puede ayudar a vencer mecanismos de resistencia vascular presentes en algunas patologías.³ La hiperoxia incrementa la generación de ATP, lo que previene el metabolismo anaeróbico en las células tisulares y la acidosis en los tejidos, asociados con la aparición del dolor.

También se genera vasoconstricción refleja, mediada por el Sistema Nervioso Central a través de receptores -adrenérgicos, que disminuye hasta 20 % el flujo sanguíneo sin alteración del retorno venoso, lo cual se traduce en un beneficio para la reducción del edema a cualquier nivel.⁶

En individuos sanos, la vasoconstricción está mediada por la liberación de endotelina I y TNF α por parte de distintos tipos celulares.⁷ La vasoconstricción periférica causada por la Oxigenoterapia Hiperbárica es un mecanismo compensatorio frente a la hiperoxia, por lo tanto, solo afecta a los vasos sanguíneos de la microcirculación de los tejidos sanos y en diferente medida. Así, se constituye en la mayor respuesta en vasoconstricción en el cerebro.⁸

Cuando existe un estado de hipoxia local (vasculopatía periférica, síndrome compartimental, edema maligno, trastornos metabólicos), este territorio se beneficia del volumen plasmático de los territorios sanos. Esto quiere decir que el tej-

do sano (el rico en oxígeno) sobrealimenta al hipóxico o pobre (efecto *Robin Hood*).⁵ La condición no hipoxemiante de la vasoconstricción periférica se da principalmente por la cantidad de oxígeno diluido en plasma y contribuye de manera significativa a este efecto *Robin Hood*, además de no ser perjudicial para los tejidos sanos.

Angiogénesis y Vasculogénesis

La hiperoxia estimula la neovascularización o formación de nuevos vasos, a partir de dos procesos: estimula el proceso de manera local (angiogénesis) y estimula la llegada y diferenciación de células madre (vasculogénesis).⁹⁻¹¹ En la zona de neovascularización se genera un estrés oxidativo que hace de estímulo a la producción de mediadores del crecimiento celular.²

A nivel bioquímico, en estos mecanismos participan numerosos factores de crecimiento, factores de transcripción, hormonas y mediadores químicos como, por ejemplo: factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) e interleuquinas (IL).¹² En sitios de neovascularización que cursan con hipoxia, la generación de ERO estimula la producción de factores de transcripción (HIF-1: factor inducible por hipoxia)¹¹ a través de la estabilización y dimerización de subunidades HIF-1 α y HIF-1 β .⁹ A su vez, HIF-1 estimula la producción de factores de crecimiento involucrados en neovascularización como FCEV o VEGF (del inglés: *vascular endotelial growth factor*)¹¹, para la migración y diferenciación de células madre a células endoteliales.^{14, 15} Si bien la hipoxia es el principal mecanismo desencadenante de la angiogénesis¹⁶, si esta condición se prolonga en el tiempo, el

proceso de angiogénesis no persiste o se realiza en forma desordenada e inestable (angiogénesis degenerativa).¹¹⁻¹⁵

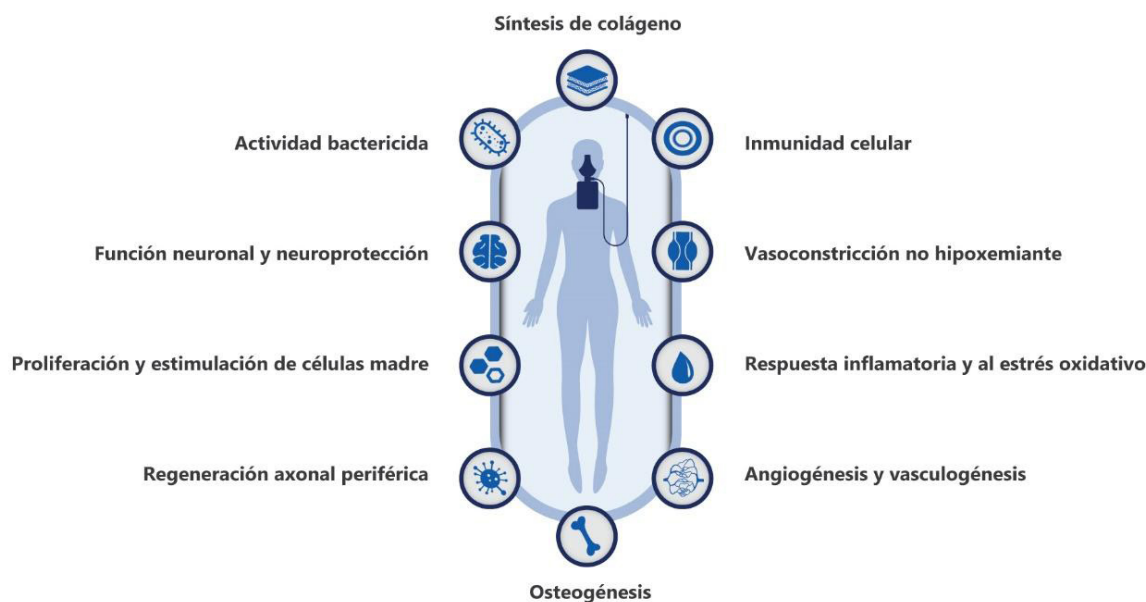
Particularmente, el efecto proangiogénico desencadenado por TOHB está mediado por un aumento sostenido de la producción de VEGF. Esto promueve la formación de nuevos vasos, tras varias sesiones¹⁴, porque, cuando se realiza el tratamiento, se obtienen niveles sostenidos y progresivos de VEGF, lo que provoca angiogénesis efectiva.

Por otro lado, en médula ósea, TOHB tiene efecto sobre la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa medular (ONS), que sintetiza óxido nítrico (NO). La movilización de células progenitoras desde la médula ósea a la circulación periférica es un proceso dependiente de NO. La estimulación de la enzima ONS activa una metaloproteínasa-9 que cliva a SCF (*Stem cell factor*) de la membrana plasmática. Esto permite la movilización de la célula y favorece el proceso de neovascularización y cicatrización.^{13,14} Así, la diferencia principal con el oxígeno normobárico en sí es la capacidad de movilizar las células *stem cell* CD34+ CD45^{dim}, progenitoras de células endoteliales.^{13,14, 16} que se encuentran fuertemente asociadas con la cicatrización de diferentes heridas como pie diabético y quemaduras.^{17,18}

Respuesta antiinflamatoria

Como se comentó previamente, el oxígeno es un mediador fundamental para la cicatrización y regeneración tisular. Su presencia y, especialmente, su aumento reduce el edema tisular. Existe una relación directa entre los niveles de oxígeno disponibles y la tasa de curación. La vasoconstricción favorece la reducción de la respuesta inflamatoria y, por lo tanto, la reducción de edema¹ presente en procesos isquémicos e hipóxicos en tejidos blandos, hueso y cerebro.^{7,19,20} TOHB reduce la

Figura 1. Efectos fisiológicos principales generados con el tratamiento de oxigenación hiperbárica.



► Fuente: Diseño y gentileza de la Asociación Argentina de Medicina Hiperbárica e Investigación (AAMHEI). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

producción y liberación de citoquinas proinflamatorias por neutrófilos y monocitos.^{1,7,20}

La concentración de oxígeno en los vasos compensa la vasoconstricción periférica. De esta manera, se impide la extravasación de líquido al tejido circundante, lo que disminuye el edema.¹

Hay estudios que revelan los efectos de la oxigenación hiperbárica en la producción de citoquinas.⁷ Esta terapia aumenta la producción de FGF y la síntesis de colágeno, disminuye la interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa). Los efectos del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF 1) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) son mayores con TOHB.^{7,21}

VEGF, TGFβ1 (factor de crecimiento transformante beta 1), y PDGFβ (factor de crecimiento derivado de plaquetas) presentan patrones de liberación bifásica. Esto quiere decir que se liberan tanto en hipoxia como hiperoxia. Sin embargo, la liberación estimulada por la hiperoxia es mayor.⁷ Los efectos de TGFβ1 y PDGFβ son mayores con TOHB.^{7,17}

En individuos sanos, la TOHB inhibió en un 50 % el interferón gamma (IFN gamma) en los linfocitos, sin alterar la producción de IL1 e IL2, en ausencia de enfermedad.²²

En cultivos *in vitro* de células endoteliales, se evidenció la disminución de interleuquinas proinflamatorias, principalmente en interleuquina 8 (IL8), calreticulina (CALR) y anexina (ANXA), con un mayor efecto antiinflamatorio con el tratamiento de oxigenación hiperbárica a 1,5 atm versus 2,4 atm. En este mismo trabajo, se logra una disminución de endotelina y de las proteínas de apoptosis CASP1 y TP53 solo a 1,5 atm.²³

El TNF α es el principal estímulo que induce la expresión de las moléculas de adhesión en el endotelio activado. Una vez que el endotelio es activado, la extravasación de los leucocitos transita por los cuatro pasos conocidos: adhesión inicial, rodamiento, firme adhesión y migración transendotelial.

Además de disminuir la activación inflamatoria en el endotelio, con TOHB se observa disminución de la expresión de integrinas en leucocitos (CD18), lo que puede contribuir a disminuir la inflamación en el daño por isquemia-reperusión, al reducir la adhesión leucocitaria para reclutamiento de células inflamatorias en el sitio isquémico.^{19,20}

Existen reportes sobre la acción de TOHB en la modulación del estrés oxidativo, disminución de la adhesión leucocitaria y disminución de la inflamación en modelos animales de isquemia-reperusión, que coloca a la oxigenación hiperbárica en una función importante en el precondicionamiento quirúrgico de cirugías cardíacas y trasplantes.^{24, 25} TOHB puede afectar directamente la apoptosis celular, la transducción de señales y la expresión génica en aquellos tejidos que son sensibles al oxígeno o la hipoxia. El precondicionamiento con oxígeno hiperbárico proporciona un reservorio de oxígeno a nivel celular no solo transportado por la sangre, sino también por difusión desde el tejido intersticial, donde alcanza una alta concentración que puede durar varias horas, mejora la función endotelial y la reología y disminuye la inflamación local y el edema. Principalmente, la protección está dada en la *up*

regulation de las enzimas antioxidantes que protegen el efecto deletéreo del aumento de EROs en el tejido injuriado y evita la apoptosis consecuente.^{24,25}

Huang y col. postulan que el aumento de EROs otorgado por TOHB gatilla las cascadas moleculares que conducen a la protección vía inducción de la proteína de choque térmico 32 (HSP32), como se observó en modelos animales de injurias medulares.²⁶

Con respecto al desarrollo de inflamación crónica, la activación del sistema *Toll Like Receptors* (TLR) contribuye al mantenimiento de la respuesta inflamatoria y a la inflamación crónica en muchas situaciones. TOHB protege la neurona después de la injuria traumática cerebral e incluso en la inflamación crónica de grandes quemados. Así, se evidencia una inhibición de los caminos de señalización NF-kB y de la expresión de estas plataformas moleculares en diferentes tejidos, después de la oxigenación hiperbárica.^{27,28}

Osteogénesis

Se ha demostrado en cultivos *in vitro* que la hiperoxia estimula la diferenciación celular, la formación de depósitos minerales y el metabolismo fosfocálcico.²⁹ La función celular y la remodelación ósea llevadas a cabo por las células osteogénicas son dependientes de oxígeno y se ven estimuladas por la producción de factores de crecimiento en condiciones de hiperoxia.

El efecto angiogénico y la producción de óxido nítrico también colaboran con la formación de hueso y la diferenciación celular^{1,29}, a través de la circulación y movilización de células progenitoras.

Por otro lado, TOHB suprime la formación de osteoclastos actuando en los estadios iniciales de diferenciación, disminuyendo la expresión de proteínas como RANK Y RANKL (el sistema intercelular proteico de ligando y receptor activador del factor nuclear kB encargado de la activación y diferenciación de células óseas). Una desregulación en alguno de sus componentes puede generar una disminución en la masa ósea, lo que puede llevar a desarrollar osteoporosis. Por lo tanto, TOHB disminuye la población de osteoclastos y en consecuencia la resorción ósea.³⁰

También impide la progresión de injurias e infecciones ante lesiones que afectan el tejido óseo porque, al disminuir la inflamación y el edema óseo²⁰ y resolver la infección en osteomielitis, favorece la osteogénesis por un mecanismo secundario.

TOHB en la célula ósea promueve una mayor liberación de fosfatasa alcalina ósea, un mayor depósito de calcio y fósforo, una mayor proliferación de osteoblastos y acelera la formación del nódulo óseo.²⁹

Síntesis de Colágeno

La síntesis de colágeno y la formación de la matriz extracelular son producidas por la proliferación de fibroblastos, lo que favorece la formación del tejido cicatrizal y nuevos vasos y conduce a resolver las condiciones de hipoxia y de la injuria del

tejido hipoperfundido. Este efecto es mediado por la síntesis aumentada de los factores de crecimiento, favorecido por la TOHB a través de radicales libres y EROS.¹⁵

El colágeno es una proteína estructural sintetizada por los fibroblastos mediante reacciones químicas complejas, que incluyen la hidroxilación de los aminoácidos prolina y lisina. La reacción de hidroxilación y el entrecruzamiento de las fibras de colágeno son procesos favorecidos en condiciones de hiperoxia (péptidos y propéptidos del colágeno).^{2,15} El oxígeno es necesario para que la enzima hidroxiprolina produzca los entrecruzamientos y pueda formar moléculas de colágeno estables.

Se ha demostrado en modelos animales que TOHB aumenta la expresión de los genes de procolágeno tipo I en la cicatrización del tendón y de ligamentos e inhibe la expresión de las metaloproteasas.^{32,33} EROs activa la expresión de factores de crecimiento para la activación de los fibroblastos³⁴ y resulta en un aumento significativo de la síntesis de colágeno tipo I y tipo III relacionados con un aumento de óxido nítrico local a nivel de la herida en cicatrización. De esta manera, se concluye que el oxígeno no sólo es importante en la maduración del colágeno, necesario para formar un colágeno estable, sino que aumenta la síntesis de los precursores del colágeno.³⁵

Proliferación y Diferenciación de células madre

TOHB moviliza las células madre progenitoras por la estimulación de la síntesis de Óxido Nítrico NO en la médula ósea.^{13,36} La hiperoxia aumenta el NO *in vivo* en la médula ósea y la liberación de las células progenitoras endoteliales a la circulación periférica, asociadas con una recuperación aumentada de la perfusión de oxígeno en los miembros inferiores. Igualmente, fomenta el cierre de las heridas isquémicas, contribuyendo a la oxigenación, vascularización y cicatrización de las heridas.¹⁶

Por otro lado, la modulación con el oxígeno es una variable clave a considerar en el diseño de los protocolos de diferenciación de células beta- pancreáticas y contribuye a futuras estrategias en el trasplante de células beta maduras³⁷ para tratar la diabetes insulino dependiente. La TOHB mejora el trasplante de células en injertos, la recuperación funcional en el infarto cardíaco y la diferenciación de las células madre mesenquimales.^{38,39}

Modelos experimentales demostraron que TOHB promueve la diferenciación de células madre neuronales en neuronas y oligodendrocitos y reduce el número de astrocitos *in vitro*, posiblemente, por la regulación de las vías dependientes de la señalización de la proteína Wnt3, b catenina y la proteína morfogénica ósea 2 BMP2.⁴⁰

Por otro lado, se observa una *up-regulation* de la proliferación de las células neuronales dentro de los nichos neurogénicos en el cerebro adulto. Más aún, TOHB produce la migración de las células madre al área de injuria, como se demostró en modelo animal de lesiones cerebrales isquémicas y traumáticas.⁴¹

Así, no sólo produce movilización de células madre desde médula ósea, sino que se postula para precondicionamiento (porque disminuye la inflamación neuronal) y diferenciación

de las mismas encélulas endoteliales o neuronales. TOHB es una herramienta fundamental en todas las aplicaciones de la medicina regenerativa.^{40,42, 43}

Modulación del estrés oxidativo

La hiperoxia puede, al mismo tiempo, estimular el aumento de los niveles de EROs y de especies antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas. El efecto del aumento de producción de ERO dependerá del tipo celular, la concentración de O₂ y la duración de la exposición.^{3,44} Este mecanismo se encuentra regulado, cuando la hiperoxia no se acentúa ni prolonga demasiado en el tiempo como para saturar las defensas antioxidantes en tejidos normales y no causar daño ni disfunción celular. Por ejemplo, TOHB puede inducir la protección contra estímulos oxidantes en células endoteliales, a través de sobreexpresión de genes antioxidantes.^{45,46}

Existe evidencia científica del aumento de la respuesta oxidante, generado por la oxigenación hiperbárica, que implica un aumento de la expresión de los genes antioxidantes y citoprotectores. Entre ellos, la proteína de choque térmico (HSPA1A), hemooxigenasa 1 (HMOX1) y metalotioneína 1X (MT1X), con un pico de aumento a las 4 horas posteriores a TOHB.⁴⁵ Más aún, las células endoteliales tratadas con TOHB fueron resistentes al estrés oxidativo, cuando se expusieron a un agente oxidante *in vitro* (tButyl peróxido de hidrógeno) con un efecto citoprotector del oxígeno hiperbárico sobre el estrés oxidativo en las células endoteliales.⁴⁵

Esta condición de aumento de las enzimas antioxidantes ante un estímulo de estrés oxidativo se propone como preventivo protector ante la isquemia en la médula espinal y cerebro. Así, TOHB es utilizada como precondicionamiento quirúrgico porque aumenta la tolerancia a la isquemia.⁴⁷

Se evidencia un aumento de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD) con TOHB a diferentes presiones en cerebro, pulmón y eritrocitos⁴⁸ y un aumento en la actividad de SOD y glutatión peroxidasa (GSH) en tejido hepático. También se observó la regeneración por aumento de marcadores de índices mitóticos y proliferación celular (MI y PCNA) con una disminución del marcador de estrés oxidativo malondialdeído (MDA) en los hepatocitos de modelos experimentales animales.⁴⁹

Las enzimas glutatión Peroxidasa 4 (GPX4) y lactoperoxidasa (LPO) se hiper- expresaron en la injuria por isquemia-reperusión pulmonar en modelo animal, con reducción de los genes de estrés oxidativo en animales tratados con TOHB.⁵⁰ Se sugirió que, además de regular la inflamación en la injuria por reperusión, TOHB regula el daño producido por las especies reactivas de oxígeno en exceso.

Actividad Bactericida

En la patología infecciosa en general, la hiperoxia generada es activa contra el *biofilm* bacteriano y aumenta la actividad bactericida de muchos antibióticos contra estos microorganismos.^{31,51,52}

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) que se generan

a partir de la hiperoxia tienen actividad bactericida *per se*, además de contribuir a aumentar la inmunidad celular por promover la fagocitosis.^{2,31} La combinación de TOHB y el tratamiento antimicrobiano adecuado pueden contribuir a disminuir la resistencia bacteriana que se genera por la exposición a niveles de EROs subletales cuando el tratamiento convencional antibiótico es administrado sin el oxígeno como potente adyuvante activador.^{51,52,53}

Por otro lado, las especies reactivas de oxígeno (producidas por la metabolización del oxígeno principalmente en la mitocondria) tienen actividad bactericida *per se* y tienen acción directa contra los lípidos de la membrana bacteriana, la síntesis de proteína y sobre el ADN microbiano.³¹

Se reconocen cuatro EROS principales: superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\bullet OH$) y oxígeno singlete ($1O_2$). Ellos tienen diferentes cinéticas y niveles de actividad.⁵⁴ Los efectos de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 son menos agudos que los de $\bullet OH$ y $1O_2$, ya que los primeros son menos activos y pueden ser detoxificados con enzimas endógenas antioxidantes (enzimáticas como catalasa y superóxido dismutasa y no enzimáticas), que son inducidas por el estrés oxidativo. Sin embargo, ninguna enzima puede desintoxicar el radical $\bullet OH$ o $1O_2$. Esto lo hace extremadamente tóxico y letal, agudo para la bacteria⁵⁴, por lo que se considera el aumento temporal de estos EROS y radicales libre con un efecto bactericida directo contra diferentes bacterias, además de contribuir a la capacidad fagocítica de macrófagos y leucocitos e inhibir toxinas bacterianas involucradas en la patogénesis infecciosa.^{31,54}

Respuesta inmune frente a infecciones

En condiciones adversas como la hipoxia (característica en heridas) aumenta la predisposición a infecciones. Algunas células del sistema inmune como los neutrófilos o polimorfonucleares (PMN) responden a la presencia de patógenos y ejercen su acción bactericida a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), radicales libres y la acción de peroxidasa.^{1,31}

Estos mediadores químicos dañan el ADN y oxidan proteínas y lípidos (lipoperoxidación), inhibiendo el metabolismo bacteriano. En este contexto, se doblega el ataque frente a microorganismos anaerobios, incapaces de producir sus toxinas en condiciones de hiperoxia (α -toxinas producidas por esporas de *Clostridium perfringens*, agente causal de la gangrena gaseosa).^{31,55}

Además, TOHB ejerce acción sinérgica con algunos antibióticos y facilita el transporte dependiente de O_2 a través de la pared celular bacteriana.³¹

Cabe destacar que el efecto de TOHB sobre la inmunidad celular reduce el daño celular mediado por glóbulos blancos en tejidos isquémicos, sin afectar sus funciones inmunes (degranulación, fagocitosis), por lo tanto, no genera compromiso inmune para el paciente.^{1,31} En este contexto, el acondicionamiento o pretratamiento con TOHB protege del daño por reperfusión postisquémica (inhibe la síntesis de 2-integrinas, responsables del secuestro y la adhesión de neutrófilos circu-

lantes a las paredes de los vasos).¹

La acción de TOHB en el fortalecimiento de los efectos antimicrobianos del sistema inmune se produce por una cascada de interleuquinas y balance del mismo. El aumento de los niveles de O_2 durante TOHB causa algunos efectos celulares como la supresión de mediadores proinflamatorios, disminución transitoria en la proporción de células T CD4: CD8 y la aparición de apoptosis de linfocitos y neutrófilos. En general, estos efectos pueden mejorar los mecanismos antimicrobianos del sistema inmunitario y la curación de infecciones.^{1,31}

La respuesta inmune celular adaptativa contra virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) podría ser favorecida con el oxígeno hiperbárico, disminuyendo la carga viral y la replicación en monocitos periféricos en estudios experimentales.⁵⁶

Neuroprotección y regeneración axonal periférica

TOHB favorece la función neuronal, ya que revierte el estado de hipoxia, disminuye el edema, favorece la neuroplasticidad y la elongación axonal.^{1,2} Dentro de los mecanismos involucrados en la neuroprotección por TOHB, cabe destacar la preservación de la producción y las reservas energéticas celulares, la regulación del estrés oxidativo, la disminución de la acumulación y la adhesión de neutrófilos.^{7,19,57} A nivel mitocondrial, es capaz de restaurar la polaridad y permeabilidad de la membrana, mejorando la eficiencia en la producción de energía y la modulación de los niveles de ERO.^{19,58,59}

Además, al favorecer la vasoconstricción y la antiinflamación, TOHB disminuye la presión intracraneal y el volumen del líquido céfalorraquídeo.^{19,60} Sumados a una mejor oxidación tisular y normalización del estado oxidativo a nivel mitocondrial, estos efectos ayudan a preservar la función y actividad neuronal y protegen de la apoptosis en algunas enfermedades neurodegenerativas.^{15,61,62} En el mecanismo de neuroprotección están involucrados fenómenos tales como la proliferación celular. Como vimos anteriormente, TOHB es capaz de movilizar células progenitoras de la médula ósea, que se diferencian en células neurotrópicas⁶³, síntesis de factores neurotrópicos, elongación axonal y mielinización.¹⁹

TOHB también estimula la neuroplasticidad a través de la regeneración axonal periférica. Así, se evidencia crecimiento axonal en los nervios injuriados, estimulando la mitocondria de la placa neuromuscular y la neuroplasticidad.^{63,64} Más aún, la restauración del impulso nervioso de las neuronas periféricas y la estimulación de la mitofagia de las mitocondrias dañadas contribuyen a disminuir el dolor neuropático en diversas patologías.⁶⁴⁻⁶⁷

La neuroprotección se favorece con TOHB por una conjunción de procesos como la angiogénesis, el aumento de la oxigenación y la mejora de la función y metabolismo neuronal. La disminución de la neuroinflamación crónica desencadena en simultáneo proteínas con efectos neuroprotectores, tal como se demostró en modelo animal de enfermedad de Alzheimer^{61,62} que resultó en efecto antioxidante y antiinflamatorio para frenar la progresión de algunas enfermedades neurodegenerativas.

Conclusión

La hiperoxia producida por TOHB genera un aumento transitorio de las especies reactivas de oxígeno. La respuesta fisiológica a este aumento es la modulación del estrés oxidativo, que genera aumento de las enzimas antioxidantes en diferentes órganos.

Por otro lado, TOHB tiene un efecto antiinflamatorio directo al disminuir el edema, la producción de algunas citoquinas inflamatorias y la adhesión endotelial leucocitaria. Este efecto antioxidante y antiinflamatorio, en parte, se debe a la regulación de la actividad mitocondrial en todos los tejidos.

Por otro lado, la activación mitocondrial también genera aumento de elongación axonal y favorece el funcionamiento neuronal.

La respuesta del organismo al oxígeno hiperbárico también resulta en la movilización de células madre, síntesis de colágeno, angiogénesis y vasculogénesis. Por esto, la regeneración de tejidos y su contribución a la cicatrización de heridas crónicas es una de las principales aplicaciones terapéuticas de TOHB.

En conclusión, conocer todos los efectos bioquímicos descritos de TOHB permite influir en las indicaciones médicas para ser estudiadas en ensayos clínicos en diferentes patologías. La meta terapéutica de este tratamiento coadyuvante es la activación mitocondrial, el efecto antiinflamatorio, antioxidante y analgésico, la regeneración tisular y la rehabilitación neuronal.

Referencias bibliográficas

- Gill A, Bell CN. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *QJM* 2004; 97(7):385-95.
- Thom SR. Hyperbaric oxygen: its mechanisms and efficacy. *Plast Reconstr Surg* 2011; 127(1):131-41.
- Thom SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *Journal of applied physiology* 2009; 106(3):988-95.
- Cannellotto M, Romero-Feris D, Pascuccio MM, Jordá-Vargas L. Aplicaciones médicas de las cámaras de oxigenación hiperbárica de nueva generación. *Asoc Med Arg* 2019; 131(4):12-20.
- Subbotina N. *Medicina Hiperbárica*. 1a Ed. Buenos Aires, Argentina, Altuna Impresiones. 2006
- Sánchez-Rodríguez EC, García Covarrubias L. Terapia con oxigenación hiperbárica. *Conceptos Básicos*. *Gac Med Mex* 2000; 136(1):23-30.
- Al-Waili NS, Butler GJ. Effects of hyperbaric oxygen on inflammatory response to wound and trauma: possible mechanism of action. *Scientific-WorldJournal* 2006; 3(6): 425-41.
- Sunkari VG, Lind F, Botusan IR, Kashif A, Liu ZJ, Ylä-Herttua S, Brismar K, Velazquez O, Catrina SB. Hyperbaric oxygen therapy activates hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), which contributes to improved wound healing in diabetic mice. *Wound Repair Regen* 2011; 23(1):98-103.
- Piantadosi CA. Pulmonary Gas Exchange, Oxygen Transport and Tissue Oxigenation. In Neuman TS, Thom SR. *Physiology and Medicine of Hyperbaric Oxygen Therapy*. Saunders. Elsevier.
- Godman CA, Chheda KP, Hightower LE, Perdrizet G, Shin DG, Giardina. Hyperbaric oxygen induces a cytoprotective and angiogenic response in human microvascular endothelial cells. *Cell Stress Chaperones* 2010; 15(4):431-42.
- Hopf HW, Gibson JJ, Angeles AP, Constant JS, Feng JJ, Rollins MD, Zamirul Hussain M, Hunt TK. Hyperoxia and angiogenesis. *Wound Repair Regen* 2005; 13(6):558-64.
- Thackham JA, McElwain DL, Long RJ. The use of hyperbaric oxygen therapy to treat chronic wounds: A review. *Wound Repair Regen* 2008; 16(3):321-30.
- Milovanova TN, Bhopale VM, Sorokina EM, Moore JS, Hunt TK, Hauer-Jensen M, Velazquez OC, Thom SR. Hyperbaric oxygen stimulates vasculogenic stem cell growth and differentiation in vivo. *J Appl Physiol* 2009; 106:711-28.
- Thom SR, Bhopale VM, Velazquez OC, Goldstein LJ, Thom LH, Buerk DG. Stem cell mobilization by hyperbaric oxygen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(4):1378-86.
- Sheikh AY, Gibson JJ, Rollins MD, Hopf HW, Hussain Z, Hunt TK. Effect of hyperoxia on vascular endothelial growth factor levels in a wound model. *Arch Surg* 2000; 135(11):1293-97.
- Castilla DM, Liu ZJ, Velazquez OC. Oxygen: Implications for Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2012; 1(6):225-30.
- Banyard DA, Adhuni BO, Melkumyan S, Araniago CA, Widgerow AD. Endothelial progenitor cells and burn injury - exploring the relationship. *Burns Trauma* 2016; 19(4):1-7.
- Thom SR, Hampton M, Troiano MA, Mirza Z, Malay DS, Shannon S, et al. Measurements of CD34+/CD45-dim Stem Cells Predict Healing of Diabetic Neuropathic Wounds. *Diabetes* 2016; 65(2):486-97.
- Nazario J, Kuffler DP. Hyperbaric oxygen therapy and promoting neurological recovery following nerve trauma. *Undersea Hyperb Med* 2011; 38(5):345-66.
- Bosco G, Vezzani G, Mrakic Sposta S, Rizzato A, Enten G, Abou-Samra A, et al. Hyperbaric oxygen therapy ameliorates osteonecrosis in patients by modulating inflammation and oxidative stress. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2018; 33(1):1501-05.
- Yuan LJ, Niu CC, Lin SS, Chan YS, Yang CY, Chen WJ, et al
- Additive effects of hyperbaric oxygen and platelet-derived growth factor-BB in chondrocyte transplantation via up-regulation expression of platelet-derived growth factor-beta receptor. *J Orthop Res* 2009; 27(11):1439-46.
- Granowitz EV, Skulsky EJ, Benson RM, Wright J, Garb JL, Cohen ER, Smithline EC, Brown RB. Exposure to increased pressure or hyperbaric oxygen suppresses interferon secretion in whole cultures of healthy humans. *Undersea Hyperb Med* 2002; 29(3):215-25.
- Kendall AC, Whatmore JL, Winyard PG, Smerdon GR, Eggleton P. Hyperbaric oxygen treatment reduces neutrophil-endothelial adhesion in chronic wound conditions through S-nitrosation. *Wound Repair Regen* 2013; 21(6): 860-68.
- Jones SR, Carpin KM, Woodward SM, Khiabani KT, Stephenson LL, Wang WZ, Zamboni WA. Hyperbaric oxygen inhibits ischemia-reperfusion-induced neutrophil CD18 polarization by a nitric oxide mechanism. *Plast Reconstr Surg* 2010; 126(2):403-11.
- Hentia C, Rizzato A, Camporesi E, Yang Z, Muntean DM, Sndesc D, Bosco G. An overview of protective strategies against ischemia/reperfusion injury: The role of hyperbaric oxygen preconditioning. *Brain Behav* 2018 30; 8(5):e00959.
- Huang G, Diao, J, Yi H, Xu L, Xu, J, Xu, W. Signaling pathways involved in HSP32 induction by hyperbaric oxygen in rat spinal neurons. *Redox Biol* 2016; 10:108-18.
- Meng XE, Zhang Y, Li N, Fan DF, Yang C, Li H, Guo DZ, Pan SY. Hyperbaric Oxygen Alleviates Secondary Brain Injury After Trauma Through Inhibition of TLR4/NF- κ B Signaling Pathway. *Med Sci Monit* 2016; 26; 22:284-8.
- Hentia C, Rizzato A, Camporesi E, Yang Z, Muntean DM, Sndesc D, Bosco G. Early Hyperbaric Oxygen Treatment Attenuates Burn-Induced Neuroinflammation by Inhibiting the Galectin-3-Dependent Toll-Like Receptor-4 Pathway in a Rat Model. *Int J Mol Sci*. 2018; 27: 19(8).
- Wu D, Malda J, Crawford R, Xiao Y. Effects of hyperbaric oxygen on proliferation and differentiation of osteoblasts from human alveolar bone. *Connect Tissue Res* 2007; 48(4):206-13.
- Al Hadi H, Smerdon GR, Fox SW. Hyperbaric Oxygen Therapy Suppresses Osteoclast Formation and Bone Resorption. *J Orthop Res* 2013; 31:1839-44.
- Memar MY, Yekani M, Alizadeh N, Baghi HB. Hyperbaric oxygen therapy: Antimicrobial mechanisms and clinical application for infections. *Biomed Pharmacother* 2019; 109:440-47.
- Ishii Y, Miyanaga Y, Shimojo H, Ushida T, Tateishi T. Effects of Hyperbaric

- Oxygen on Procollagen Messenger RNA Levels and Collagen Synthesis in the Healing of Rat Tendon Laceration. *Tissue Eng* 1999; 5(3):279-86.
34. Takeyama N, Sakai H, Ohtake H, Mashitori H, Tamai K, Saotome K. Effects of hyperbaric oxygen on gene expressions of procollagen, matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in injured medial collateral ligament and anterior cruciate ligament. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2007; 15:443–52.
 35. Tandara AA, Mustoe TA. Oxygen in Wound Healing More than a Nutrient. *World J. Surg* 2004; 28: 294–300.
 36. Gurdol F, Cimsit M, Oner-Iydogan Y, Kocak H, Sengun S, Yalcinkaya-Demirsoz S. Collagen Synthesis, Nitric Oxide and Asymmetric Dimethylarginine in Diabetic Subjects Undergoing Hyperbaric Oxygen Therapy. *Physiol. Res* 2010; 59: 423-29.
 37. Goldstein L, Gallagher KA, Bauer SM, et al. Endothelial Progenitor Cell Release into Circulation Is Triggered by Hyperoxia-Induced Increases in Bone Marrow Nitric Oxide. *Stem Cells* 2006; 24:2309–18.
 38. Cechin S, Alvarez-Cubela S, Giraldo JA, Molano RD, Villate S, et al Influence of In Vitro and In Vivo Oxygen Modulation on b Cell Differentiation From Human Embryonic Stem Cells. *Stem cells Translational Medicine* 2014; 3:277-89.
 39. Khan M, Meduru S, Mohan IK, Kuppusamy ML, Wisel S, Kulkarni A, Rivera BK, Hamlin RL, Kuppusamy P. Hyperbaric oxygenation enhances transplanted cell graft and functional recovery in the infarct heart. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 47(2): 275–87.
 40. Fu TS, Ueng SW, Tsai TT, Chen LH, Lin SS, Chen WJ. Effect of hyperbaric oxygen on mesenchymal stem cells for lumbar fusion in vivo. *BMC Musculoskelet Disord* 2010; 11:52.
 41. Liska GM, Lippert T, Russo E, Nieves N, Borlongan CV. A Dual Role for Hyperbaric Oxygen in Stroke Neuroprotection: Preconditioning of the Brain and Stem Cells. *Cond Med* 2018; 1(4):151-66.
 42. Yang Y, Wei H, Zhou X, Zhang F, Wang C. Hyperbaric oxygen promotes neural stem cell proliferation by activating vascular endothelial growth factor/extracellular signal-regulated kinase signaling after traumatic brain injury. *Neuroreport* 2017; 28(18):1232-38.
 43. Peña-Villalobos I, Casanova-Maldonado I, Lois P, Prieto C, Pizarro C, Lattus J, Osorio G, Palma V. Hyperbaric Oxygen Increases Stem Cell Proliferation, Angiogenesis and Wound-Healing Ability of WJ-MSCs in Diabetic Mice. *Front Physiol* 2018 Jul 30; 9:995.
 44. Shandley S, Wolf EG, Schubert-Kappan CM, Baugh LM, Richards MF, Prye J, Arizpe HM, Kalns J. Increased circulating stem cells and better cognitive performance in traumatic brain injury subjects following hyperbaric oxygen therapy. *Undersea Hyperb Med* 2017; 44(3):257-69.
 45. Moen I, Stuhr LE. Hyperbaric oxygen therapy and cancer—a review. *Targeted oncology*. 2012; 7(4): 233-42.
 46. Godman CA, Joshi R, Giardina C, Perdizet G, Hightower LE. Hyperbaric oxygen treatment induces antioxidant gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1197(1):178-83.
 47. Daruwalla J, Christophi C. Hyperbaric oxygen therapy for malignancy: a review. *World journal of surgery* 2006; 30(12): 2112-31.
 48. Nie H, Xiong L, Lao N, Chen S, Xu N, Zhu Z. Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against spinal cord ischemia by upregulation of antioxidant enzymes in rabbits. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26(5):666-74.
 49. Oter S, Korkmaz A, Topal T, Ozcan O, Sadir S, Ozler M, Ogur R, Bilgic H. Correlation between hyperbaric oxygen exposure pressures and oxidative parameters in rat lung, brain, and erythrocytes. *Clin Biochem* 2005; 38(8):706-11.
 50. Ozden TA, Uzun H, Bohloli M, Toklu AS, Paksoy M, Simsek G, Durak H, Issever H, Ipek T. The Effects of Hyperbaric Oxygen Treatment on Oxidant and Antioxidants Levels during Liver Regeneration in Rats. *Tohoku J Exp Med* 2004; 203: 253-65.
 51. Ikejiri AT et al. Effect of hyperbaric oxygenation on the expression of glutathione peroxidase 4 and lactoperoxidase genes in the lung of isogenic mice after ischemia/reperfusion injury in the small bowel. *Acta Cir Bras* 2018; 33(5):462-71.
 52. Kolpen M, Mousavi N, Sams T, Bjarnsholt T, Ciofu O, Moser C, Kühl M, Hoiby N, Jensen PØ. Reinforcement of the bactericidal effect of ciprofloxacin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm by hyperbaric oxygen treatment. *Int J Antimicrob Agents* 2016; 47(2):163-7.
 53. Lima FL, Joazeiro PP, Lancellotti M, de Hollanda LM, de Araújo Lima B, Linares E, Augusto O, Brocchi M, Giorgio S. Effects of hyperbaric oxygen on *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to imipenem and macrophages. *Future Microbiol* 2015; 10(2):179-89.
 54. Jordá-Vargas L. El oxígeno hiperbárico: un aliado de los antimicrobianos. *Boletín de la Asociación Argentina de Microbiología*. 2020; 227: 18-22.
 55. Vatanserver F, de Melo WC, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A, Chandran R, Karimi M, Parizotto NA, Yin R, Tegos GP, Hamblin MR. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol Rev*. 2013; 37(6):955-89.
 56. El Oumri AA, Badi H, Khaloufi S Hyperbaric Oxygen Therapy: Focus Open J Emerg Med 2018; 6:15-20.
 57. Budiarti R, Kuntaman, Nasronudin, Suryokusumo, Khairunisa SQ. In Vitro Studies on Heme Oxygenase-1 and P24 antigen HIV 1 Level after Hyperbaric Oxygen treatment of HIV-1- infected on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). *Afr J Infect Dis* 2018; 7:12(1):1-6.
 58. Edwards ML. Hyperbaric oxygen therapy. Part 2: application in disease *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2010; 20(3): 289-97.
 59. Efrati S, Ben-Jacob E. Reflections on the neurotherapeutic effects of hyperbaric oxygen. *Expert review of Neurotherapeutics* 2014; 14(3): 233-6.
 60. Rockswold SB, Rockswold GL, Zaun DA, Liu J. A prospective, randomized phase II clinical trial to evaluate the effect of combined hyperbaric and normobaric hyperoxia on cerebral metabolism, intracranial pressure, oxygen toxicity, and clinical outcome in severe traumatic brain injury: clinical article. *J Neurosurg* 2013;118(6):1317-28.
 61. Huang L, Obenaus A. Hyperbaric oxygen therapy for traumatic brain injury. *Medical gas research* 2011; 1(1):1.
 62. Zhao B, Pan Y, Wang Z, Xu H, Song X. Hyperbaric Oxygen Pretreatment Improves Cognition and Reduces Hippocampal Damage Via p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in a Rat Model. *Yonsei Med J* 2017; 58(1):131-38.
 63. Zhang LD, Ma L, Zhang L, Dai JG, Chang LG, Huang PL, Tian XQ Hyperbaric Oxygen and Ginkgo Biloba Extract Ameliorate Cognitive and Memory Impairment via Nuclear Factor Kappa-B Pathway in Rat Model of Alzheimer's Disease. *Chin Med J [Engl]* 2015; 20; 128(22):3088-93.
 64. Ince B, Arslan A, Dadaci M, Oltulu P, Bilgen F. The effect of different application timings of hyperbaric oxygen treatment on nerve regeneration in rats. *Microsurgery* 2016; 36(7):586-92.
 65. Ramallo L, Verdini F, Jordá-Vargas L. Terapia de oxigenación hiperbárica en el tratamiento del dolor. *Rev. Hosp. Ital. B. Aires* 2019; 39(3): 81-5.
 66. Liu YD, Wang ZB, Han G, Jin L, Zhao P. Hyperbaric oxygen relieves neuropathic pain through aKT/Tsc2/mTOR pathway activity to induce autophagy. *J Pain Res* 2019;12:443-51.
 67. Zhao B, Pan Y, Xu H, Song X. Hyperbaric oxygen attenuates neuropathic pain and reverses inflammatory signaling likely via the Kindlin-1/Wnt-10a signaling pathway in the chronic pain injury model in rats. *J Headache Pain* 2017; 18(1):1-8.
 68. Li F, Fang L, Huang S, Yang Z, Nandi J, Thomas S, Chen C, Camporesi E. Hyperbaric Oxygenation Therapy Alleviates Chronic Constrictive Injury-Induced Neuropathic Pain and Reduces Tumor Necrosis Factor-Alpha Production. *Anesth Analg* 2011; 10(10):1-8.

Anuncie en ByPC...

Bioquímica y Patología Clínica



Revista de la Asociación Bioquímica Argentina
Incorporada al Latindex y a la Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal (REDALYC)

Venezuela 1823 - Piso 3 - CP (1096)
Buenos Aires - Argentina
Tel/ fax: 4384-7415 - Tel: 4381-2907
e-mail: info@aba-online.org.ar
www.aba-online.org.ar

The collage features several covers of the journal 'Bioquímica y Patología Clínica'. The covers include:

- Top Left:** Cover Vol. 74, No. 1, 2010. Title: "Médula ósea de paciente de 4 meses de edad con Síndrome de Chediak Higashi". Features a microscopic image of bone marrow cells.
- Top Middle:** Cover Vol. 75, No. 2, 2011. Title: "Congreso Nacional Residentes Bioquímicos". Features a portrait of a man in a suit and glasses.
- Top Right:** Cover Vol. 75, No. 1, 2011. Title: "69° Congreso Argentino de Bioquímica: Los Grandes Síndromes Clínicos: De la sospecha clínica al diagnóstico bioquímico molecular". Features an illustration of a couple dancing.
- Bottom Middle:** Cover Vol. 74, No. 2, 2010. Title: "Personajes destacados: Eugenia Sacerdote de Lustig". Features a photograph of an elderly woman in a lab coat in a laboratory setting.

Each cover includes the journal title, volume and issue information, and the ABA logo. The background of the collage is decorated with a molecular structure graphic.

CURSOS ABA

ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA

CICLO LECTIVO 2021

PROGRAMA DE EDUCACIÓN CONTINUA

Informes e inscripción

Secretaría de la Asociación Bioquímica Argentina

Venezuela 1823 Piso 3 (1096) – Buenos Aires -Argentina

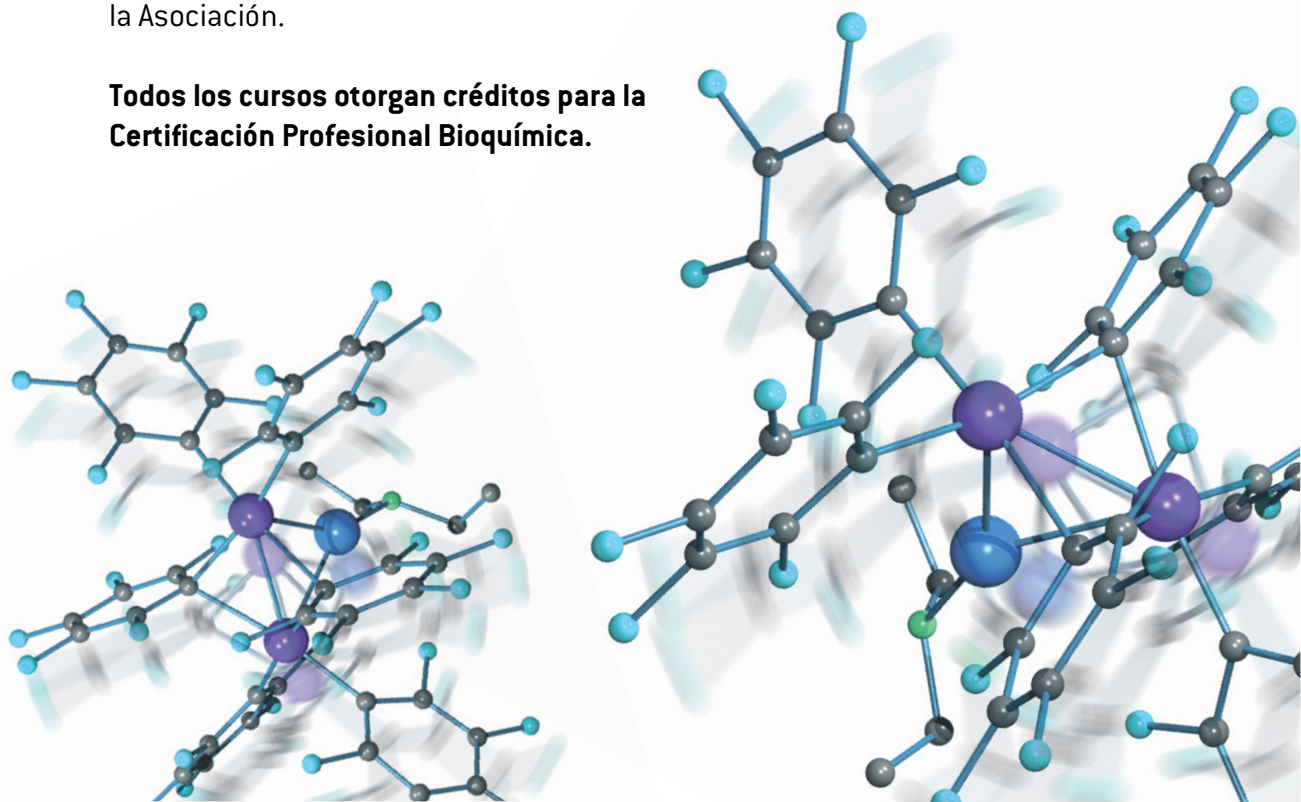
Tel: (011) 4381-2907 Telefax: (011) 4384-7415 - De 15 a 19 Hs.

Consultas administrativas: [cursos@aba-online.org.ar](mailto: cursos@aba-online.org.ar)

Programas completos disponibles en: <http://www.aba-online.org.ar/>

Nota para no socios: abonando la primera cuota social y adhiriendo al débito automático por tarjeta, podrá acceder a los cursos ABA como socio, recibiendo además todos los beneficios de la Asociación.

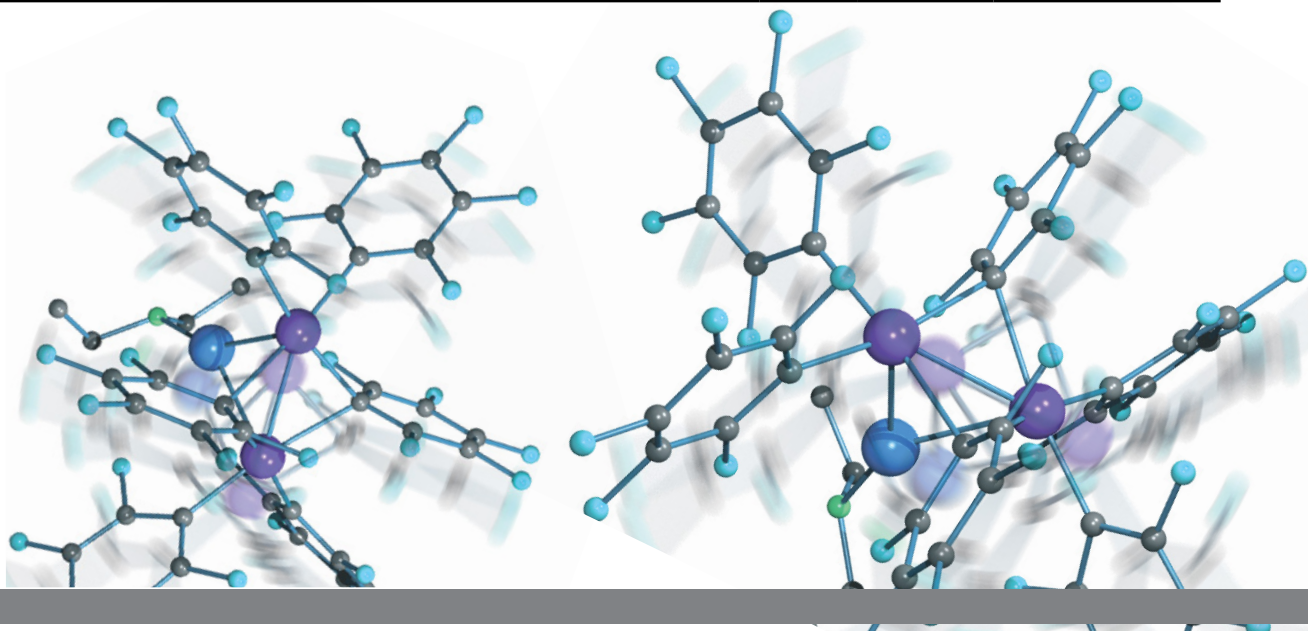
Todos los cursos otorgan créditos para la Certificación Profesional Bioquímica.



PROGRAMA DE EDUCACIÓN CONTÍNUA ABA 2021

	NOMBRE DEL CURSO	2021	DURACION	DIRECTOR/ES
1	DIAGNÓSTICO DE LAS HEMOGLOBINOPATÍAS Y TALASEMIAS: "A partir de casos clínicos"	29 de marzo	CUATRIMESTRAL	Dra. Mónica Aixalá Dra. Silvia González
2	ENFOQUES PARA EL CONTROL DE BACTERIAS MULTIRRESISTENTES. "Una batalla impostergable"	29 de marzo	CUATRIMESTRAL	Dra. María José Rial Dr. Jaime Kovenski
3	EVALUACIÓN DE LA PAREJA INFERTIL. "Rol e importancia del Laboratorio"	5 de Abril	ANUAL c/15 días	Dr. Eduardo Mormandi Dra. Patricia Otero
4	CURSO ANUAL DE ACTUALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA	5 de Abril	ANUAL	Dra. Silvia B. González Dra. Viviana Osta
5	CURSO ANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA	5 de abril	ANUAL	Dra. María José Rial Dr. Jaime Kovenski
6	EL LABORATORIO FRENTE A LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES: Evaluación de factores de riesgo lipídico, no lipídico y de marcadores del evento agudo	19 de abril	CUATRIMESTRAL	Prof. Dr. Fernando Brites
7	LOS MISTERIOS DE LA ENFERMEDAD COVID-19 PROVOCADA POR EL NUEVO CORONAVIRUS (SARS-CoV-2) (NUEVO)	12 de abril	SEMESTRAL	Dra. Silvia B. González Dra. Alejandra Svartz
8	EL LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGÍA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA. Actualización de los procedimientos de diagnóstico.	12 de Abril	ANUAL 1 módulo x mes 2 clases x módulo	Dra. Patricia Otero
9	BIOLOGÍA MOLECULAR: APLICACIONES CLÍNICAS	12 de abril	ANUAL	Dr. Luis Bastos Dra. M. de la Paz Domínguez
10	BASES MOLECULARES Y CELULARES DEL FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA INMUNE	12 de Abril	5 meses	Dr. Fernando Chirido
11	ACTUALIZACION EN DIAGNÓSTICO VIRAL	12 de abril	CUATRIMESTRAL	Dra. María José Rial Dra. Alejandra Svartz
12	CURSO INTEGRAL SOBRE LÍQUIDOS DE PUNCIÓN con Tópicos de Urgencia	12 de abril	CUATRIMESTRAL	Dr. Luis Palaoro
13	CALIDAD ANALÍTICA: Implementación de un Sistema de Gestión de Calidad: Herramientas prácticas para el Laboratorio Bioquímico	19 de abril	SEMESTRAL	Dr. César Collino Dr. César Yené Dr. Pablo Lujan Dr. Claudio Abiega
14	BIOQUÍMICA DE LOS DESÓRDENES DE LA INFANCIA reemplaza al de pediatría (NUEVO)	19 de abril	ANUAL	Dra. Sandra Ayuso Dra. Viviana Osta
15	HERRAMIENTAS PARA EL RECONOCIMIENTO CITOMORFOLÓGICO DE LOS LINFOCITOS EN TRASTORNOS BENIGNOS Y MALIGNOS: ¿linfocitos reactivos o sospecha de neoplasia?	26 de abril	TRIMESTRAL	Dra. Claudia Ayuso
16	LA BIOQUÍMICA EN EL BANCO DE SANGRE	26 de abril	SEMESTRAL	Dr. Jorge Rey
17	"HERRAMIENTAS DEL LABORATORIO PARA LA DETECCIÓN PRECOZ DE LOS ERRORES CONGÉNITOS DEL METABOLISMO INTERMEDIO". Teórico práctico online	3 de mayo	SEMESTRAL	Dr. Raúl Uicich
18	CUANDO LA CLAVE ESTA EN EL FROTISE. (NUEVO)	3 de mayo	TRIMESTRAL	Dra. Claudia Ayuso
19	PRINCIPIOS BÁSICOS TEÓRICOS Y PRÁCTICOS DE HEMOSTASIA	3 de mayo	CUATRIMESTRAL	Dr. Ricardo Forastiero Dra. Cristina Duboscq
20	INFECCIONES BACTERIANAS, DE LA CLÍNICA AL LABORATORIO	10 de mayo	CUATRIMESTRAL	Dra. María José Rial Dr. Jaime Kovenski
21	TOXICOLOGÍA LEGAL Y FORENSE	10 de mayo	SEMESTRAL	Dra. Adriana Ridolfi Dra. Gloria Álvarez
22	GASES EN SANGRE, OXIMETRIA, ELECTROLITOS Y METABOLITOS	24 de mayo	SEMESTRAL	Dra. Silvia B. González
23	BIOQUÍMICA LEGAL + BIOQUÍMICA FORENSE A confirmar	24 de mayo a definir	TRIMESTRAL	Dr. Christian Jaroszewski
24	LA NEFROLOGÍA DESDE EL LABORATORIO Y LA CLÍNICA I: Fisiopatología renal y bioquímica de los líquidos y electrolitos	1ºcuatrimestre	CUATRIMESTRAL	Dr. Alberto Villagra
25	NOMENCLATURA CITOGÉNICA HUMANA: Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenómica Humana (ISCN)	7 de junio	SEMESTRAL	Dra. Sandra Rozental Dra. Lilian Furforo
26	CLAVES PARA LA DETECCIÓN DE INTERFERENCIAS EN EL HEMOGRAMA AUTOMATIZADO	7 de junio	TRIMESTRAL	Dra. Viviana Osta
27	PROGRAMAS DE CALIDAD EN INSTITUCIONES DE SALUD (NUEVO)	7 de Junio	TRIMESTRAL	Dr. César Collino Dr. César Yené Dr. Pablo Lujan Dr. Claudio Abiega
28	ACTUALIZACIÓN EN EL ESTUDIO DE LAS DISPROTEINEMIAS Y HEMOGLOBINOPATÍAS	14 de junio	SEMESTRAL	Dra. Raquel Osatinsky Dra. Isabel Desimone Dra. Isabel Crispiani
29	CRITERIOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS. ¿CÓMO Y QUÉ INFORMAR?	5 de julio	TRIMESTRAL	Dra. Claudia Ayuso

SEGUNDO SEMESTRE				
30	INFECCIONES SEVERAS, AGENTES MULTIRRESISTENTES Y SU POSIBLE ABORDAJE	5 de julio	CUATRIMESTRAL	Dra. María José Rial Dr. Jaime Kovenski
31	SALUD FETAL. "Herramientas no- invasivas para el screening y detección de aneuploidias y preeclampsia. Una puesta al día"	5 de Julio	CUATRIMESTRAL	Dra. Patricia Maidana
32	APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA PRÁCTICA CLÍNICA. CURSO POR CONVENIO: ABA -GRCF	5 de Julio	CUATRIMESTRAL	Dra. Viviana Novoa Dra. Emilse Bermejo
33	UTILIDAD DE LOS BIOMARCADORES EN SEPSIS BACTERIANA Y COVID-19	5 de Julio	CUATRIMESTRAL	Dra. Silvia Gonzalez
34	CURSO DE NEUROINMUNOLOGÍA	5 de julio	CUATRIMESTRAL	Dra. Silvia G. Ramos Dr. Andres Villa Dr. Gabriel Carballo
35	HERRAMIENTAS BÁSICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	12 de julio	SEMESTRAL	Dr. Luis Bastos Dra. M. de la Paz Domínguez
36	CURSO DE AUTOINMUNIDAD - CLINICA Y LABORATORIO	2 de Agosto	TRIMESTRAL	Dr. Gabriel Carballo
37	INMUNOLOGIA CELULAR EL LABORATORIO EN EL ESTUDIO DE LAS CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE Y SUS PATOLOGÍAS	9 de Agosto	TRIMESTRAL	Dr. Gabriel Carballo Dra. Viviana Novoa
38	EVALUACIÓN DEL SEMEN HUMANO, según los criterios del manual OMS 5ta edición	9 de agosto	CUATRIMESTRAL	Dra. Julia Irene Ariagno
39	TÓPICOS DE HEMATOLOGÍA EN EL NEONATO	23 de agosto	TRIMESTRAL	Dra. Viviana Osta
40	CURSO DE IMPLEMENTACION DE PENSAMIENTO BASADO EN RIESGO (Gestión de riesgo) (NUEVO)	23 de agosto	BIMESTRAL	Dr. César Collino Dr. César Yené Dr. Pablo Lujan Dr. Claudio Abiega
41	FUNDAMENTO Y CONTROL DE LAS DISTINTAS TERAPIAS ANTICOAGULANTES	6 de septiembre	TRIMESTRAL	Dr. Ricardo Forastiero Dra. Cristina Duboscq
42	CURSO DE HISTOCOMPATIBILIDAD	PASA A 2022	PASA A 2022	Dr. Gabriel Carballo Dr. Fernando Torletti
43	EL ROL DEL LABORATORIO EN LA SEGURIDAD DEL PACIENTE	27 de Septiembre	TRIMESTRAL	Dra. M. Isabel Giménez Dra. Silvana Daverio
44	CURSOS TEÓRICO-PRÁCTICO DE MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS (NUEVO)	segundo semestre a definir	A DEFINIR	Dra. Silvina Farrando Dra. María Laura Sánchez
45	PLASMA RICO EN PLAQUETAS: APLICACIONES, ALCANCES Y LIMITACIONES (NUEVO)	segundo semestre a definir	TRIMESTRAL	Dra. María Victoria Nadal
46	MEDICOS Y BIOQUIMICOS EN EL DIAGNOSTICO DE LA PATOLOGIA ONCOLOGICA (NUEVO)	PASA A 2022	PASA A 2022	Dra. María Rugiero Dr. Eduardo Mormandi
47	ASPECTOS CITOLÓGICOS Y MICROBIOLÓGICOS DEL EXÁMEN DE ORINA (NUEVO)	A DEFINIR	A DEFINIR	Dr. Luis Palaoro



SOLICITUD DE INSCRIPCION

ASOCIACION
BIOQUIMICA
ARGENTINA



ASOCIACION BIOQUIMICA ARGENTINA

Fundada el 3 de septiembre de 1934

Miembro Fundador:

Confederación Unificada Bioquímica de la República Argentina (CUBRA); Coordinadora de Colegios Bioquímicos de Ley de la República Argentina; Sociedad de Bioquímica y Patología Clínica del MERCOSUR.

Institución Invitada:

Ente Coordinador de Unidades Académicas de Facultades de Farmacia y Bioquímica (ECUAFyB)

Miembro Adherente:

Asociación Latinoamericana Patología Clínica.

Integrante:

Comisión Nacional de Certificación Bioquímica (COCERBIN); Comisión de Elaboración de Normas y Guías de Laboratorio del Ministerio de Salud y Acción Social; Consejo Asesor y del Comité de Auditoría Interna Programa de Acreditación de Laboratorios de la Fundación Bioquímica Argentina.

La ASOCIACION BIOQUIMICA ARGENTINA es la primera entidad Bioquímica de nuestro país, y la precursora de muchas otras en Latinoamérica.

Los objetivos que llevaron a su creación, siguen vigentes en la actualidad:

- 1 | Promover la educación continua de los bioquímicos.
- 2 | Editar la Revista Bioquímica y Patología Clínica, que es la revista científica de la Asociación, de distribución cuatrimestral.
- 3 | Desarrollar cursos de capacitación y actualización, en la Ciudad de Buenos Aires y el Interior del País.
- 4 | Cada 2 años, organiza en los años pares el Congreso Nacional Bioquímico y en los años impares, las Jornadas de Actualización ABA.
- 5 | En su sede tiene un aula docente de 30 asientos y un moderno laboratorio de trabajos prácticos.
- 6 | Asimismo, la Asociación ha implementado el Programa de Certificación Bioquímica, mediante el cual se puede acceder a los Certificados de Especialista, y de Actualización en una determinada especialidad o en Bioquímica Clínica.
- 7 | En la Asociación funcionan además, diferentes Comisiones Internas y las Divisiones / Secciones, encabezadas por prestigiosos profesionales, para asesorar a la Comisión Directiva y a sus socios.
- 8 | La ABA tiene convenios de cooperación institucional con universidades nacionales, privadas y fundaciones científicas de prestigio.

Los socios de la ABA gozan de aranceles preferenciales en cualquier actividad que desarrolla la Institución y reciben la Revista ByPC sin cargo adicional.

SOLICITUD DE INSCRIPCION

ASOCIACION
BIOQUIMICA
ARGENTINA



Para asociarse, debe hacernos llegar esta solicitud completa en letra clara de imprenta y sin omitir ningún dato. Adjuntar una foto carnet, una fotocopia del título (anverso y reverso, tamaño 10 x 15 cm) y -de elegir este sistema de pago- el formulario de ingreso al sistema de débito automático por tarjeta de crédito VISA o MASTERCARD (\$45/mes). En su defecto deberá abonar un año por adelantado (\$540/año)

En el caso que usted optara por el pago anual, puede hacerlo en efectivo en nuestra secretaría o mediante cheque y/o giro postal a la orden de "Asociación Bioquímica Argentina", completo, sin abreviaturas.

Apellido y Nombre

D.N.I. – L.C. – L.E. – C.I.

Fecha de Nacimiento

Domicilio

Localidad C.P.

Provincia País

Teléfono e-mail

Título profesional Otorgado por

Año Nro. Matrícula

Lugar de trabajo

Domicilio

Teléfono e-mail

INFORMES

Secretaría de la Asociación Bioquímica Argentina Venezuela 1823 Piso 3
1096 – Ciudad de Buenos Aires. e-mail: info@aba-online.org.ar.
TELEFAX (011)4384-7415 - TEL: (011) 4381-2907

Horario: Lunes a Viernes de 15:00 a 19:00 Hs.

