Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

Volumen 22 - No. 2 *Año 2019*

Órgano Oficial de la SVBE

CONTENIDO

EDITORIAL

María Fátima Garcés 35

ARTÍCULOS ORIGINALES:

Sulfato de magnesio y su acción anti-inflamatoria en explantes de placenta

Juvic Madeleyne Goncalves, Ysabel Cristina Casart, María Isabel Camejo 37

Valores de referencia de zinc y cobre en niños aparentemente sanos

María Fátima Garcés, Celsy Hernández, Yacelli Bustamante, Yraima Patiño, Betania Rodríguez, Ana Cecilia Márquez, Xiomara Moreno 48

Queratitis asociada a lentes de contacto por *Nigrospora* sp

Xiomara Moreno, Carolina Macero, Derys Silva 57

ARTÍCULOS DE REVISIÓN:

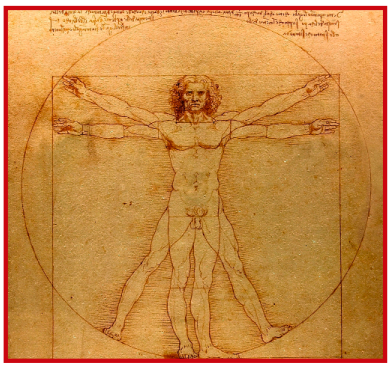
Espectrometría de masas/MALDI-TOF y Reacción en Cadena de la Polimerasa: técnicas complementarias en la identificación de biomoléculas

Aura Palencia M., Gabriela Romero B 63

AGRADECIMIENTO PARA LOS ARBITROS DE 2019 72

ÍNDICE POR AUTORES, TÍTULOS Y PALABRAS CLAVE AÑO 2019 73

INFORMACIÓN PARA AUTORES 77



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

Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

Volumen 22. No 2.
Año 2019

2019-2020
Consejo Directivo
Editores
Dra. María Fátima Garcés

Gerencia Editorial
Dra. María Fátima Garcés

Gerencia Administrativa
MSc. Sharim Marrero

Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas (S.V.B.E.)
Junta Directiva
Presidenta
MSc. Yaniska Fránquiz

Dirección General
Dra. María Fátima Garcés

Dirección Científica
MSc. Aura Palencia

Dirección Administrativa
MSc. Sharim Marrero

Dirección de Proyectos y Divulgación Científica
MSc. Valmore Rodríguez

Comisión evaluadora de credenciales:
Dra. María Fátima Garcés
MSc. Aura Palencia
MSc. Valmore Rodríguez

Comisión para otorgar unidades crédito
Lic. Josefina Guariguata
Esp. Shasbleidy Diaz
MSc. Martha Herrera

Comité de Redacción
Dra. Priva Zabner de Oziel, Esp. Noel Silva
Esp. Shasbleidy Díaz, MSc. Valmore Rodríguez
Dra. María Fátima Garcés, MSc. Giuseppe Ferrara,
Dra. Marlyn Vivenes, MSc. Celsy Hernández,
Dra. Hilda Stekman.

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

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

ISNN: 1315-1746
Depósito Legal: pp 199202DF899
Indizada
LILACS (BIREME)
MIEMBRO ASEREME

Publicación Semestral de la SVBE

Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

CONTENIDO

Vol. 22 - No 2 2019

EDITORIAL
María Fátima Garcés 35

ARTÍCULOS ORIGINALES:
Sulfato de magnesio y su acción anti-inflamatoria en explantes de placenta
Juvic Madeleyne Goncalves, Ysabel Cristina Casart, María Isabel Camejo 37

Valores de referencia de zinc y cobre en niños aparentemente sanos
María Fátima Garcés, Celsy Hernández, Yacelli Bustamante, Yraima Patiño, Betania Rodríguez, Ana Cecilia Márquez, Xiomara Moreno 48

Queratitis asociada a lentes de contacto por *Nigrospora* sp
Xiomara Moreno, Carolina Macero, Derys Silva 57

ARTÍCULOS DE REVISIÓN:
Espectrometría de masas/MALDI-TOF y Reacción en Cadena de la Polimerasa: técnicas complementarias en la identificación de biomoléculas
Aura Palencia M., Gabriela Romero B. 63

AGRADECIMIENTO PARA LOS ARBITROS DE 2019 72

ÍNDICE POR AUTORES, TÍTULOS Y PALABRAS CLAVE AÑO 2019 73

INFORMACIÓN PARA AUTORES 77

Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas

CONTENTS

Vol. 22 - No 2 2019

EDITORIAL

María Fátima Garcés 35

ORIGINAL ARTICLES:

Magnesium sulphate and its anti-inflammatory action in placenta explants

Juvic Madeleyne Goncalves, Ysabel Cristina Casart, María Isabel Camejo 37

Reference values of zinc and copper in apparently healthy children

María Fátima Garcés, Celsy Hernández, Yacelli Bustamante, Yraima Patiño, Betania Rodríguez, Ana Cecilia Márquez, Xiomara Moreno 48

Contact lens associated keratitis due to *Nigrospora* sp

Xiomara Moreno, Carolina Macero, Derys Silva 57

REVIEW ARTICLE:

Mass spectrometry / MALDI-TOF and Polymerase Chain Reaction: complementary techniques in the identification of biomolecules

Aura Palencia M., Gabriela Romero B. 63

THANKS TO THE 2019 REFEREES 72

..

INDEX BY AUTHORS, TITLES AND KEYWORDS YEAR 2019 73

INFORMATION FOR AUTHORS 77

EDITORIAL

Concluimos exitosamente el año con el número dos del volumen 22 de la ***Revista Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas***. El 2019 fue un año difícil por los sucesos ocurridos en el país y sin embargo, gracias a la participación entusiasta de todos los autores y del grupo editorial, logramos cumplir nuestros objetivos en tiempo y forma.

Tuvimos momentos de celebración como la realización del V Congreso de la Escuela de Bioanálisis UCV, que se concretó en la Universidad Central de Venezuela los días 25 y 26 de julio del año en curso en la Facultad de Farmacia, en la que asumimos el reto de la realización de este evento con el apoyo de un excelente equipo de profesores de la Escuela de Bioanálisis-UCV, colegas y médicos que nos acompañan asegurando un alto nivel científico.

Nuestro objetivo es mantener al gremio actualizado y que se pueda dar el intercambio de saberes entre conferencistas y asistentes para nutrirnos mutuamente. El Comité organizador estuvo conformado por la MSc. Celsy Hernández, Dra. Juvic Goncalves, MSc. Abiguey Vásquez, Lic. Carlos Santacruz, MSc. Isidro Piedra, MSc. Yacelli Bustamante y mi persona como Presidenta del mencionado Comité que ofreció a nuestros Bioanalistas un programa científico de excelente calidad, con las mejores conferencias dictadas por especialistas de cada área, el cual fue disfrutado por más de 400 profesionales, quienes aprovecharon este espacio científico no solo para actualizarse sino además como reencuentro con colegas de diferentes partes del país.

En esta oportunidad la ***Revista Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas*** les presenta diversos tópicos relacionados con distintas áreas del Bioanálisis. Comenzamos este número con un artículo en el que los investigadores evalúan el efecto del $MgSO_4$ sobre la producción de citocinas en los explantes de placentas sanas del tercer trimestre en condiciones inflamatorias y de hipoxia, un interesante artículo en el que demuestran que el $MgSO_4$ posee acción anti-inflamatoria. Seguido presentamos un artículo en él que se presentan los valores de referencia para Zinc y Cobre en niños aparentemente sanos por la metodología de Absorción atómica, siguiendo los patrones de control de calidad. Además se publica un caso clínico de queratitis causada por *Nigrospora* sp. por el uso de lentes de contacto, lo que reviste esencial importancia debido al manejo de queratitis por hongos para evitar el uso innecesario de antimicrobianos y de afecciones que requieren de procedimientos quirúrgicos.

Finalizamos la edición de este número, con un interesante artículo de revisión en el cual los autores procuran dar a conocer sobre los nuevos avances de la espectrometría de masas MALDI-TOF en el diagnóstico clínico. Actualmente, esta técnica se ha convertido en una alternativa no solo para el diagnóstico temprano de enfermedades infecciosas sino también para estudios epidemiológicos que favorecen nuevas estrategias de prevención y control.

La ***Revista Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas*** es fruto de mucho esfuerzo y trabajo en equipo, los desafíos que nos planteamos ahora son los de mejorar la calidad científica, continuar con la visibilidad de la revista buscando nuevas indizaciones y sin duda mantener en alto a nuestra querida revista. Para lograr estos objetivos, necesitamos el apoyo de los investigadores y de sus avances científicos y tecnológicos, que permitan difundir conocimientos del área de la salud y aplicar el conocimiento en beneficio de la sociedad.

Reciban todos un abrazo fraternal y sigamos adelante con esta importante encomienda.

Dra. María Fátima Garcés

Editora.

SULFATO DE MAGNESIO Y SU ACCION ANTI-INFLAMATORIA EN EXPLANTES DE PLACENTA

Juvic Madeleyne Goncalves[1], Ysabel Cristina Casart[2], María Isabel Camejo[3].

[1]* Profesor Agregado. Jefe del Departamento de Ciencias Morfológicas. Jefe de la Cátedra de Histología. Jefe (E) de la Cátedra de Hematología. Jefe (E) de la Cátedra de Anatomía y Embriología. Escuela de Bioanálisis. Cátedra de Histología. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. [2] Profesor Titular. Escuela de Nutrición y Dietética. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.[3] Profesor Titular. Departamento de Biología de Organismos. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela. (Póstuma).

Recibido para publicación el 15 septiembre 2019. Aprobado para publicación el 15 octubre 2019.

RESUMEN:
Desde hace más de 60 años, el sulfato de magnesio ($MgSO_4$) es el fármaco de elección para el tratamiento de la preeclampsia en las salas de obstetricia. La etiología de la preeclampsia no ha sido establecida. Diferentes estudios, han demostrado que durante la preeclampsia se presenta una disfunción endotelial y un aumento de los medidores inflamatorios. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del $MgSO_4$ sobre la producción de citocinas en los explantes de placentas sanas del tercer trimestre en condiciones inflamatorias y de hipoxia. Los explantes fueron cultivados en presencia de $MgSO_4$ o Lipopolisacáridos (LPS), tanto en normoxia como hipoxia. Un grupo de explantes fueron tratados con $MgSO_4$ y transcurridas 24 horas se expusieron a LPS y viceversa. En normoxia, el $MgSO_4$ incrementa los niveles de TNF-α e IL-1β, los mismos resultados se obtienen al incubar los explantes con $MgSO_4$ y luego con LPS observándose además un incremento de IL-10. Al exponer los explantes a LPS y luego a $MgSO_4$ aumentaron los niveles de IL-1β. En hipoxia, el $MgSO_4$ promueve la liberación IL-1β. En los explantes expuestos a LPS y luego a $MgSO_4$ aumentaron los niveles de IL-1β. En conclusión, el $MgSO_4$ posee una acción anti-inflamatoria tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia, al reducir los niveles de citocinas pro-inflamatorias (TNF-α e IL-1β) y estimular la secreción de citocinas anti-inflamatorias (IL-10) en presencia de LPS en los cultivos de explantes.

Palabras claves: Sulfato de magnesio, explantes de placenta, citocinas, hipoxia.

MAGNESIUM SULPHATE AND ITS ANTI-INFLAMMATORY ACTION IN PLACENTA EXPLANTS

SUMMARY
For more than 60 years, magnesium sulfate ($MgSO_4$) is the drug of choice for the treatment of preeclampsia in obstetric wards. The etiology of preeclampsia has not been established. Different studies have shown that endothelial dysfunction and an increase in inflammatory meters occur during preeclampsia. The objective of the present work was to evaluate the effect of $MgSO_4$ on cytokine production in explants of healthy third trimester placentas under inflammatory and hypoxic conditions. The explants were cultured in the presence of $MgSO_4$ or Lipopolysaccharides (LPS), both in normoxia and hypoxia. A group of explants were treated with $MgSO_4$ and after 24 hours they were exposed to LPS and vice versa. In normoxia, $MgSO_4$ increases TNF-α and IL-1β levels, the same results are obtained by incubating the explants with $MgSO_4$ and then with LPS, also observing an increase in IL-10. Exposing the explants to LPS and then to $MgSO_4$ increased IL-1β levels. In hypoxia, $MgSO_4$ promotes IL-1β release. In explants exposed to LPS and then $MgSO_4$, IL-1β levels increased. In conclusion, $MgSO_4$ has an anti-inflammatory action both under normoxia and hypoxic conditions, by reducing the levels of pro-inflammatory cytokines (TNF-α and IL-1β) and stimulating the secretion of anti-inflammatory cytokines (IL- 10) in the presence of LPS in explant cultures..

Key words: Magnesium sulfate, placental explants, cytokines, hypoxia.

Introducción

La preeclampsia es un trastorno multisistémico del embarazo que ocurre en la mujer después de la semana veinte de gestación, asociada a diversos factores de riesgos y caracterizado por presentar hipertensión, edema y la presencia de proteinuria (Tabla 1) (1-3). Se estima que esta enfermedad puede complicar entre el 2-8% de los embarazos, siendo este trastorno una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad de la madre y/o el feto (4-13).

Hasta la fecha la etiología de la preeclampsia no ha sido establecida, se han propuesto varias hipótesis que han tratado de explicar la génesis de la misma. Datos provenientes de diferentes estudios, han

Solicitar copia a: Juvic Madeleyne Goncalves (juvicm@gmail.com / juvic.goncalves@ucv.ve)

Tabla 1. Criterios clínicos y factores de riesgos asociados a la preeclampsia

CRITERIOS CLINICOS	
Hipertensión arterial:	
Presión sistólica Que excedan los valores basales en 20 mm Hg (debidamente comprobado en al menos dos tomas, con 4 horas de intervalo entre cada una).	≥ 140 – 160 mm Hg
Presión diastólica Que exceda los valores basales en 20 mm Hg (debidamente comprobado en al menos dos tomas, con 4 horas de intervalo entre cada una)	≥ 90 – 110 mm Hg
Proteinuria en 24 horas (Índice proteína /creatinina ≥ 0,3)	≥ 300 – 500 mg.
COMPLICACIONES CLINICAS	
Oliguria	Ausente / Presente
Edema agudo de Pulmón	Ausente / Presente
Trastornos cerebrales y/o visuales	Ausente / Presente
Convulsiones eclámpticas	Ausente / Presente
Dolor persistente y severo en el epigastrio derecho	Ausente / Presente
Rotura o deterioro de la función Hepática (Valores de transaminasas al dobles de su valores normales)	Ausente / Presente
Evidencia clínica o de laboratorio de coagulación intravascular diseminada	Ausente / Presente
Trombocitopenia (Contaje de plaquetas ≥ 100.000 10^9/L)	Ausente / Presente
Hemolisis microangiopática	Ausente / Presente
FACTORES DE RIESGOS	
Núliparas	Embarazo múltiples
Haber padecido de preeclampsia en embarazos previos	Diabetes Pre y Gestacional
Hipertensión crónica	Trombofilia
Lupus eritematoso sistémico	Poseer más de 35 años de edad
Embarazos por reproducción asistida	Síndrome anti-fosfolípidos
Otros	

Adaptado de Pacheco, 2006; Proverbio *et al.*, 2009; Turner, 2010; ACOG Practice Bulletin, 2019.

demostrado que durante la preeclampsia se presenta una disfunción endotelial relacionada con la ausencia en la remodelación de las arteriolas espirales de la decidua al inicio del embarazo, lo que genera isquemia placentaria y la disminución del flujo útero feto-placentario. Adicionalmente, se ha observado una disfunción endotelial generalizada, por la pérdida del tono vascular con incremento de los tromboxanos en relación a prostaciclinas, así como un aumento en la permeabilidad de los capilares renales, además de alteraciones en la expresión de los factores de la coagulación, vasoconstricción e isquemias secundarias acompañado de disfunción hepática. Igualmente, se han relacionado depósitos de complejos inmunes (derivados del complemento: C3a, C4a, C5a) en las paredes de los vasos sanguíneos, como un factor quimioatrayente para los neutrófilos y otros leucocitos al sitio de deposición de los mismos, promoviendo la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular permitiendo que los leucocitos puedan adherirse a la pared interna de los vasos, resultando en la retracción endotelial con aumento de la permeabilidad vascular ocasionando un edema general. Actualmente, se conoce como la invasión placentaria deficiente y la posterior liberación de factores anti-angiogénicos tales como: la tirosina quinasa-1 soluble similar a fms (sFlt-1) y endoglina soluble (sEng) en la circulación materna, causan disfunción endotelial generalizada que conduce

a una lesión multisistémica de los órganos vinculados con esta patología (4, 8, 9, 12, 15-21).

Durante el embarazo normal, los diferentes tipos de células en la interfase materno-fetal secretan diversos patrones de citocinas a lo largo de la gestación, siendo estas secreciones cruciales en el mantenimiento y desarrollo de un embarazo exitosos. Se ha descrito que durante el embarazo debe existir un balance entre las citocinas producidas por las células Th1/Th2. La Th1 agrupan las células T de ayuda que secretan IL-2 e IFN-γ (inmunidad mediada por células), mientras que las Th2 producen IL-4, IL-6 e IL-10 (inmunidad humoral). En un embarazo exitoso las citocinas producidas por las células Th2 deben predominar sobre la producción de las citocinas Th1. Sin embargo, en la preeclampsia este balance se rompe y las citocinas producidas por las Th1 son mayores que las Th2 (9, 22).

En obstetricia, el sulfato de magnesio ($MgSO_4$) se ha mantenido como el medicamento de elección desde 1920 en el tratamiento de las pacientes con preeclampsia y en la prevención de las convulsiones en pacientes que desarrollan cuadros de eclampsia (23, 24). Sin embargo, su empleo en esta área ha sido de forma empírica, debido a que hasta la fecha no se conoce con exactitud el mecanismo de acción por el cual el $MgSO_4$ actúa en el organismo (20, 25). Diversos estudios han vinculado la acción anti-inflamatoria del $MgSO_4$ con la reducción de la producción y secreción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatoria en la interfase materno-fetal. Además, la administración del sulfato de magnesio ha demostrado ser un potente supresor de la producción de mediadores inflamatorios tanto en la madre como en el feto, lo que ha permitido reducir el riesgo de nacimientos prematuros y sus complicaciones clínicas (26-28).

En el feto, se ha propuesto al sulfato de magnesio se comporta como un agente neuroprotector de la parálisis cerebral de neonatos a través de diferentes mecanismos, entre los que señalan: a) estabilización hemodinámica: se propone que el $MgSO_4$ es un estabilizador de la presión arterial, reduciendo la constricción de las arterias cerebrales y restaurando la perfusión cerebral en el neonato prematuro; b) prevención de las lesiones excitatorias y fomento de la estabilidad neuronal: en la fase aguda de encefalopatías hipóxico-isquémica, el oxígeno se agota y el feto pasa a un metabolismo anaeróbico, generando acumulación intracelular de sodio, calcio, cloruro, agua y ácido láctico (edema citotóxico), lo que origina la liberación de neurotransmisores excitatorios (glutamato) causando un aumento de calcio y sodio en las neuronas post-sinápticas, desestabilizando las membrana de las misma, en estos casos, se ha demostrado que el $MgSO_4$ estabiliza las membranas evitando el flujo de estos iones y actúa como un antagonista en los receptores de glutamato (NMDA), c) como agente antioxidante: debido a la acción antagonista que posee con el calcio, el magnesio promueve la inhibición de lipasas, proteasas, endonucleasas y fosfolipasas, las cuales en su forma activa ocasionan daño neuronal y cerebral irreversible en los fosfolípidos de membrana, con la formación de radicales libres. Y por último, d) se propone al MgSO4 como agente anti-inflamatorio: ya que promueve la disminución de factores pro-inflamatorios (IL-1β, TNF-α) y productos secundarios de la activación de los mismos, que causan daño a nivel cerebral en los bebes prematuros (29-33). Por tales motivos, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del $MgSO_4$ en los cultivos de explantes de placenta bajo condiciones de hipoxia y en un ambiente pro-inflamatorio.

Materiales y métodos

Los explantes fueron obtenidos a partir de siete placentas obtenidas por cesárea o parto natural provenientes de mujeres sin historial clínico o patologías asociadas al embarazo, de la sección de Ginecología-Obstetricia de la Sala de Partos del Hospital Universitario de Caracas, las cuales consintieron de forma voluntaria a participar en este estudio. Este contó con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad Simón Bolívar y del Hospital Universitario de Caracas, bajo las condiciones planteadas en esta investigación.

Los explantes fueron cultivados en placas del Tipo NUNCTM (Greiner Bio-one, N° 142475) colocando un solo explantes por pozo, en un volumen de 1,5 mL del medio de cultivo RPMI-1640 (GIBCO BRL, N°31800-014) suplementado de la siguiente manera: 10% de suero fetal bovino inactivado, 1% de penicilina/estreptomicina, 0,1% de gentamicina; 1% de amfotericina B; 1% de L-glutamina; 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de piruvato de sodio, con recambios del mismo cada 24 horas. Estos fueron mantenidos en una incubadora marca Fisher Scientific a 37°C, en un ambiente húmedo en presencia de una mezcla de gases del 5% CO_2, 10% O_2 y balanceado con Nitrógeno.

Transcurridas las primeras veinticuatro (24) horas, tiempo necesario para la estabilización inicial de los

tejidos, estos fueron sometido a diferentes condiciones experimentales dividiendo los mismos en dos (2) grupos: el primero manteniendo los tejidos de explantes bajo la condición de normoxia: 5% CO_2; 10% O_2 y balanceado con Nitrógeno. Mientras que, un segundo grupo se colocó en una condición de hipoxia: 5% CO_2; 2-3% O_2 y balanceado con Nitrógeno, ambos grupos de tejidos de explantes se mantuvieron en estufas independientes a 37°C en cámara húmeda y estabilizados bajos estas condiciones por veinticuatro (24) horas. Posterior a las etapas de estabilización, se les realizó a todos los explantes un recambio del medio de cultivo y se sub-dividieron los mismos en los siguientes sub-grupos (manteniendo su condición de normoxia e hipoxia), un grupo de explantes se mantuvieron con medio basal, un segundo grupo se les adicionó junto al medio de cultivo suplementado una solución de sulfato de magnesio (Sigma-Aldrich, N° M2643) a una concentración de 2 mM y a otro grupo una solución de Lipopolisacáridos de *Escherichia coli* 055:B5 (Sigma-Aldrich, N° L2880) (LPS) en una concentración de 2 µg/mL, posteriormente los cultivos expuestos inicialmente con sulfato de magnesio se adiciono en su recambio del medio una solución de LPS más sulfato de magnesio y viceversa. Los sobrenadantes del medio de cultivo, se recolectaron diariamente y posteriormente se centrifugaron (3.500 rpm) durante quince minutos, con el fin de eliminar cualquier material celular que pudiera estar presente en el medio. Se almacenaron a -20 °C hasta su utilización posterior.

La integridad de los cultivos se determinó mediante la medición de la actividad enzimática del Lactato Deshidrogenasa (LDH) presente en los sobrenadantes del medio de cultivo obtenidos diariamente (Sigma-Aldrich, DG1340-K). Mientras que, la diferenciación celular, se evaluó por la capacidad de sintetizar y secretar la hormona Gonadotrofina Coriónica humana. La concentración de la Gonadotrofina Coriónica humana fracción beta (hCG-β) se determinó en los sobrenadantes del medio recolectado mediante ensayo inmunométrico de quimioluminiscencia en fase sólida (Equipo-Siemens Immulite 1000). Los resultados se reportaron en mUI/mg/proteínas (datos no mostrados) (34).

A partir de los sobrenadantes recolectados diariamente se determinaron las siguientes citocinas: Interleucina 1 beta (IL-1β), Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-α) e Interleucina 10 (IL-10). Los niveles de citocinas se midieron empleando un Kit comercial de micro-ELISA ultrasensible (Thermo Scientific), específico para cada tipo de citocinas. Los resultados fueron expresados según las recomendaciones técnicas del kit a utilizar. Cada determinación se realizó por duplicado.

Todos los resultados fueron analizados empleando el paquete de software SPSS versión 10.0 para Windows. Las comparaciones entre las diferentes condiciones se analizaron estadísticamente empleando la prueba de Mann-Whitney estableciendo como diferencia estadísticamente significativa a p <0,05. Todos los datos se presentan como las medias ± desviación estándar. Las ***n*** representan el número de placentas que fueron estudiadas durante cada fase.

Resultados

A continuación se muestra los resultados de los niveles de TNF-α, IL-10 e IL-1β medidos en los sobrenadantes de los cultivos de explantes de placentas en condiciones de normoxia e hipoxia en las diferentes condiciones de cultivos descritos en materiales y métodos. La Figura 1, muestra las concentraciones del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-α) expresados en

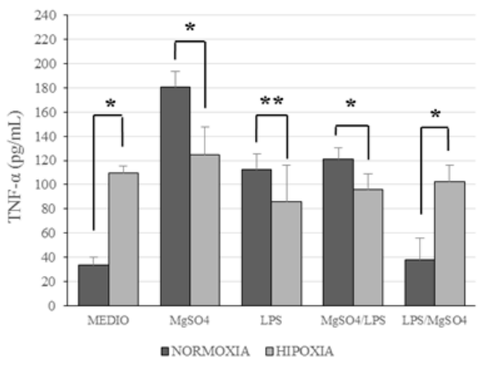


Figura 1. Niveles de TNF-α determinados en los sobrenadantes de los cultivos de explantes de placenta en condiciones de normoxia e hipoxia en diferentes medios de cultivos: basales (Medio), en presencia de $MgSO_4$ (2 mM), LPS (2 µg/mL), con LPS previa presencia de $MgSO_4$ ($MgSO_4$/LPS) y viceversa (LPS/$MgSO_4$). Los datos fueron expresados como las medias ± las desviaciones estándar. La comparación estadística entre las condiciones de normoxia e hipoxia para cada tratamiento fue realizada empleando el método Mann-Whitney (n=7), *p<0.01 y **p<0.02.

picogramo por mL (pg/mL). Los niveles de TNF-α se encontraron en menor concentración en la condición de normoxia para aquellos cultivos incubados en medio solo (*p<0.01), mientras que aquellos cultivos tratados con $MgSO_4$ mostraron niveles de TNF-α aumentados en comparación con los encontrados en la condición de hipoxia (*p<0.01). Por otro lado, se observó que los cultivos tratados con LPS, mostraron niveles de TNF-α similares entre ambas condiciones experimentales. El análisis estadístico demostró una diferencia estadísticamente significativa entre estas condiciones (**p<0.02). Los explantes tratados con $MgSO_4$ y posteriormente expuestos a LPS, mostraron niveles aumentados de TNF-α bajo condición de normoxia, arrojando diferencia estadísticamente significativa al compararlo con la condición de hipoxia (*p<0.01). Por otra parte, los cultivos expuestos previamente a LPS y luego tratados con $MgSO_4$, mostraron niveles inferiores de TNF-α bajo condición de normoxia, mostrando diferencia estadísticamente significativa cuando se comparó con la condición de hipoxia (*p<0.01).

Los niveles de TNF-α entre los cultivos que se encontraban en condición de normoxia para las diferentes condiciones, mostraron diferencia estadísticamente significativa entre todas las comparaciones, a excepción de la comparación hecha entre los cultivos que solo contenía medio de cultivo y aquellos tratados con LPS y luego expuestos con $MgSO_4$. En los cultivos obtenidos bajo condiciones de hipoxia, se encontró que aquellas comparaciones que mostraron diferencia estadísticamente significativa fueron entre los cultivos que solo contenían medio de cultivo y aquellos cultivos tratados con LPS, con $MgSO_4$ y LPS y en los cultivos que presentaban LPS y los tratados inicialmente con LPS y luego expuestos con $MgSO_4$.

En la Figura 2, se muestra las concentraciones de interleucina tipo 10 (IL-10) expresadas en picogramo por mL (pg/mL), determinadas en los sobrenadantes de los cultivos de explantes de placenta en condiciones de normoxia e hipoxia para los diferentes medios de cultivos. Los niveles de IL-10 se encontraron en mayor concentración en la condición de hipoxia, siendo la diferencia estadísticamente significativa en los medios tratados con $MgSO_4$ (*p<0.01) y con LPS (*p<0.01). El aumento en los niveles de IL-10 encontrados en las condiciones de hipoxia se mantuvo en aquellos cultivos tratados con $MgSO_4$ y posteriormente con LPS, y viceversa, la diferencia fue estadísticamente

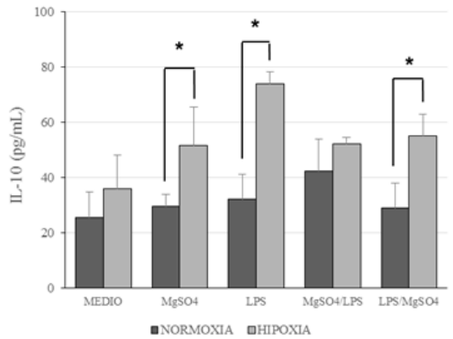


Figura 2. Niveles de IL-10 determinados en los sobrenadantes de los cultivos de explantes de placenta en condiciones de normoxia e hipoxia en diferentes medios de cultivos: basales (Medio), en presencia de $MgSO_4$ (2 mM), LPS (2 µg/mL), con LPS previa presencia de $MgSO_4$ ($MgSO_4$/LPS) y viceversa (LPS/$MgSO_4$). Los datos fueron expresados como las medias ± las desviaciones estándar. La comparación estadística entre las condiciones de normoxia e hipoxia para cada tratamiento fue realizada empleando el método Mann-Whitney (n=7), *p<0.01 y **p<0.02.

significativa en aquellos cultivos tratados previamente con LPS y que posteriormente expuestos con $MgSO_4$ (*p<0.01).

Al realizar la comparación estadísticas entre los diferentes medios de cultivos obtenidos, no se encontró diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los medios comparados bajo condiciones de normoxia. Mientras, que en condición de hipoxia si se encontró diferencia estadísticamente significativa cuando se comparó los cultivos que solo contenían medio de cultivo y los tratados con LPS, así como aquellos cultivos con que contenían LPS y los que fueron tratados con LPS y luego expuestos con $MgSO_4$.

En la Figura 3, se muestra las concentraciones de interleucina uno tipo beta (IL-1β) expresado en picogramo sobre mL (pg/mL), determinadas en los sobrenadantes de los cultivos de explantes de placenta en condiciones de normoxia e hipoxia para los diferentes medios de cultivos. Los niveles de IL-1β se encontraron en mayor concentración en la condición de normoxia, con una diferencia estadísticamente significativa en los cultivos que solo contenían medio de cultivo (**p<0.02), $MgSO_4$ (*p<0.01) y LPS (*p<0.01). Igualmente, se observó un incremento en

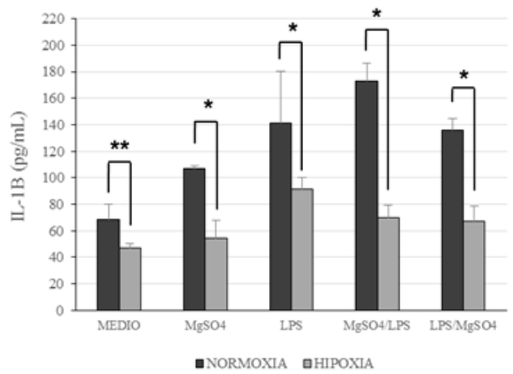


Figura 3. Niveles de IL-1β determinados en los sobrenadantes de los cultivos de explantes de placenta en condiciones de normoxia e hipoxia en diferentes medios de cultivos: basales (Medio), en presencia de $MgSO_4$ (2 mM), LPS (2 µg/mL), con LPS previa presencia de $MgSO_4$ ($MgSO_4$/LPS) y viceversa (LPS/$MgSO_4$). Los datos fueron expresados como las medias ± las desviaciones estándar. La comparación estadística entre las condiciones de normoxia e hipoxia para cada tratamiento fue realizada empleando el método Mann-Whitney (n=7), *p<0.01 y **p<0.02

aquellos cultivos que habían sido tratados con $MgSO_4$ y posteriormente LPS, y viceversa, mostrando en ambos casos diferencia estadísticamente significativa (*p<0.01).

Cuando se realizaron las comparaciones de los diferentes medios en condiciones de normoxia las únicas comparaciones que no mostraron diferencia estadísticamente significativa fueron aquellas que se realizaron al comparar los cultivos tratados con $MgSO_4$ y LPS y los cultivos tratados con LPS y los tratados con LPS inicialmente y posteriormente $MgSO_4$. Mientras que en condiciones de hipoxia, las comparaciones estadísticas que no mostraron diferencia significativa fueron aquellas donde se comparó los cultivos que solo contenían medio de cultivo y $MgSO_4$; así como los cultivos que solo contenían $MgSO_4$ y aquellos que tratados con $MgSO_4$ y posteriormente LPS.

Discusión

La determinación de citocinas pro y anti-inflamatorias en el desarrollo de la presente investigación, reveló como la presencia de sulfato de magnesio en condiciones de normoxia incrementa la producción de TNF-α e IL-1β en los cultivos de explantes de placenta del tercer trimestre de gestación, originando una respuesta inflamatoria localizada. Por otra parte, se evidenció una respuesta anti-inflamatoria del sulfato de magnesio en los cultivos de explantes de placentas previamente estimulados con LPS, al disminuir los niveles de TNF-α e IL-1β, tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia. Esto permite inferir que la presencia del sulfato de magnesio en condiciones normales no posee un efecto protector sobre el tejido placentario, efecto que si es evidente en condiciones de respuesta inflamatoria. Resultados similares fueron encontrados por Holcberg *et al.*, (2006) (35), utilizando técnicas de perfusión en placentas normales en presencia de sulfato de magnesio, demostraron que la placenta materna tiene capacidad de secretar TNF-α e IL-6, generando una acción inflamatoria local, lo cual puede ocasionar efectos adversos en la madre si persiste durante largos períodos de tiempo. Por lo que la utilización de dicho fármaco como tratamiento profiláctico no debe ser empleada en mujeres embarazadas del último trimestre en condiciones sanas.

En el presente estudio se demostró como el sulfato de magnesio incrementa los niveles de TNF-α e IL-1β en condiciones de normoxia, sin embargo no se observó un efecto directo sobre la secreción de la IL-10, al no evidenciarse diferencias en la secreción de esta interleucina en los cultivos de explantes de placenta del tercer trimestre de gestación en condiciones de normoxia. La IL-10 posee un efecto anti-inflamatorio y una capacidad de inhibir la síntesis de citocinas pro-inflamatorias dadas por los linfocitos T y los macrófagos. Además, se ha descrito como la decidua, trofoblasto y membranas coriónicas son la principal fuente de producción de esta citocinas, por lo que su síntesis y secreción en los tejidos placentarios parece estar vinculada a una activación endotelial en las vellosidades placentarias y no a daños del tejido placentario per se (36-39).

Estudios previos han señalado a la IL-10 como una citocinas clave para el mantenimiento del embarazo (Hanna *et al.*, 2006) (40), así como un potente inhibidor de la acción del TNF-α e IL-1 en condiciones de hipoxia (Royle *et al.*, 2009) (41). Al analizar la presencia del sulfato de magnesio en condiciones de hipoxia, observamos un aumento en la secreción de IL-10 y TNF-α, sin afectar la producción de IL-1β. Estudios realizados por Peltier *et al.*, (2011) (42), demostraron una disminución en la acción anti-inflamatoria de la IL-10 en cultivos de explantes de placenta a baja presión de oxígeno. Estos hallazgos permiten vincular al sulfato de magnesio como un mediador clave en la liberación de IL-10 en condiciones de hipoxia, apoyando la hipótesis de que el sulfato de magnesio posee un efecto anti-inflamatorio al estimular la producción de IL-10 por parte de las células placentarias, la cual modula principalmente la liberación de la IL-1β e TNF-α por parte del sistema inmune placentario, reduciendo los efectos adversos que pudieran estar presentándose a causa de la disfunción endotelial, como se ha descrito en algunas patologías como la preeclampsia (41, 43). Estudios previos realizados en cultivos de explantes de placenta del tercer del tercer trimestre proveniente de mujeres con preeclampsia, mostraron un incremento en la expresión de TNF-α, IL-1β e IL-10 en comparación con placentas provenientes de mujeres sanas, atribuyendo el aumento de TNF-α e IL-1β al daño encontrado en las células endoteliales observados durante la preeclampsia (44).

La utilización de Lipopolisacáridos de *E. coli* (LPS) en los cultivos de explantes de placenta del tercer trimestre de gestación en condiciones de normoxia e hipoxia, mostró un incremento en los niveles de TNF-α e IL-1β. Laham *et al.*, (1997) (45), demostraron como la presencia de LPS en cultivos de explantes de placentas estimula la secreción de TNF-α e IL-1β y que esta ocurre después de 1 y 4 horas de incubación respectivamente. Ma *et al.*, (2006) (46), demostraron en cultivos de células aisladas de citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto estimulados en concentraciones crecientes con LPS, la presencia de patrones similares de secreción de IL-8 entre ambos tipos de células, evidenciando la sensibilidad de estas células a responder agentes patógenos bacterianos. Estos hallazgos permiten validar la utilización de los cultivos de explantes de placenta como un modelo in vitro útil en el estudio de los procesos inflamatorios reportados en algunas patologías como: parto prematuro, preeclampsia, etc., y el estudio de la acción del sulfato de magnesio sobre dicho tejido en presencia de cuadros inflamatorios.

Diversas investigaciones han descrito como la secreción y liberación del TNF-α responde a diferentes estímulos como: antígenos bacterianos, virus, parásitos, disminución de oxígeno, disfunción endotelial, isquemia y por acción de otros mediadores celulares como la IL-1 e IFN-ɣ, así como por la acción autocrina del TNF-α, entre otros (36, 37, 44, 47-49). Se conoce que la respuesta del TNF-α depende directamente de la unión a sus receptores, describiéndose hasta la fecha dos tipos de receptores estructurales diferentes para TNF-α denominados: a) receptor tipo I (TNF-RI; p55 o p60) el cual presenta una amplia distribución y tiene una expresión constitutiva en diversos tipos de células y b) el receptor tipo II (TNF-RII; p80 o p75), el cual presenta una alta promiscuidad a su ligando y su expresión se genera de forma inducida. La función principal del receptor tipo I está dada en la defensa de los tejidos debido a que regula los procesos pro-inflamatorios y apoptótico, junto a diversos factores de transcripción como: NFκB, proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), entre otros. Mientras que el receptor tipo II, su acción está ligada principalmente a los efectos beneficiosos locales sin que estos lleguen a generar efectos perjudiciales en los tejidos. Sin embargo, se ha observado que estímulos constante por patógenos exógenos, estrés oxidativo, disfunción endotelial o reducción de los niveles de oxígeno favorecen que el TNF-RII se comporte como un transportador del TNF-α hacia el receptor TNF-I, el cual presenta alta afinidad por su ligando, lo que potencia la acción pro-inflamatoria del TNF-α (50, 51). Algunos estudios han demostrado la expresión e incremento de TNF-RI en repuesta a cuadros inflamatorios sobre los componentes celulares de la interfase materno-fetal tanto al inicio como al final del embarazo, sin que esta expresión sea evidenciada a nivel sistémico en la madre (52).

Por otro lado, la IL-1β es una citocinas que se produce de forma inmediata tras el contacto de las células implicadas en una respuesta inmune innata con un agente extraño o LPS, generando un aumento a la permeabilidad vascular, respuesta inflamatoria local o generalizada, síntesis de proteína de fase aguda, proliferación de fibroblastos, activación de linfocitos T y B, producción de plaquetas, entre otros. Esta citocinas es producida por diferentes tipos de células dentro de las que se destacan: monocitos, macrófagos, células endoteliales, células dendríticas y células NK. Los macrófagos presentes en las vellosidades placentarias es una de las fuentes más importantes de este tipo de citocinas durante el embarazo (37, 51). En reacciones inflamatorias localizadas, tanto la IL-1β como el TNF-α actúan sobre los macrófagos y células endoteliales

del tejido placentario, permitiendo la producción de quimiocinas que contribuyen a la entrada de los neutrófilos a los tejidos placentarios y su acción frente a los patógenos presentes. Además, el TNF-α, la IL-1β induce un aumento en la expresión de moléculas de adherencia sobre las células endoteliales (ICAM-1 y VCAM-1), las cuales son reconocidas por linfocitos y monocitos de la circulación sanguínea, esto ocasiona la extravasación de estas células a los espacios tisulares de la placenta favoreciendo una reacción inflamatoria localizada (37).

En esta investigación se evidenció la respuesta anti-inflamatoria del sulfato de magnesio en los cultivos de explantes de placentas previamente estimulados con LPS, al disminuir los niveles de TNF-α e IL-1β, tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia. Rochelson et. al., (2006) (53), demostraron una acción anti-inflamatoria del sulfato de magnesio en cultivos de células endoteliales humanas del cordón umbilical (HuVECs) en presencia antes, durante y después de un estímulo con LPS. También, observaron una reducción en la expresión de ICAM-1 y la inhibición de la degradación del factor IkBα y translocación de NFκB, cuando se adiciona el sulfato de magnesio en los cultivos de HuVECs. A su vez, Dowling *et al*., (2012) (28), empleando dos modelos experimentales, demostraron como la administración de sulfato de magnesio atenúa la producción de mediadores pro-inflamatorios (CCL-2 o MCP-1; TNF-α e IL-6) dentro de la placenta humana en presencia de LPS. Demostraron además, como el sulfato de magnesio genera la supresión en la activación del factor NFκB dentro del tejido placentario.

Aun cuando los hallazgos obtenidos en este estudio no permiten confirmar el mecanismo de acción por el cual el sulfato de magnesio posee un efecto anti-inflamatorio en los procesos inflamatorios por LPS, todo parece señalar que una de las vías por la cual el sulfato de magnesio genera dicha acción, es a través de la inhibición de la degradación de IκBα y por ende la translocación del factor NFκB en los tejido placentarios, por lo que nuevas investigaciones deberán ser realizadas con el fin de demostrar estos hallazgos.

Por otra parte, la acción anti-inflamatoria descrita para el sulfato de magnesio también ejerce una acción protectora sobre el feto. Tam Tam *et al*., (2011) (27), empleando modelos de rata preñadas a las cuales se inocularon con LPS demostraron un aumento tanto en el compartimento materno como fetal de los niveles de secreción de: TNF-α, IL-6 y MCP-1 y GRO-KC, los cuales se redujeron de forma significativa luego de la administración de sulfato de magnesio en ambos compartimientos. Burd et. al., (2010) (30), igualmente investigaron el efecto del sulfato de magnesio en la prevención de lesiones cerebrales fetales presentes en los partos prematuro asociados con inflamación, concluyendo que aunque no encontraron diferencias en la expresión de citocinas pro-inflamatorias y marcadores de muerte celular, si evidenciaron como el sulfato de magnesio impide cambios morfológicos celular a nivel neuronal causados por la presencia de LPS.

Los hallazgos encontrados en investigaciones previas juntos con los valorados en este estudio permiten afirmar al sulfato de magnesio como un potente protector y supresor de los efectos perjudiciales encontrados en los cuadros inflamatorios dados durante el embarazo tanto para la madre como para el feto. Además, estos resultados permiten sugerir la administración del sulfato de magnesio por cortos períodos de tiempo, en aquellas madres que durante el embarazo presentaran cuadros infecciosos, con el fin de disminuir los efectos perjudiciales encontrados durante dichos trastornos

Declaración financiamiento y conflictos de interés

Este trabajo fue parcialmente apoyado por la subvención PG 09-6579-2006 de CDCH-UCV y por una subvención de Decanato de Post-grado USB. Los autores reportan ningún conflicto de intereses. Los autores solo son responsables del contenido y la redacción del documento

Referencias

1. El-Sayed AAF. Preeclampsia: A review of the pathogenesis and possible management strategies based on its pathophysiological derangements. Taiwan J Obstet Gynecol 2017;56:133-138. https://doi.org/10.1016/j.tjog.2017.08.004
2. Pacheco-Romero J. Introducción al Simposio sobre Preeclampsia. Rev Peru Ginecol Obstet 2017;63(2):199-206. [citado agosto 2019] Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-51322017000200007
3. ACOG Practice Bulletin No. 202. Gestational Hypertension and Preeclampsia. Obstet Gynecol 2019;133(1):e1-e25. https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000003018.
4. Bolte AC, Van Geijn HP, Dekker GA. Management and monitoring of severe preeclampsia. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2001;96(1):8-20. https://doi.org/10.1016/S0301-2115(00)00383-3
5. Núñez-González J, Sanabria-Vera Ch, Romero-Adrián T, Núñez L, Montiel I, Boscán F *et al*. Óxido nítrico, malondialdehído, perfil lipídico, factor de necrosis tumoral alfa y sus receptores solubles en mujeres no embarazadas, gestantes normales y preeclámpticas. Gac Med Caracas 2001;109(3):352-360.
6. Aban M, Cinel L, Arslan M, Dilek U, Kaplanoglu M, Arpaci R, *et al*. Expression of nuclear Factor-Kappa B and placental apoptosis in pregnancies complicated with intrauterine growth restriction and preeclampsia: a immunohistochemical study. Tohoku J Exp Med 2004;204:195-202. [citado agosto 2019] Disponible en: http://www.journal.med.tohoku.ac.jp/2043/TJ2043_04.pdf
7. Duley L, Meher S, Abalos E. Management of pre-eclampsia. BMJ 2006;332:463. https://doi.org/10.1136/bmj.332.7539.463
8. Feinberg BB. Preeclampsia: The death of goliath. Am J Reprod Immunol 2006;55(2):84-98. https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2005.00362.x
9. Pacheco J. Preeclampsia/eclampsia: Reto para el ginecoobstetra. Acta Med Per 2006; 23(2):100-111. [citado agosto 2019] Disponible en: http://www.scielo.org.pe/pdf/amp/v23n2/v23n2a10.pdf
10. Yegüez FA, Castejón OC. Etiopatogenia de la preeclampsia. Gac Med Caracas 2007;115(4):271-273.
11. Briones VCG, Meneses CJ, Moreno SA, González DJ, Díaz de León PM, Briones GJ. Preeclampsia: Una nueva teoría para un viejo problema. Rev Aso Mex Med Crit y Ter Int 2008;22(2):99-104. [citado agosto 2019]. Disponible en: https://www.medigraphic.com/pdfs/medcri/ti-2008/ti082h.pdf
12. Reyna-Villasmil E, Mayner-Tresol G, Herrera-Moya P, Briceño-Perez C. Marcadores clínicos, biofísicos y bioquímicos para la predicción de preeclampsia. Rev Peru Ginecol Obstet 2017;63(2):227-233. [citado agosto 2019]. Disponible en: https://www.redalyc.org/pdf/3234/323451873011.pdf
13. Redman CW, Sargent IL. Immunology of pre-eclampsia. Am J Reprod Immunol 2010;(63):534–543. https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00831.x.
14. Proverbio F, Abad C, Proverbio T, Piñero S, Botana D, Chiarello DI, Marín R. Preeclampsia, peroxidación lipídica y Ca-ATPasa. Acta Cient Venez 2009;60(4):196-201.
15. Turner JA. Diagnosis and management of pre-eclampsia: an update. Int J Womens Health 2010;2:327-337. https://doi.org/10.2147/IJWH.S8550
16. Aranda P, Planells E, Llopis J. Magnesio. Ars Pharmaceutica 2000;41(1):91-100.
17. Simon J, Gray A, Duley L. Cost-effectiveness of prophylactic magnesium sulphate for 9996 women with pre-eclampsia from 33 countries: economic evaluation of the Magpie Trial. BJOG An Intern J Obstet Gynaec 2005;113(2):144-151. https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2005.00785.x.
18. Cnossen JS, Ter Riet G, Mol BW, Van Der Post JA, Leeflang MM, Meads CA, *et al*. Are tests for predicting pre-eclampsia good enough to make screening viable? A review of reviews and critical appraisal. Acta Obstet Gynec Scand 2009;88(7):758-765. https://doi.org/10.1080/00016340903008953.
19. Euser AG, Cipolla MJ. Magnesium sulfate treatment for the prevention of eclampsia: A brief review. Stroke 2009;40(4):1169-1175. https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.527788
20. Duley L, Gülmezoglu AM, Henderson-Smart DJ, Chou D. Magnesium sulphate and other anticonvulsants for women with pre-eclampsia. Cochrane Database Sys Rev 2010; (11):CD000025. https://doi.org/10.1002/14651858.CD000025.pub2.
21. Hannan NJ, Brownfoot FC, Cannon P, Deo M, Beard S, Nguyen TV, *et al*. Resveratrol inhibits release of soluble fms-like tyrosine kinase (sFlt-1) and soluble endoglin and improves vascular dysfunction–implications as a preeclampsia treatment. Scientific Reports 2017;7(1):1819. https://doi.org/10.1038/s41598-017-01993-w.
22. Kämmerer U, Von Wolff M, Markert UR. Immunology of human endometrium. Inmunobiology 2004;209(7):569-574. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2004.04.009
23. Duley, L. Evidence and practice: the magnesium sulphate story. Best Pract Res Clin Obstet Gynaec 2005;19(1):57-74. https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2004.10.010.
24. Recomendación de la OMS para la prevención y el tratamiento de la preeclampsia y eclampsia. [homepage on the internet] The WHO Reproductive Health Library. Ultimo actualization Octubre 2011. Disponible: RHL (https://extranet.who.int/rhl).
25. Roy J, Kumar Mitra J, Pal A. Magnesium sulphate versus phenytoin in eclampsia–Maternal and foetal outcome. A comparative study. Australas Med J 2013;6(9):483-495. https://doi.org/10.4066/AMJ.2013.1753.
26. Bittar, R. E., Zugaib, M. Tratamento do trabalho de parto prematuro. Rev Bras Ginecol Obstet 2009;31(8):415-422. https://doi.org/10.1590/S0100-72032009000800008.
27. Tam Tam HB, Dowling O, Xue X, Lewis D, Rochelson B, Metz CN. Magnesium sulfate ameliorates maternal and fetal inflammation in a rat model of maternal infection. Am J Obstet Gynec 2011;204(4):364 e1-364e8. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.11.006.
28. Dowling O, Chatterjee PK, Gupta M, Tam Tam HB, Xue X, Lewis D, *et al*. Magnesium sulfate reduces bacterial LPS-induced inflammation at the maternal-fetal interface. Placenta 2012;33(5):392-398. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.01.013.
29. Alday E, Uña R, Redondo FJ, Criado A. Magnesium in anesthesia and postoperative recovery care. Rev Esp Anestesiol Reanim 2005;52(4):222-234. [citado agosto

2019]. Disponible en: https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/ibc-036969?lang=en.

30. Burd I, Breen K, Friedman A, Chai J, Elovitz MA. Magnesium sulfate reduces inflammation-associated brain injury in fetal mice. Am J Obstet Gynecol 2010; 202(3):292.e1-292.e9. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.01.022.
31. Costantine MM, Drever N. Antenatal exposure to magnesium sulfate and neuroprotection in preterm infants. Obstet Gynecol Clin North Am 2011;38(2):351-366. https://doi.org/10.1016/j.ogc.2011.02.019.
32. Meller CH, Izbizky G, Otaño L. Actualización sobre el uso de sulfato de magnesio como neuroprotector en el parto prematuro. Arch Argent Pediatr. 2015;113(4):345-352. [citado agosto 2019]. Disponible en: https://www.sap.org.ar/docs/publicaciones/primero/2015/AE%20Meller_anticipo_6-7-15.pdf
33. Chiarello D, Marín R, Fulgencio P, Coronado P, Toledo F, Salsoso R, Gutiérrez J, Sobrevia L. Mechanisms of the effect of magnesium salts in preeclampsia. Placenta 2018;69:134-139. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.04.011.
34. 34.Goncalves J, Méndez Y, Casart YC, Camejo MI. Estandarización de condiciones de cultivos para explantes de placenta humana. XXI Reunión Bienal de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH). San Pablo, Brasil. Del 22 al 24 de Abril, 2009.
35. Holcberg G, Amash A, Sapir O, Hallak M, Sheiner E, Ducler D, *et al*. Different effects of magnesium sulfate and angiotensin II on the capacity of the fetal and maternal compartments of normal human placenta to secrete TNF–α and IL-6. J Reprod Immunol 2006;69(2):115-125. https://doi.org/10.1016/j.jri.2005.09.005
36. Benyo DF, Miles TM, Conrad KP. Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta. J Clin Endocrinol Metab 1997;82(5):1582-1588. https://doi.org/10.1210/jcem.82.5.3916.
37. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. 2004. Inmunología. México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana.
38. Makris A, Thornton CE, Xu B, Hennessy A. Garlic Increases IL-10 and Inhibits TNF alfa and IL-6 production in Endotoxin-stimulated Human Placental Explants. Placenta 2005; 26(10):828-834. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.10.019
39. Sharma A, Satyam A, Sharma JB. Leptin, IL-10 and inflammatory markers (TNF-alpha, IL-6 and IL-8) in pre-eclamptic, normotensive pregnant and healthy non-pregnant women. Am J Reprod Immunol 2007;58(1):21-30. https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2007.00486.x.
40. Hanna N, Bonifacio L, Weinberger B, Reddy P, Murphy S, Romero R, Sharma S. Evidence for interleukin-10-mediated inhibition of cyclo-oxygenase-2 Expression and prostaglandin production in preterm human placenta. Am J Reprod Immunol 2006; 55(1):19-27. https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2005.00342.x.
41. Royle C, Lim S, Xu B, Tooher J, Ogle R, Hennessy A. Effect of hypoxia and exogenous IL-10 on the pro-inflammatory cytokine TNF-alpha and the anti-angiogenic molecule soluble Flt-1 in placental villous explants. Cytokine 2009;47(1):56-60. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.04.006.
42. Peltier, MR, Gurzenda EM, Murthy A, Chawala K, Lerner V, Kharode I, *et al*. Can Oxygen Tension Contribute to an Abnormal Placental Cytokine Milieu? Am J Reprod Immunol 2011;66(4):279-285. https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.00998.x.
43. Denison FC, Kelly RW, Calder AA, Riley SC. Cytokine secretion by human fetal membranes, decidua and placenta at term. European Society of Hum Reprod 1998;13(12):3560-3565. https://doi.org/10.1093/humrep/13.12.3560.
44. Rinehart BK, Terrone DA, Lagoo-Deenadayalan S, Barber WH, Hale EA, Martin JN, *et al*. Expression of the placental cytokines tumor necrosis factor alfa, interleukin 1β, and interleukin 10 is increased in preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 1999;181(4):915-920. https://doi.org/10.1016/s0002-9378(99)70325-x.
45. Laham N, Brennecke SP, Rice GE. Interleukin-8 release from human gestational tissue explants: the effects of lipopolysaccharide and cytokines. Biol Reprod 1997;57(3):616-620. https://doi.org/10.1095/biolreprod57.3.616.
46. Ma Y, Mor G, Abrahams VM, Buhimschi IA, Buhimschi CS, Guller S. Alterations in Syncytiotrophoblast Cytokine Expression Following Treatment with Lipolysaccaharide. Am J Reprod Inmunol 2006;55(1):12-18. https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2005.00347.x.
47. Malek A, Sager R, Schneider H. Effect of Hypoxia, Oxidative Stress and Lipopolysaccharides on the Release of Prostaglandins and Cytokines from Human Term Placental Explants. Placenta 2001;22(15):S45–S50. https://doi.org/ 10.1053/plac.2001.0635.
48. Crocker IP, Tansinda DM, Jones CJ, Baker PN. The influence of oxygen and tumor necrosis factor-alfa on the cellular kinetics of term placental villous explants in culture. J Histochem Cytochem 2004;52(6):749-757. https://doi.org/ 10.1369/jhc.3a6176.2004
49. Hung TH, Charnock-Jones DS, Skepper JN, Burton GJ. Secretion of tumor necrosis factor-alpha from human placental tissues induced by hypoxia-reoxygenation causes endothelial cell activation in vitro: A potential mediator of the inflammatory response in preeclampsia. Am J Pathol 2004;164(3):1049-1061. https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63192-6.
50. Williams MA, Mahomed K, Farrand A, Woelk GB, Mudzamiri S, Madzime S *et al*. Plasma tumor necrosis factor-alpha soluble receptor p55 (sTNFp55) concentrations in eclamptic, preeclamptic and normotensive pregnant Zimbabwean women. J Reprod Inmunol 1998;40(2):159-173. https://doi.org/10.1016/s0165-0378(98)00074-6
51. Anaya J. Descripción molecular del TNF-α. Reumatología 2003;19(2):112-120.[citado agosto 2019]. Disponible en:https://www.yumpu.com/es/document/read/40592567/descripcian-molecular-del-tnf-i
52. Carpentier PA, Dingman AL, Palmer TD. Placental TNF-α Signaling in Illness-Induced Complications of Pregnancy. Am J Pathol 2011; 178(6):2802-2810. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.02.042.
53. Rochelson B, Dowling O, Schwartz N, Metz CN. Magnesium sulfate suppresses inflammatory responses by human umbilical vein endothelial cells (HuVECs) through the NFkappaB pathway. J Reprod Immunol 2006;73(2):101-107. https://doi.org/10.1016/j.jri.2006.06.004

VALORES DE REFERENCIA DE ZINC Y COBRE EN NIÑOS APARENTEMENTE SANOS

María Fátima Garcés[1], Celsy Hernández[2], Yacelli Bustamante[3], Yraima Patiño[4], Betania Rodríguez[4], Ana Cecilia Márquez[5], Xiomara Moreno[6].

[1]Licenciada en Bioanálisis. Dra. En Ciencias Mención Bioquímica. Profesor Titular. Cátedra de Bioquímica "A". Coordinador del Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas. Director de la Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. [2] Licenciada en Bioanálisis. M.Sc. en Sistemas de la Calidad. Profesor Agregado. Cátedra de Bioquímica "B". Investigador del Laboratorio de Investigaciones básicas y Aplicadas. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. [3]Licenciada en Bioanálisis. MSc. en Sistemas de la Calidad. Profesor Asociado. Cátedra de Matemática y Bioestadística. Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. [4] Licenciada en Bioanálisis. Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas. Facultad de Medicina, Escuela de Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela. [5] Médico Cirujano. Especialista en Psiquiatría. Coordinador de la Unidad de Autismo. Maternidad Concepción Palacios. [6]Licenciada en Bioanálisis. M.Sc. En Micología Médica. Microbiólogo del Departamento de Microbiología. Instituto Médico la Floresta.
Recibido para publicación el 5 octubre 2019. Aprobado para publicación el 5 noviembre 2019.

RESUMEN:
Introducción: El zinc (Zn) y el cobre (Cu) son oligoelementos importantes para el desarrollo cognoscitivo y neurológico normal de los niños. **Objetivo:** Establecer los valores de referencia de Zn y Cu séricos en niños aparentemente sanos. **Métodos:** Se utilizaron muestras de suero de niños de ambos sexos (n = 69), clínicamente sanos, elegidos al azar, provenientes del Colegio "Patria de Bolívar", ubicado en Santa Mónica - Caracas, con edades comprendidas entre 4 y 14 años, cuyos padres o representantes aceptaron y dieron su consentimiento informado para la participación del niño en el estudio, todos residentes actuales de la Gran Caracas. Los niveles de Zn y Cu se determinaron en muestras de suero, recolectadas luego de un periodo de ayuno de 8 a 12 horas, libres de hemólisis, ictericia y turbidez, por un método estandarizado y controlado, de espectrofotometría de absorción atómica. **Resultados:** Las concentraciones séricas promedio de Zn, Cu y relación Zinc/Cobre (Zn/Cu) fueron de 1,159 ± 0,269, 1,660 ± 0,238 y 0,712 ± 0,206, mg/L, respectivamente. No hubo diferencias significativas en las concentraciones de los elementos Zn y Cu entre los varones y las hembras en los diferentes grupos etarios. No se encontraron deficiencias de Zn y Cu en los niños incluidos en estudio. Los valores de referencia determinados para Zn fueron de 0,781 – 1,815 mg/L, Cu 1,230 – 2,132 mg/L y relación Zn/Cu 0,398-1,223. **Conclusiones:** La metodología estandarizada que se empleó para llevar a cabo las respectivas determinaciones de Zn y Cu por Espectrofotometría de absorción atómica, resultó adecuadamente precisa, y útil para el análisis de las muestras clínicas. Es necesario establecer los valores de referencia de estos oligoelementos en la población pediátrica, a fin de poder evidenciar posibles deficiencias que puedan afectar el normal desarrollo neurológico y cognoscitivo en los niños, entre otros aspectos.

Palabras claves: Niños, Pediatría, Valores de referencia, Cobre, Zinc, espectrofotometría de absorción atómica.

REFERENCE VALUES OF ZINC AND COPPER IN APPARENTLY HEALTHY CHILDREN

SUMMARY
Introduction: Zinc (Zn) and copper (Cu) are trace elements important for the normal cognitive and neurological development of children. **Objective:** To establish the reference values of serum Zn and Cu in apparently healthy children. **Methods:** Serum samples from children of both sexes (n = 69), clinically healthy, randomly chosen, from the Colegio "Patria de Bolívar", located in Santa Mónica - Caracas, aged between 4 and 14 years, were used. Their parents or representatives accepted and gave their informed consent for the child's participation in the study, all of them current residents of Greater Caracas. Zn and Cu levels were determined in serum samples, collected after a fasting period of 8 to 12 hours, free of hemolysis, jaundice, and turbidity, by a standardized and controlled method of atomic absorption spectrophotometry. **Results:** The mean serum concentrations of Zn, Cu, and the Zinc / Copper ratio (Zn / Cu) were 1,159 ± 0,269, 1,660 ± 0,238 and 0,712 ± 0,206 mg/L, respectively. There were no significant differences in the concentrations of the elements Zn and Cu between males and females in the different age groups. Zn and Cu deficiencies were not found in the children included in the study. The reference values determined for Zn were 0,781 - 1,815 mg/L, Cu 1,230 - 2,132 mg/L and Zn / Cu ratio 0,398 - 1,223. **Conclusions:** The standardized methodology that was used to carry out the respective determinations of Zn and Cu by atomic absorption spectrophotometry, was adequately precise and useful for the analysis of clinical samples. It is necessary to establish the reference values of these trace elements in the pediatric population, in order to be able to show possible deficiencies that may affect normal neurological and cognitive development in children, among other aspects.

Key words: Children, Pediatrics, Reference values, Copper, Zinc, atomic absorption spectrophotometry.

Solicitar copia a: Dra. María Fatima Garcés (mariafatimagarces@hotmail.com; mariafatimagarcesdasilva@gmail.com)

Introducción

El cobre (Cu) y el zinc (Zn) son micronutrientes esenciales que desempeñan funciones indispensables para mantener la vida, el crecimiento, la diferenciación celular y reproducción; por lo que sus deficiencias producen alteraciones funcionales y estructurales que generan un deterioro celular y tisular, que afecta al sistema inmunológico y al desarrollo neurológico y cognoscitivo de los niños, entre otros (1-6).

El zinc como oligoelemento tiene tres funciones importantes: catalítica, estructural y reguladora (4, 5). Es uno de los elementos esenciales más abundantes en el cuerpo humano y al ser un ion intracelular se encuentra en su mayoría en el citosol. Es el segundo oligoelemento en relación a la cantidad total en el organismo, siendo superado por el Fe (7). El Zn se encuentra presente en todos los órganos, tejidos, fluidos y secreciones del cuerpo humano. Aproximadamente el 83% del Zn en el organismo, se encuentra en músculo y hueso y el 95% se encuentra a nivel intracelular (8).

Se considera que la ingesta inadecuada de Zn es responsable del 20% de la mortalidad infantil mundial (9). Los niños con anemia por deficiencia de hierro tienen niveles séricos elevados de Cu y niveles séricos bajos de Zn (10). Las deficiencias de oligoelementos surgen de una baja ingesta dietética y se desarrollan especialmente cuando aumentan las necesidades o se agotan las reservas corporales. La absorción de oligoelementos puede verse afectada por una mayor ingesta de componentes dietéticos, como el fitato o la ingesta excesiva de suplementos minerales (11). Otro posible mecanismo para la deficiencia de oligoelementos es la excreción o el uso excesivo. La deficiencia de Zn y Cu también se encuentra en síndromes de malabsorción, como diarrea crónica, enfermedad celíaca, enfermedad inflamatoria intestinal, ileostomía, cirrosis alcohólica y anemia hemolítica (12).

El Cu también es un nutriente dietético vital, aunque solo en pequeñas cantidades del metal son necesarios para el bienestar. El Cu es el tercer oligoelemento traza más abundante en el organismo (luego del hierro y el Zn). El cobre está presente en casi todos los tejidos del cuerpo y se almacena principalmente en el hígado y en menor proporción en el cerebro, el corazón, riñón y músculos (13). El cobre se absorbe en el intestino y es transportado al hígado. En la sangre, el cobre es principalmente distribuido entre los eritrocitos y el plasma (14). Se transporta en forma de ceruloplasmina al plasma donde se controla su metabolismo y se excreta en la bilis (15). La ceruloplasmina representa el 90% del contenido de cobre en sangre y es responsable de llevar cobre a las células deficientes (16). La superóxido dismutasa una metaloenzima de cobre-zinc contiene el 60% del cobre en los eritrocitos y el restante 40% está débilmente unido a otras proteínas y aminoácidos.

En los últimos años, se han realizado esfuerzos para establecer valores y proporciones normales de metales en humanos, incluyendo suero y plasma, con el objetivo de determinar los rangos que mejor apoyan una correcta actividad enzimática y condición de salud. El zinc y el cobre tienen efectos antagónicos entre sí. Hay varios estudios publicados que afirman que la proporción normal de zinc a cobre, en niños y adultos, es cercana a 1: 1 y esta se ha asociado con una respuesta inmune más eficaz a los agentes infecciosos (17). El zinc mantiene un equilibrio con el cobre en la sangre, y los niveles en sangre de ambos tienden a estar inversamente relacionados, los niveles bajos de zinc plasmático casi siempre se asocia con niveles altos de cobre sérico.

La relación Zinc/Cobre (Zn/Cu) se ha establecido como un método rápido para determinar el estado funcional del sistema metalotioneína (MT). Las proporciones más bajas de Zn/Cu pueden reflejar deficiencia de zinc corporal y disminución de la eficiencia en la eliminación de metales pesados nocivos de los tejidos y la sangre a través del sistema MT. Una de las principales funciones de MT es eliminar iones metálicos, principalmente para mantener homeostasis de zinc y cobre (18). Dado que el zinc y el cobre interactúan con MT, la relación Zn/Cu puede ser visto como una forma de determinar el estado del sistema MT.

Las deficiencias de Zn y/o Cu son frecuentes en lactantes, niños y mujeres embarazadas, de ahí la importancia de tener establecidos los niveles de referencia y contar con una metodología estandarizada y precisa para medirlos. El objetivo de este estudio fue establecer los valores de referencia séricos de Zn y Cu así como la Relación Zinc/Cobre en niños aparentemente sanos, empleando una metodología estandarizada y precisa fundamentada en la espectrofotometría de absorción atómica.

Métodos

Muestra

La muestra incluida en el estudio estuvo constituida por sesenta y nueve (69) niños aparentemente sanos seleccionados de manera intencional según criterios de inclusión, provenientes del Colegio "Patria de Bolívar", ubicado en Santa Mónica-Caracas, con edades comprendidas entre 4 y 14 años, cuyos padres o representantes aceptaron y dieron su consentimiento informado para que el niño participara en el estudio, todos residentes actuales de la Gran Caracas. Los criterios de inclusión para los participantes de este estudio incluyeron: a) Niños aparentemente sanos, normotípicos sin ninguna condición neurológica ni enfermedad gastrointestinal demostrada; b) Consentimiento informado escrito firmado, (donde se explican los beneficios y riesgos de su participación en la investigación).

Es importante destacar que el protocolo del estudio se realizó bajo las normas de ética establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), para trabajos de investigación en humanos y la declaración de Helsinki ratificada por la 29th World Medical Assembly, Tokio 1995 (19). Este estudio contó con la aprobación del Comité de Bioética de la Maternidad Concepción Palacios y el consentimiento informado de los padres y/o representantes de los niños incluidos en el estudio.

A cada niño incluido en el estudio se le realizó una toma de muestra de sangre venosa para la obtención de suero. La muestra de suero para la determinación de Zinc y Cu se obtuvo mediante una punción venosa en la región ante cubital del brazo, luego de 8 a 12 horas de ayuno, considerando e implementando todas las medidas para evitar la estasis venosa, así como la hemólisis al momento de la toma. La muestra se sangre venosa se recolectó en tubos comerciales al vacío con tapón de plástico blando y sin anticoagulante (Vacutainer® de BD Life Sciences). Inmediatamente luego de la retracción del coágulo, la muestra se centrifugó 10 minutos a 3.500 rpm. Una vez centrifugada, la muestra de suero fue separada del paquete globular y alicuotada en tubos de reacción (Eppendorf) estériles y deionizados. Inmediatamente, las alícuotas fueron conservadas a -70ºC hasta el momento de su análisis.

Determinación de Zn y Cu

Las concentraciones séricas de Zn y Cu se determinaron por espectrometría de absorción atómica utilizando un Espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer, modelo Analyst 200 (Norwalk, CT, EEUU), el cual emplea la absorción, emisión y fluorescencia de radiación electromagnética por partículas atómicas como principio para la determinación de cada especie atómica, y está compuesto por una lámpara de cátodo hueco para Cu y una lámpara de cátodo hueco para el Zn, así como por un quemador o mechero, constituido a su vez por un nebulizador de la muestra, y dispositivos de selección de longitudes de onda, transducción, amplificación y lectura de la señal (20).

La técnica de espectrometría de absorción atómica empleada consistió en la medición de la especie atómica por absorción a una longitud de onda de 234,75 nm para el Cu, y de 213, 86 nm para Zn. Las especies atómicas se lograron por atomización con la flama o llama, nebulizando y luego diseminando la muestra en forma de aerosol dentro de la llama de aire de acetileno con estequiometría oxidante.

Para llevar a cabo las determinaciones, todo el material de laboratorio empleado fue tratado con ácido nítrico al 10% durante doce horas, y posteriormente lavado cuatro veces con agua destilada desionizada.

Los estándares de Zn y Cu fueron preparados según las especificaciones del manual de Perkin Elmer, utilizando glicerol al 10%. Para cada elemento, se preparó una solución madre al 10%, a partir de la cual se realizaron diferentes diluciones con el fin de obtener patrones de diferentes concentraciones que incluyeron 0.25 mg/L, 0.50 mg/L y 0.75 mg/L para el Zn, y 0.2 mg/L, 0.4 mg/L, 0.8 mg/L para el Cu. Las concentraciones de los patrones fueron elegidas considerando los límites de cuantificación (Límite inferior de cuantificación y linealidad del método), así como los valores de referencia y variaciones fisiopatológicas para cada uno de los analitos (21).

Para llevar a cabo el procesamiento, las muestras fueron diluidas 1:5, lo cual se consiguió añadiendo 480 µl de agua destilada desoinizada a 120 µl de muestra, obteniendo un volumen final de 600µl, el cual fue sometido a análisis. Todas las muestras se analizaron por duplicado y se promediaron sus

valores, obteniendo las concentraciones de los elementos (Zn, Cu) por regresión lineal simple, de acuerdo al software del equipo Perkin Elmer.

Antes de llevar a cabo el análisis de las muestras, se determinó la precisión del sistema de medición mediante el análisis interdiario de un pool de muestras, el cual fue elaborado a partir de sueros de pacientes aparentemente sanos, libre de interferentes (turbidez, hemólisis, ictericia) y riesgos biológicos (VIH, Virus de Hepatitis), los cuales fueron recolectados y almacenados en iguales condiciones establecidas para las muestras de pacientes y controles. El análisis interdiario del pool de sueros se llevó a cabo por duplicado, diariamente durante 4 semanas. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente, para obtener media, desviación estándar y coeficiente de variación. El coeficiente de variación se utilizó para establecer la imprecisión del sistema de medición. Adicionalmente, se empleó la media ± 2 desviaciones estándar (95% de confianza), para establecer el rango de valores esperados en el análisis sucesivo del pool de muestras. Durante el procesamiento de las muestras se llevó a cabo el análisis por duplicado del mencionado pool de muestra, antes y después de la corrida analítica, con el fin de llevar a cabo el control del proceso de medición, empleando como criterios de aceptación y rechazo las reglas y planes múltiples de Westgard. Todos los datos generados en el control del proceso de medición fueron registrados y graficados semanalmente (gráfica de levey-Jennings), a fin de llevar a cabo la identificación de datos atípicos y tomar las acciones correctivas y preventivas pertinentes.

Para llevar a cabo el análisis de los resultados de las muestras, los valores de referencia empleados fueron 0,82 a 2,80 μg/ml para el Cu y 0,78 a 2,51 μg/ml para el Zn, respectivamente.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos del procesamiento de las muestras y determinación de los oligoelementos, fueron procesados mediante el software estadístico R (22) y se analizaron siguiendo los procedimientos estadísticos recomendados por la Federación Internacional de Química Clínica (23). En primer lugar, se realizó un análisis de estadística descriptiva, se verificaron valores aberrantes o extremos con base a los criterios de Dixon (24) y el cumplimiento de los supuestos estadísticos normalidad mediante la prueba estadística Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) en R. Asimismo se hizo uso de estadística inferencial para comprobar diferencias de medias entre grupos para aplicar criterios de partición entre grupos.

Valores de referencia

Los valores de referencia se calcularon considerando el 95% central de la distribución, usando como límites inferior y superior del valor de referencia los percentiles 2.5 y 97.5, respectivamente. El algoritmo de cálculo de valores de referencia respeta lo recomendado por el protocolo NCCLS C28-A2, (24) y recomendaciones de otros autores (25,26).

Resultados

Características generales de la muestra

La muestra estuvo conformada por 69 niños neurotípicos, con edades comprendida entre 4 y 12 años, con una media de 7 años. Con respecto al sexo, el 54% fueron del género femenino y 46% del masculino.

Determinación de Zn y Cu

Se obtuvieron coeficientes de variación de 2,1 % y 2,0% para Cu y Zn, respectivamente.

En cuanto al análisis de muestras, los datos obtenidos de la determinación de Zn, Cu y Relación Zn/Cu se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Niveles de Zn, Cu y Relación Zn / Cu en niños aparentemente sanos.

Estadísticos	Zn (mg/L)	Cu (mg/L)	Zn/Cu
Mínimo	0.665	1.070	0.373
Media	1.159	1.660	0.712
Mediana	1.105	1.645	0.666
Máximo	2.165	2.360	1.429
Desviación típica	0.269	0.238	0.206
N	67	69	67

Partición en grupos por factores de variabilidad Biológica (edad, sexo, etc)

Se decidió evaluar como posible factor de partición el género (Sexo) de los individuos. Los gráficos de densidad (Gráfico 1) permiten observar la

distribución de los resultados de los oligoelementos Cobre y Zinc, y su Relación. Se puede observar que en los tres casos las distribuciones según el sexo son similares, la curtosis de la distribución de valores de Zinc y la Relación Zn/Cu, para el género femenino es leptocúrtica al compararle con la del género masculino. Asimismo, se observa también para estas dos pruebas que sin importar el sexo, parecen reportar resultados sesgados a la izquierda. Ahora analizando el comportamiento de cada variable por el género, gráficamente en los tres casos se observa que los resultados se superponen, por lo que debemos esperar al estudio de la diferencia de medias.

Se verificó la normalidad de los subgrupos creados según el género femenino o masculino, (Tabla 2), obteniendo a través de la prueba de Kolmogorov Smirnov modificada por Lilliefors que no es significativa (p>0,05), por lo que no se rechaza la hipótesis de normalidad con un nivel de significación del 5%.

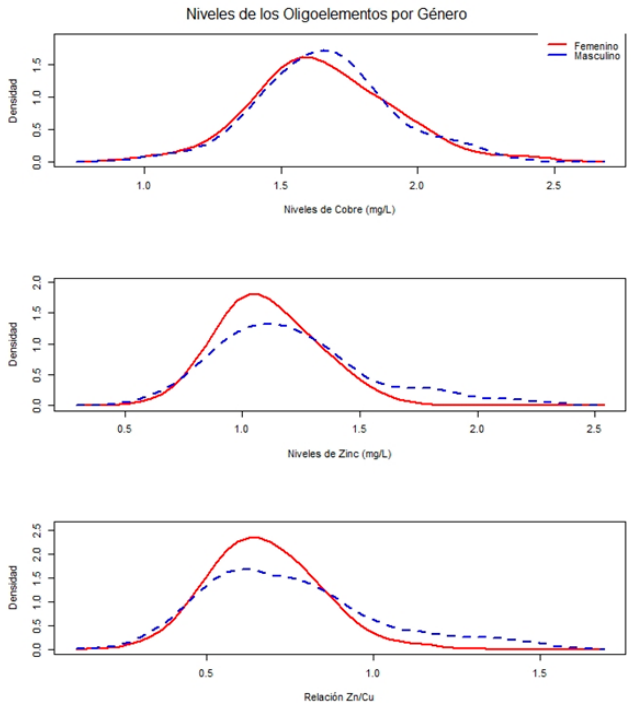


Gráfico 1. Gráficos de densidad. Distribución de niveles de Cobre, Zinc y Relación de Zn/Cu sérico en niños aparentemente sanos según su género

Tabla 2. Prueba de normalidad por género

Oligoelemento / Relación	p valor Lilliefors Kolmogorov-Smirnov	
	Femenino	Masculino
Cobre	0,5646	0,3061
Zinc	0,3659	0,1955
Relación Zn/Cu	0,5817	0,1494

Partiendo de la normalidad de los subgrupos según el género, se verificó la homogeneidad de las varianzas para aplicar la prueba t para muestras independientes según corresponda. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Comparación de Niveles de Zn, Cu y relación Zn/Cu en niños

Oligoelemento / Relación	Prueba Igualdad de las varianzas		Prueba t muestras independientes	
	F	p valor	T	p valor
Cobre	1,1672	0.6649	-0,09044*	0.9282
Zinc	0.31471	0.001306	-1,6882**	0.09789
Relación Zn/Cu	0.32138	0.001584	-1,5255**	0.1337

* Prueba t asumiendo varianzas iguales. ** Prueba t para varianzas diferentes

Considerando los resultados de la prueba F para homogeneidad de varianzas, asumimos varianzas iguales para los valores de cobre (p>0,05) y heterocedasticidad de las varianzas en los grupos para el Zinc y la Relación de Zn/Cu (p<0,05). Al aplicar la prueba t para muestras independientes no se encontraron diferencias significativas en los valores de Cobre, Zinc y la Relación Zn/Cu para un nivel de significación de 5% (p>0,05) en los grupos según el género, por lo tanto no se justifica la partición o determinación de los valores de referencia en grupos según el género.

Determinación de outliers. Criterios de Dixon

Se entiende como valores extremos aquellos datos que se apartan de modo notable de la distribuci6n y

que, por tanto, es poco verosímil que pertenezcan a la misma. Estos valores no corresponden a posibles errores analíticos, lo cual fue contemplando en el control interno de la calidad realizado. Una vez identificados los valores extremos podrán ser eliminados de los datos. Se recomienda el criterio de Dixon, para ello se calculó la relación D/R, donde D es la diferencia absoluta entre observación extrema (máximo o mínimo) y la siguiente más grande (o más pequeña) observación, y R es el rango de todas las observaciones (máximo - mínimo). El valor de corte es 1/3; es decir, si el valor observado de D fuera igual o superior a un tercio del rango R, la observación extrema se eliminaría (24). Con base a estos criterios no se obtuvieron valores extremos en los oligoelementos Cobre y Zinc, ni en la relación Zn/Cu, como se detalla en la Tabla 4.

Tabla 4. Criterio de Dixon para identificación de valores extremos

Valor D	Zn	Cu	Zn/Cu
X2-X1	0.070	0.030	0.047
Xn-Xn-1	0.305	0.165	0.130
Dixon R/3	0.5	0.43	0.136

Verificación normalidad para todos los datos

Cuando se utiliza el método paramétrico, el número de individuos de referencia seleccionados debe ser de 30 como mínimo, pero si se utiliza el método no paramétrico, 120 es el número mínimo (27). En nuestra experiencia, el tamaño muestral es mayor de 30, pero menor a 120, por lo que se verificó los supuestos de normalidad para cada uno de los oligoelementos. El Gráfico 2, presenta la comparación de los gráficos de caja en cada uno de los elementos. Observamos que las distribuciones se asemejan a una normal, lo cual se corresponde a lo mostrado en los resultados de la Tabla 5, con algunos valores outliers según los criterios de los gráficos de caja (desestimados por los criterios de Dixon presentados).

Gráficos de Caja para observar la distribución de los datos

Con estos gráficos se puede observar que las distribuciones se asemejan a una distribución normal, con algunos valores outliers según los criterios de los gráficos de caja, pero para asegurar esto debemos aplicar un test para verificar normalidad.

En la Tabla 5, mediante el test de normalidad de Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov), se verificó la hipótesis de que las muestras provienen de una

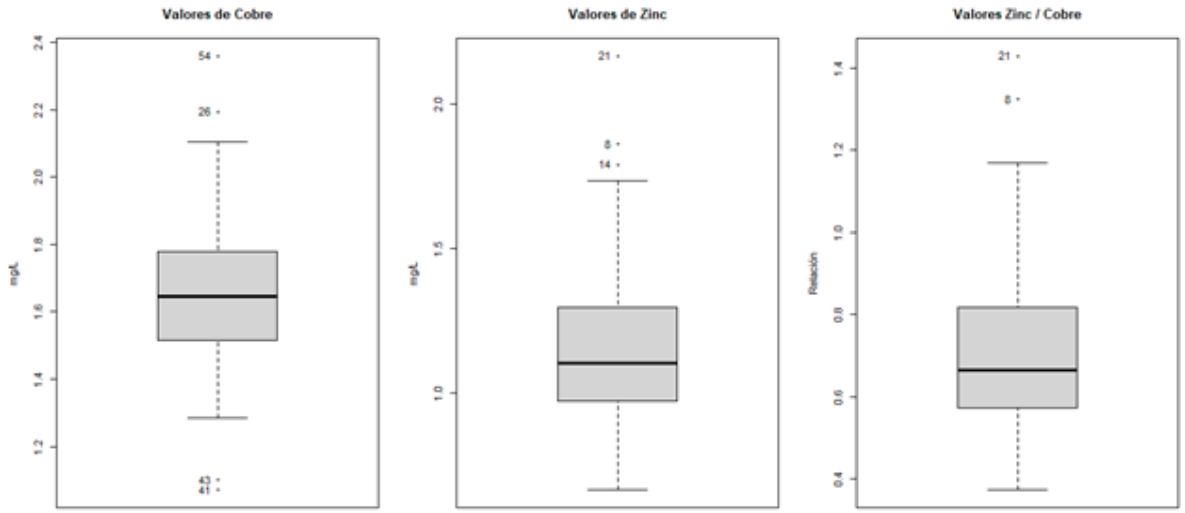


Gráfico 2. Gráficos de Caja con la distribución de todos los datos por Oligoelemento y su relación

Tabla 5. Resultados del Test de Normalidad con todos los individuos

Oligoelemento / Relación	Estadístico de Contraste	p valor
Cobre	D = 0.074673	0.4446
Zinc	D = 0.10362	0.07147
Relación Zn/Cu	D = 0.10342	0.07256

población normal, obteniendo que en todos los casos el p valor fue > 0,05, por lo que podemos asumir la normalidad de todas las distribuciones.

Con todo lo obtenido, se pudieron determinar los valores de referencia como los percentiles 2,5 y 97,5 que contiene al 95% de los valores que serán usados para referenciar los resultados de los diferentes individuos de características similares a nuestra experiencia. Estos valores se muestran en el Gráfico 3, donde se evidencia que los intervalos de referencia biológicos para el Cobre se encuentran entre 1,230 y 2,132 mg/L, Zinc entre 0,781 y 1,815 mg/L y la Relación Zn/Cu entre 0,398 y 1,223.

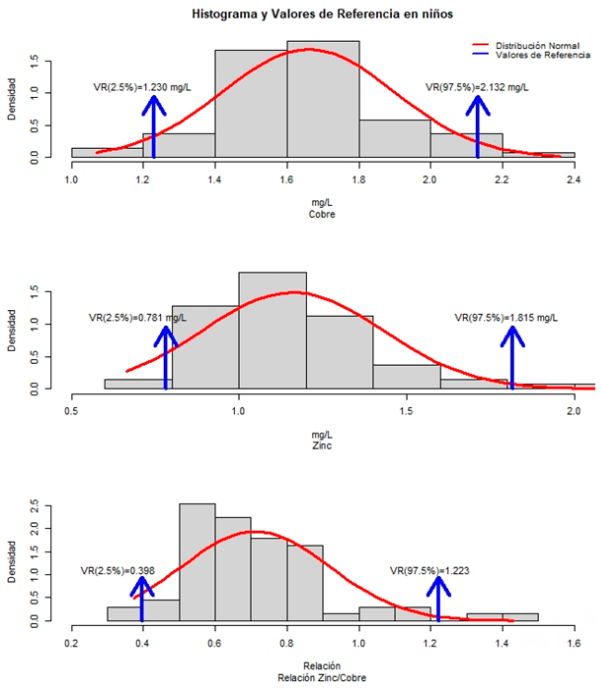


Gráfico 3. Distribución y Valores de Referencia

Discusión

En el presente trabajo, se determinaron las concentraciones de Zn y Cu en el suero de 69 niños sanos seleccionados de acuerdo a los criterios de inclusión con edades comprendidas entre 4 a 14 años, que residen en la Gran Caracas. Los valores de Zn sérico <0,70 mg/L (Gibson *et al.* 1989) (27), y Cu sérico <0,90 mg/L (Cordano 1998) (28), respectivamente, se escogieron como puntos de corte para indicar una nutrición inadecuada en estos micronutrientes.

Los niveles medios de Zn fueron 1,159 ± 0,269 mg/L, no encontrándose diferencia significativa en el nivel del zinc entre varones y hembras en los diferentes grupos de edad; este hallazgo concuerda con los trabajos de Carpentieri y col (29), Lockitch G y col (30), Feliu y col en Argentina (31) y Silva y col en Mérida, Venezuela (32). El valor de zinc sérico por debajo de 0,70 mg/L sugiere una nutrición inadecuada por deficiencia de Zn. Este valor se considera el límite más bajo para los adultos y los niños normales según Gibson y col (27). De acuerdo con esto, uno sólo de los niños del estudio (1,4%), presentó valores por debajo de esta cifra. El 71,7% de la población estudiada presenta valores de Zn entre 1 y 2 mg/L. Dorner y col., para una población similar (5 - 18 años), muestran valores de Zn sérico entre 0,64 - 1,10 mg/L, más bajos que los resultados obtenidos en este trabajo (33).

Con respecto a los niveles de Cobre la media obtenida fue de 1,660 ± 0,238 mg/L, sin diferencias significativas entre niños y niñas. Se encontró que el 91,3% de los niños presenta valores de Cu entre 1 y 2 mg/L. Dorner K y col. hallaron para Cu sérico una media de 0,98 mg/L con un rango entre 0,66 - 1,36 mg/L (34), resultados similares a los reportados por Lockitch G y col. en niños entre 1 y 13 años de edad 0,80 - 1,20 (30), Silva T y col. en una población de niños obtuvieron una media de 1,18 ±0,43 mg/L con un rango 0,87 – 1,49 (32) similar a lo reportado por Brunetto y col. (35), todos estos estudios hallaron niveles inferiores respecto a los encontrados en el presente trabajo. Otros estudios realizados en el mismo grupo de edad muestran valores similares a los de este estudio (36).

En este estudio no se encontraron niveles nutricionales inadecuados de Zn y Cu, lo cual puede estar relacionado a que estos niños no presentan desnutrición (datos no mostrados). Fernández y col

encontraron que a medida que aumenta el grado de desnutrición en el niño, disminuyen los niveles de Zn y Cu (37). Niveles disminuidos o hipocupremia fue reportada por Duran y col. (38) y Subotzky y col. 1992 (39) en infantes y niños malnutridos.

Por otra parte, cuando analizamos la relación Zn/Cu encontramos una media de 0,712 ± 0,206 mg/L y un rango de 0,398 - 1,223 mg/L. Valores de referencia para la relación Zn/Cu similares fueron reportados por Lockitch G y col., estos investigadores encontraron que la relación se mantenía constante a lo largo de todas las edades de la infancia, desde un mínimo de 0,4 hasta un máximo de 1,3 (30).

Las carencias marginales de estos elementos pueden estar determinadas por el ingreso inadecuado, la composición de la dieta, las infecciones recurrentes, las parasitosis, la diarrea y otras causas (40).

Conclusiones

Conocer el balance de micronutrientes es importante, en especial lo que se refiere al Zn, Cu y la relación Zn/Cu debido a que da una idea del estado nutricional del niño y orienta al clínico sobre los problemas que puede presentar el niño en su desarrollo cognoscitivo y/o neurológico normal, o bien que estemos en presencia de un problema de disbiosis con una relación Zn/Cu aumentada, u otro proceso infeccioso o malnutrición.

La metodología estandarizada que se empleó para llevar a cabo las respectivas determinaciones de Zn y Cu por Espectrofotometría de absorción atómica, resultó adecuadamente precisa y útil para el análisis de las muestras clínicas. Los valores de referencia establecidos son un aporte para poder evidenciar posibles deficiencias de estos oligoelementos en la población pediátrica, a fin de poder identificar posibles deficiencias que puedan afectar el normal desarrollo neurológico y cognoscitivo en los niños, entre otros aspectos.

Referencias

1. Hegazy AA, Zaher MM, Abd El-Hafez MA, Morsy AA, Saleh RA. Relation between anemia and blood levels of lead, copper, zinc and iron among children. BMC Res Notes. 2010;3:1–9. https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-133
2. Taha G, Afify M, Elmalah W and Gaber M. Impacts of Blood Lead Level on Trace Element Status and Hematological Parameters in Anemic Children from Beni-Suef, Egypt. J Clin Toxicol. 2018;8:2. https://doi.org/10.4172/2161-0495.1000383
3. Ergul AB, Turanoglu C, Karakukcu C, Karaman S, Altuner Torun Y. Increased Iron Deficiency and Iron Deficiency Anemia in Children with Zinc Deficiency. Eurasian J Med. 2018;50:34-37. https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2017.17237
4. Voskaki I, Arvanitidou V, Athanasopoulou H, Tzagkaraki A, Tripsianis G, Giannoulia-Karantana A. Serum copper and zinc levels in healthy Greek children and their parents. Biol Trace Elem Res. 2010;134(2):136–145. https://doi.org/10.1007/s12011-009-8462-2
5. Burjonrappa SC, Miller M. Role of trace elements in parenteral nutrition support of the surgical neonate. J Pediatr Surg. 2012;47(4):760–771. https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2012.01.015.
6. Özden TA, Gökçay G, Cantez MS, Durmaz Ö, İşsever H, Ömer B, Saner G. Copper, zinc and iron levels in infants and their mothers during the first year of life: a prospective study. BMC Pediatr. 2015;15:157. https://doi.org/10.1186/s12887-015-0474-9.
7. Rubio C, González-Weller D, Martín-Izquierdo R.E, Revert C, Rodríguez I, Hardisson A. El zinc: oligoelemento esencial. Rev Nutr Hosp. 2007; 22(1):101-107.
8. López D, Castillo C, Diazgranados D. El zinc en la salud humana I. Rev Chil Nutr. 2010;37(2):234-239. http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182010000200013
9. Jacks B, Sall M, Jacks G. A first assessment of zinc intake in Niger Inland Delta, Mali. Sight and Life. 2008;2:27–32.
10. Ece A, Uyanik BS, Iscan A, Ertan P, Yigitoglu MR. Increased serum copper and decreased serum zinc levels in children with iron deficiency anemia. Biol Trace Elem Res. 1997;59:31–39. http://dx.doi.org/10.1007/BF02783227.
11. Lönnerdal B. Dietary factors influencing zinc absorption. J Nutr. 2000;130:1378–1383. http://dx.doi.org/10.1093/jn/130.5.1378S
12. Gibson RS. Trace element deficiencies in humans. Can Med Assoc J. 1991;145:231.
13. Osredkar J and Sustar N. Copper and zinc, biological role and significance of copper/zinc imbalance. J Clinic Toxicol. 2011;S3:001. http://dx.doi.org/10.4172/2161-0494.S3-001
14. Minoia C, Sabbioni E, Apostoli P, *et al*. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European community I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects. Sci Total Environ. 1990:95:89–105. http://dx.doi.org/10.1016/0048-9697(90)90055-y.
15. Adelstein S and Vallee B. Copper metabolism in man. N Engl J Med. 1961;265:892–897. http://dx.doi.org/10.1056/NEJM196111022651806

16. Harris ED. Copper homeostasis: the role of cellular transporters. Nutr Rev. 2009:59(9):281–285. https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2001.tb07017.x
17. Van Weyenbergh J, Santana G, D'Oliveira A Jr, Santos AF Jr, CostaCH, Carvalho EM, *et al*. Zinc/copper imbalance reflects immune dysfunction in human leishmaniasis: and ex vivo and in vitro study. BMC Infect Dis. 2004;4:50. https://doi.org/10.1186/1471-2334-4-50.
18. Aschner M, Syversen T, Souza DO, Rocha JBT. Metallothioneins: mercury species-specific induction and their potential role in attenuating neurotoxicity. Exp Biol Med. 2006;231:1468–1473. https://doi.org/10.1177/153537020623100904.
19. The World Medical Association ethics unit declaration of helsinki. Disponible en: https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/. [citado 21 mayo 2019].
20. La espectrometría de absorción atómica. QuimiNet. 2008. Disponible en: https://www.quiminet.com/articulos/la-espectrometria-de-absorcion-atomica-31648.htm. [citado 21 mayo 2019].
21. The Perkin-Elmer Corporation. Métodos Analíticos para espectrofotometría de absorción atómica. 1996. p 160.
22. R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/)
23. Solberg, H.E. Approved Recommendation on the Theory of Reference Values Part 5. Statical Treatment of Collected Reference Values Determination of Reference Limits. J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 1987; 25:645-656.
24. NCCLS. How to define and determine intervals in the clinical. 2nd ed. NCCLS document C28A2, 2000
25. Fuentes Arderiu (Estimación, adopción y validación de intervalos de referencia (ifcc.org)),
26. Queraltóhttps://www.seqc.es/download/revista/736/1744/1058239757/1024/cms/Qumica Clnica 1983;2 (1) 43-55.pdf/
27. Gibson R, Smit-Vanderkooy P, McDonald A, Goldman A, Ryan B, Berry M. A growth-limiting, mild zinc-deficiency, syndrome in some Southern Ontario boys with low height percentiles. Am J Clin Nutr. 1989;49:1266-1273. doi: 10.1093/ajcn/49.6.1266.
28. Cordano A. Clinical manifestations of nutritional copper deficiency in infants and children. Am J Clin Nutr. 1998;67(Suppl):1012S-1016S. doi: 10.1093/ajcn/67.5.1012S.
29. Carpentieri V, Myers J, Thorpe L, Daeschner CW, Haggard ME. Copper, zinc and iron in normal and leukemic lymphocytes from children. Cancer Res. 1986;46: 981-984.
30. Lockitch G, Halstead A, Wadsworth L, Quigley G, Reston L, Jacobson B. Age- and sex-specific pediatric reference intervals and correlations for zinc, copper, selenium, iron, vitamin A and E, and related proteins. Clin Chem. 1988;34(8):1625-1628.
31. Feliu M, Piñeiro M, López C, Slobodianik N. Valores de referencia de cobre, zinc y selenio en niños. Acta Bioquím Clín Latinoam. 2005;39(4):459-462.
32. Silva T, Alarcón O, Alarcón A, Ramírez M, D´Jesús I, Mejía A. Niveles séricos de Zinc (Zn), hierro (Fe) y cobre (Cu) de preescolares que acuden a consulta en los ambulatorios urbanos tipo III de la ciudad de Mérida. MedULA. 2005;12(1-4):18-25.
33. Dörner K. Zinc in serum: report 1. En: Meites S, editor. Pediatric clinical chemistry: Reference (normal) values. Washington, DC: AACC Press, 1989, p.296
34. Dörner K, Copper S. En: Meites S, editor: Pediatric clinical chemistry: Reference (normal) values. 3rd. ed. Washington, DC: AACC Press, 1989, p.101.
35. Brunetto M, Alarcón O, Dávila E, Gallignani M, Rondón C, Burguera JL, *et al*. Serum trace elements and fat-soluble vitamins A and E in healthy pre-school children from a Venezuelan rural community. J Trace Elements Med Biol. 1999;13: 40-50.
36. Voirin J, Leroy F, Guincestre-Ybureau F *et al*. Vitamin and trace elements states in children with progressive muscular dystrophy. Trace Elem Med. 1989;6:165-168.
37. Fernández D, Vásquez A, Villasmil J, Ocando A , Manzanilla J, Pereira N, *et al*. Metodologías analíticas para la determinación de Cu y Zn en suero sanguíneo de niños zulianos con deficiencias nutricionales por ETA-AAS. Ciencia.2012;20(4):244-253.
38. Castillo-Durán C, Uauy R. Copper deficiency impairs growth of infants recovering from malnutrition. Am J Clin Nutr. 1988;47:710-714
39. Subotzky E, Heese H, Sive A, Dempster W, Sacks R, Malan H. Plasma zinc, copper, selenium, ferritin and whole blood manganese concentrations in children with kwashiorkor in the acute stage and during refeeding. Ann Trop Paediatr. 1992;12:13-22.
40. Prasad A. Zinc in human health: an update. J Trace Elem Exp Med. 1998;11:63-87.

QUERATITIS ASOCIADA A LENTES DE CONTACTO POR *NIGROSPORA* SP

Moreno Xiomara[1], Macero Carolina[1], Silva Derys[2].

[1]Departamento de Microbiología. Instituto Médico La Floresta. Caracas, Venezuela.
[2]Laboratorio de análisis clínicos Unilabs. Madrid, España.
Recibido para publicación el 30 octubre 2019. Aprobado para publicación el 15 noviembre 2019.

RESUMEN:
Se presenta un caso de queratitis causada por *Nigrospora* sp., en una persona de la comunidad de la Gran Caracas-Venezuela, usuaria de lentes de contacto de 43 años de edad. Se recibió en el laboratorio de microbiología muestra de secreción corneal sembrada en agar sabouraud dextrosa con gentamicina y lente de contacto izquierdo a quien se le realizó examen directo con KOH al 20 % observándose la presencia de hifas septadas conduciendo a un diagnóstico rápido de queratitis fúngica y confirmación por cultivo de *Nigrospora* sp. Se instauró una precoz terapia antifúngica tópica con una única dosis intraestromal de voriconazol al 1 %, natamicina al 5 % y gotas de voriconazol al 1 %. Es de importancia la confirmación diagnóstica precisa en el manejo de queratitis por hongos para evitar el uso innecesario de antimicrobianos y de afecciones que requieren de procedimientos quirúrgicos.

Palabras claves: *Nigrospora* sp., cultivo, KOH al 20 %, voriconazol, natamicina.

CONTACT LENS ASSOCIATED KERATITIS DUE TO *NIGROSPORA* SP

SUMMARY
A case of keratitis caused by *Nigrospora* sp. Is presented, in a person from the community of Greater Caracas-Venezuela, a 43-year-old user of contact lenses. A sample of corneal secretion planted on sabouraud dextrose agar with gentamicin and a left contact lens was received in the microbiology laboratory, who underwent direct examination with 20% KOH, observing the presence of septate hyphae, leading to a rapid diagnosis of fungal keratitis and confirmation. by cultivation of *Nigrospora* sp. Early topical antifungal therapy was established with a single intrastromal dose of voriconazole 1 %, natamycin 5 %, and voriconazole drops 1 %. Accurate diagnostic confirmation is important for the management of fungal keratitis to avoid unnecessary use of antimicrobials and conditions that require surgical procedures.

Key words: *Nigrospora* sp., Culture, 20% KOH, voriconazole, natamycin.

Introducción

Las principales causas de queratitis infecciosa varían según la región geográfica, el nivel socio económico, la presencia de factores de riesgo, historia de traumatismo ocular, comorbilidades, la edad del paciente y en menor grado el uso de lentes de contacto (1). La incidencia anual de queratitis fúngica en el Reino Unido y Dinamarca se presenta en 0,32 y 0,6 millones de personas respectivamente. En los Estados Unidos en zonas húmedas hacia el sur un 35 % de queratitis infecciosas son causadas por hongos, mientras que en zonas templadas las infecciones fúngicas oscilan entre el 1 % y 8 % (2). Un estudio realizado en India describe que el 90% de las úlceras micóticas fueron por trauma ocular, y el 60 % de las mismas corresponden a lesiones de origen vegetal, donde una cuarta parte de estos pacientes ejercían labores agrícolas (3). Existen más de 100 especies de hongos diferentes documentados como causantes de queratitis micótica. En general, *Fusarium* y *Aspergillus* son los agentes etiológicos más comúnmente aislados en pacientes con queratitis micótica en los trópicos de cada región donde se aísle este tipo de hongos, mientras que *Candida albicans* es aislada en regiones templadas (3-6). Estudios en Venezuela realizados por Delgado y col., Bermúdez y col., encontraron que las ulceras micóticas predominaban en un 36,66 % y 42,45 % respectivamente; y los agentes mayormente involucrados fueron los géneros *Fusarium* y *Aspergillus* (7,8). La mayoría de estudios alusivos sobre queratomicosis describen el traumatismo como un factor de riesgo para la adquisición de esta afección

Solicitar copia a: Xiomara Moreno Calderón (e-mail: x.morenoc@hotmail.com)

y puede oscilar entre 35 % y un 71 % (2). Uno de los factores de riesgo relacionados a traumatismo que se ha incrementado en las últimas dos décadas a nivel mundial ha sido el uso de lentes de contacto, asociándose a un aumento de los reportes de queratitis micótica (5), en Venezuela se desconoce el porcentaje de este factor de riesgo por lo que se presenta este caso clínico donde el uso de lentes de contacto se asoció a una queratitis de origen micótica causada por *Nigrospora* sp., la cual fue identificada fenotípicamente, a la vez que es un hongo poco común reportado en la literatura consultada como causante de queratomicosis.

Caso clínico

Se recibe el 15 de abril del 2018 en el laboratorio de microbiología del Instituto Médico la Floresta Caracas-Venezuela, muestra de secreción corneal sembrada en agar sabouraud con gentamicina y lente de contacto del ojo izquierdo de paciente masculino de 43 años de edad, de ocupación administrador, inmunocompetente, sin patología ocular previa personal ni familiar, procedente de la localidad (Gran Caracas). Las muestras (secreción corneal y lente de contacto izquierdo) es remitida de un centro oftalmológico de la ciudad capital, Caracas-Venezuela. El paciente acude a la consulta oftalmológica por presentar disminución de la visión, prurito, enrojecimiento y dolor ocular de 5 días de evolución. Al examen ocular, el paciente presentó una úlcera de córnea supurativa la cual estaba congestionada y edematizada con un borde irregular y plumoso por lo que sospecharon de queratitis micótica, solicitando cultivo micológico y bacteriológico para descartar bacterias coinfectantes. Mientras tanto, se instauró tratamiento empírico tópico en gotas con tobramicina al 0,3 % más dexametasona al 0,1 %.

El lente de contacto fue troceado en porciones pequeñas con bisturí estéril en campana de flujo laminar, se realizó examen directo con KOH al 20 % (40X) observándose hifas delgadas y tabicadas ligeramente demateáceas (Figura 1). Las porciones restantes fueron sembradas en agar Sabouraud dextrosa (Oxoid-USA) con gentamicina, agar Mycosel (Oxoid-USA) y agar papa (Oxoid-USA) e incubadas a 28 °C junto con la placa de agar sabouraud más gentamicina que venía ya sembrada con la muestra de la secreción corneal realizada por el médico oftalmólogo; para observarse semanalmente por 30 días. El cultivo bacteriano fue sembrado en agar Sangre (Oxoid-USA), agar GC

Figura 1. Examen directo de una porción del lente de contacto con KOH al 20 % (40X) donde se observan hifas ramificadas y tabicadas dematiáceas.

(suplementado con vitox-Oxoid-USA) incubados a 35 °C en atmósfera de CO_2 al 5 % y agar Cled (Oxoid-USA) incubado a 35 ° C sin atmósfera de CO_2 por 5 días.

Una vez emitido el reporte inicial del examen directo del lente de contacto, al paciente le fue administrada una única inyección intraestromal de voriconazol al 1 %, natamicina al 5 % en gotas cada 2 horas y voriconazol cada dos horas en gotas preparadas al 1 %, en combinación con tobramicina al 0,3 % en gotas más dexametasona al 0,1 % cada 4 horas por 4 días. Al quinto día fueron espaciadas a cada 6 horas las gotas de voriconazol al 1 % y natamicina al 5 % y se mantuvo la tobramicina al 0,3 % más dexametasona al 0,1 % cada 8 horas para evitar coinfección bacteriana y disminuir la inflamación manteniendo el tratamiento por 2 semanas más.

Al cabo de 7 días hubo crecimiento en la totalidad de la placa de agar sabouraud y agar papa de la muestra del lente y en la placa de sabouraud más gentamicina de la secreción corneal tomada por el médico oftalmólogo, de colonia de color blanco con variantes a café oscuro de aspecto afelpado en el anverso y color gris oscuro a negro en el reverso (Figura 2). Se hizo examen directo de las colonias crecidas en agar sabouraud con azul de Cotton de ambas muestras donde se visualizó (en 40 X) una célula conidiógena en solitario (espora unicelular y asexual) ligeramente esférica,

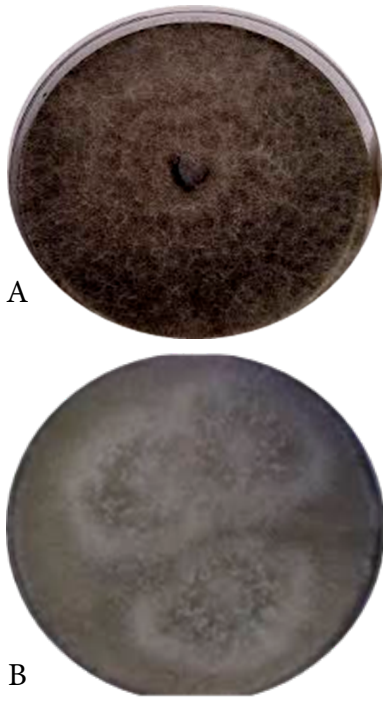


Figura 2. Crecimiento en agar Sabouraud + Gentamicina de las colonias de *Nigrospora* sp., a los 7 días de incubación. A: colonia de color blanco con variantes a café oscuro de aspecto afelpado en el anverso de la placa. B: color gris oscuro de la colonia en el reverso de la placa.

aplanada horizontalmente en su ápice de color negro sobre un conidióforo ligeramente abultado e hifas demateáceas ramificadas y tabicadas, características compatibles del género *Nigrospora* (Figura 3). No hubo crecimiento bacteriano en el cultivo realizado a los 5 días de incubación. A partir del agar papa se realizaron las pruebas de susceptibilidad por el método Etest de acuerdo a las especificaciones del fabricante (9), tomando en cuenta la metodología descrita por el Comité de estándares de laboratorio clínico (CLSI, por sus siglas en inglés) y de estudios de susceptibilidad para hongos filamentosos (10,11). Los antifúngicos utilizados por Etest fueron anfotericina B (AB), voriconazol (VO) y posaconazol (POZ). La lectura de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) por Etest fueron la concentración más baja del fármaco que generó una elipse de inhibición en el crecimiento del hongo, obteniéndose CMI de 1 ug/mL para AB, 0,5 ug/mL para VO y 0,125 ug/mL para POZ a las 48 h de incubación a 35 °C.

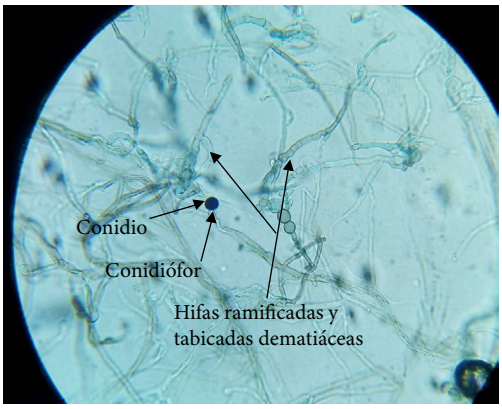


Figura 3. Examen directo de la colonia con azul de Cotton (40 X) donde se observa un conidio solitario esférico de color negro sobre un conidióforo ligeramente abultado e hifas ramificadas y tabicadas dematiáceas compatibles con *Nigrospora* sp.

Al cabo de las 2 semanas de tratamiento, se observó una cicatriz gruesa y estable con adelgazamiento de la córnea por lo que se le realizó una debridación en el área mejorando su agudeza visual, no se observó perforación ocular, así como la desaparición del prurito, dolor y enrojecimiento, información suministrada por el médico oftalmólogo tratante ya que no fue tomada otra muestra para verificar la ausencia del hongo. La terapia fue continuada por 2 semanas más, retirando el antimicrobiano (tobramicina al 0,3 %). La terapia antifúngica fue descontinuada después de haber cumplido con estas semanas de tratamiento con la mejoría plena del paciente.

Discusión

El nombre de *Nigrospora* fue introducido por primera vez por Zimmerman en 1902. *Nigrospora* es un género fúngico importante de los ascomicetos, con una distribución cosmopolita y una amplia diversidad de hospedadores. Especies de *Nigrospora* se han aislado como endófitos de hojas y tallos de varias plantas, o como saprobios de detritus de larvas muertas y hojarascas. Es un patógeno vegetal frecuente que afecta a cereales y frutas (6,12). Sin embargo, su papel patógeno en humanos como agente causal de infecciones fúngicas no es bien conocido. Algunas esporas de *Nigrospora* son responsables de alergia con hipersensibilidad tipo I, rinitis estacional (fiebre del heno), asma o enfermedades respiratorias alérgicas (12); así como también ha sido aislada como parte de la

microbiota conjuntival. Williamson *et al*., encontraron en 553 individuos con conjuntiva ocular clínicamente sana 32 aislados de hongos filamentosos y 1 de ellos era *Nigrospora* sp. (13); mientras que Segal *et al*., en un grupo de 88 individuos clínicamente sanos a nivel de la conjuntiva ocular en un área cerrada, encontraron 34 aislados de diferentes especies de hongos filamentosos que incluía un aislamiento de *Nigrospora* sp. (14). La mayoría de los aislados en estos dos estudios evaluaban la microbiota normal de la conjuntiva encontrándose en mayor proporción aislados de *Alternaria, Aspergillus* y *Penicillium* que implican mohos con esporas aerotransportadas (13,14). Debe suponerse la posibilidad de que estos hongos tuvieran solo una existencia transitoria en el ojo, también se debe considerar su papel como posibles patógenos en condiciones traumáticas para el ojo como el caso clínico que se está presentando donde saprófitos conjuntivales como *Nigrospora* podrían asumir un papel patógeno en una infección "oportunista" mediada por el lente de contacto. Actualmente, hay aproximadamente 27 especies reconocidas incluidas en el MycoBank y de acuerdo a la nueva nomenclatura taxonómica, *Nigrospora* es clasificada en la Division: *Ascomycota*; Orden: *Sordariales*; Familia: *Apiosporaceae*; Genero: *Nigrospora*. El estado teleomórfico o sexual de *Nigrospora* recibe el nombre de *KhusKia*, otro género monofilético de la división *Ascomyceta* (15, 16). Especies como *N. oryzae* y *N. sphaerica* son las más frecuentemente encontradas, siendo la primera un problema importante en la agricultura y la segunda se ha informado como patógeno asociado a traumas en infecciones de paciente inmunocompetentes (15) como es el caso clínico que se presenta, dónde el paciente adquiere la queratitis fúngica por trauma a causa del uso de lentes de contacto, el cual es un método cada vez más popular para corregir la visión, y como consecuencia un factor para adquirir queratitis microbiana (17). En el presente caso clínico no fue posible la identificación molecular para definir la especie, solo se utilizaron características fenotípicas morfológicas descritas en el Atlas de hongos clínicos compatibles con el género *Nigrospora* (16).

Estudios estiman que la incidencia de infecciones fúngicas relacionadas con el cristalino es inferior al 5% en Estados Unidos y el mundo (12). Especies de *Fusarium*, están catalogados como los principales hongos filamentosos causantes de queratitis micótica relacionados con lentes de contacto seguidos por especies de *Aspergillus, Penicillium, Paecilomyces, Scedosporium apiospermun, Curvularia, Cladosporium, Alternaria, Bipolaris y Candida* con una incidencia del 6 % al 30% (1, 2, 5, 17, 18). Como se ha descrito anteriormente el trauma ocular es el factor de predisposición más importante en la queratitis micótica que oscila entre un 40 % - 60 %; estos hongos no penetran en un epitelio intacto y la invasión es secundario a trauma (5,17). Un informe del Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), a través de un estudio hecho por un grupo de investigadores externos examinó las conductas de riesgo en infecciones oculares relacionadas con lentes de contacto, encontrando que 99 % de los usuarios presentaron más de un factor de riesgo, el 50 % informó haber dormido durante la noche con lentes, un 87 % durmió varias veces con lentes, un 50 % pospuso el reemplazo recomendado de lentes, un 85 % se duchaba con lentes y un 61 % nadaba con ellos (19). De acuerdo a estos acontecimientos el CDC propuso las siguientes pautas para reducir el riesgo de complicaciones relacionadas con el uso de los lentes de contacto: 1. No dormir nunca con lentes de contacto, 2. Evitar ducharse y nadar con los lentes de contacto, 3. Reemplazar el o los lentes de contacto según lo recomendado por el proveedor oftalmológico, 4. Reemplazar el estuche de las lentes de contacto al menos una vez cada 3 meses, 5. Quitarse los lentes de contacto inmediatamente si experimenta dolor de ojos, enrojecimiento o visión borrosa y llamar o acudir al proveedor de atención oftalmológica (19). El paciente del presente caso clínico incluía conductas de dormir algunas veces con los lentes, situación que pudo facilitar la penetración del hongo a la córnea, ya que este microorganismo puede estar de manera transitoria en la conjuntiva ocular.

La queratitis micótica tiene ciertas características especiales que pueden ayudar a diferenciarla de la queratitis bacteriana como bordes plumosos, un hipopión fijo, anillos inmunes, placas endoteliales y un absceso corneal posterior (20) de las cuales los bordes plumosos estaban presentes en el paciente en estudio permitiendo la orientación por una infección fúngica.

El tratamiento de las queratitis micóticas es un problema en la actualidad. Aún no se han establecido pruebas de susceptibilidad con puntos de corte para el tratamiento de este tipo de hongo, pero tomando en cuenta las recomendaciones para otros tipos de hongos filamentosos que ya cuentan con puntos de corte epidemiológicos establecidos, las

CMI obtenidas en el presente caso sirvieron para observar el comportamiento de este hongo micelial frente a los antifúngicos ensayados. El tratamiento de primera línea para la queratitis fúngica incluye agentes antimicóticos tópicos triazólicos como VO y poliénicos que incluyen natamicina y AB (2, 21). La CMI obtenida de AB referenció una extrapolación a natamicina, ya que estos dos antifungicos pertenecen al grupo de los polienos, y anfotericina B no tiene presentación tópica. Diferentes ensayos de tratamiento encontraron que la natamicina es más efectiva contra hongos filamentosos como *Fusarium* y *Aspergillus*, y se utiliza a menudo como antifúngico de primera línea para el tratamiento de estos agentes micóticos (5), y en el presente caso clínico fue efectivo al combinarla con 1 inyección intraestromal de VO al 1%, el cual es típicamente utilizado como tratamiento de segunda línea contra hongos filamentosos y especies de *Candida* en combinación con AB (21). Aunque la natamicina se usa ampliamente como terapia de primera línea para queratitis fúngica filamentosa, el fracaso como tratamiento primario se ha informado en el 31,3 % en un estudio de 115 pacientes, por lo que se recomienda utilizarla en combinación con otros antimicóticos (21), tal como fue utilizada en el presente caso clínico.

Una revisión reciente evaluó diferentes agentes antifúngicos en el tratamiento de la queratitis micótica y sugirió que la natamicina puede reducir el riesgo de perforación de la córnea en comparación con VO; e inyecciones intraestromales de VO han sido capaces de resolver casos de queratitis micótica recalcitrantes (17). Una serie de casos examinó el uso de VO intraestromal (50 mg / 0,1 ml) para casos de queratitis que no responden al tratamiento tópico, encontrando que este tratamiento ayudó a resolver el 73 % de los casos estudiados (22). Otras investigaciones concluyeron que el VO (generalmente preparado a partir de la formulación sistémica al 1 % de concentración en gotas) es bien tolerado por el ojo; sin embargo, sugieren realizar estudios adicionales necesario para determinar de manera concluyente su eficacia como primera línea y tratamiento único con preparación a concentraciones superiores y frecuencia de dosificación óptima en la queratitis micótica (21). En el presente caso clínico la aplicación en gotas al 1 % en combinación con los demás antimicóticos utilizados conllevó a una resolución de la queratitis causada por *Nigrospora* sp.

A nivel mundial se han reportado varios casos de queratomicosis por *Nigrospora* spp. relacionados con traumatismos diferentes a lentes de contacto, provenientes por el tropiezo accidental con insectos, animales, plantas, así como keratittis supurativas (6, 23, 24). De acuerdo a los buscadores de literatura científica y técnica en salud de América Latina y el Caribe (LILACS, https://lilacs.bvsalud.org/es/), índice Scielo (*Scientific Electronic Library Online*, www.scielo.org/es), no fueron hallados casos de queratomicosis mediadas por lentes de contacto relacionadas con *Nigrospora* sp. Un estudio venezolano no publicado realizado en el Hospital Clínico Universitario de Caracas sobre la Frecuencia de ulceras corneales de etiología fúngica, no fue aislado el género *Nigrospora* (25), por lo que este caso pudiera ser el primer informe venezolano y latinoamericano reportado en la literatura de queratomicosis, asociado a traumatismo por lentes de contacto causado por *Nigrospora* sp.

La queratitis fúngica se presenta con peor pronóstico visual que la queratitis bacteriana. La rareza de esta patología, la falta de terapias efectivas disponibles, y la rapidez del diagnóstico generan un gran desafío para el clínico basado en evidencia y con recomendaciones claras para un mejor tratamiento de esta afección.

Referencias

1. Gopinathan U, Sharma S, Garg P, Rao GN. Review of epidemiological features, microbiological diagnosis and treatment outcome of microbial keratitis: experience of over a decade. Indian J Ophthalmol 2009;57(4):273-279. https://doi:10.4103/0301-4738.53051.
2. Buitrago MF, Vives JE, Fernández AS, Manrique FS, Carrillo D. Generalidades de Queratitis Micótica. Rev Univ Ind Santander Salud 2013;45(3):55-69. [citado mayo 2019] Disponible en: https://www.redalyc.org/pdf/3438/343833961006.pdf
3. Srinivasan M. Fungal keratitis. Curr Opin Ophthalmol 2004;15:321-327. https://doi:10.1097/00055735-200408000-00008
4. Leck, A. K., Thomas, P. A., Hagan, M., Kaliamurthy, J., Ackuaku, E., John, M., *et al.* Aetiology of suppurative corneal ulcers in Ghana and South India and epidemiology of fungal keratitis. Br J Ophthalmol 2002;86:1211-1215. https://doi:10.1136/bjo.86.11.1211
5. Thomas PA, Kaliamurthy J. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. Clin Microbiol Infect 2013;19:210–220. http://doi:10.1111/1469-0691.12126
6. Ananya TS, Kindo AJ, Subramanian A, Suresh K. *Nigrospora* sphaerica causing corneal ulcer in an

immunocompetent woman: A case report. Int J Case Rep Images 2014;(10):675–679. https://doi:10.5348/ijcri-2014119-CR-10430

7. Bermúdez A, Gurdez de Guillén E, Chocron I, Ortega E y Nieto T; Ulceras Corneales Micoticas. An Inst Barraquer 1998;27:471-477.
8. Delgado Y, Simone C, Buling R, Cultivo y frotis en las ulceras corneales. Boletín del Instituto Nacional de Investigaciones Oftalmológicas I.N.D.I.O. 1989;(8)77-86.
9. AB BIODISK E- Test technical guide 4b: antifungal susceptibility testing of molds. Suiza ABBIODISK. com; 2007.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. 3rd.ed. CLSI standard M38. Wayne, PA2017.
11. Espinel-Ingroff A, Resusta A. E-Test Method Susceptibilities os Aspergillus spp. To the New Triazoles Voriconazole and Posaconazole and to Established Antigungal Agents: Comparison with NCCLS Broth Microdilition Method. J Clin Microbiol 2002;40(6):2101-2107. https://doi:10.1128/JCM.40.6.2101-2107.2002
12. Wang M, Liu F, Crous PW, Cai L. Phylogenetic reassessment of *Nigrospora*: Ubiquitous endophytes, plant and human pathogens. Persoonia 2017;39:118-142. https://doi:10.3767/persoonia.2017.39.06
13. Williamson, J., A. M. Gordon, R. Wood, A.Dyer & 0. A. Yahya: Fungal flora of the conjunctival sac in health and disease. Brit J Ophthal 1968;52:127-137.
14. Segal E., Roman A, Eylan E, Stein R. Fungal flora of the normal conjunctival sac. Mykosen 1977;20(1):9-14 https://doi:10.1111/j.1439-0507.1977.tb01475.x.
15. Wang M, Liu F, Crous PW, Cai L. Phylogenetic reassessment of *Nigrospora*: Ubiquitous endophytes, plant and human pathogens. Persoonia 2017;39:118-142. https://doi:10.3767/persoonia.2017.39.06
16. Hoog GS, Guarro J, Gené J, Ahmed S, Al-Hatmi AMS, Figueras MJ, *et al.* Atlas of Clinical Fungi, 3rd e-edition. Utrecht / Reus. [Internet]. 2019 [citado 2019 abril 20]. http://www.clinicalfungi.org/images/SamplePages.pdf
17. Cheung N, Nagra P, Hammersmith K. Emerging trends in contact lens-related infections. Curr Opin Ophthalmol 2016;27(4):327-332. https://doi:10.1097/ICU.0000000000000280
18. Nielsen SE, Nielsen E, Julian HO, Lindegaard J, Højgaard K, Ivarsen A, *et al.* Incidence and clinical characteristics of fungal keratitis in a Danish population from 2000 to 2013. Acta Ophthalmol 2015;93:54–58. https://doi:10.1111/aos.12440
19. Cope JR, Collier SA, Rao MM, Chalmers R, Mitchell GL, Richdale K, *et al.* Contact Lens Wearer Demographics and Risk Behaviors for Contact Lens-Related Eye Infections-United States, 2014. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2015;64(32):865-870. https://doi:10.15585/mmwr.mm6432a2.
20. Manisha A, Hussain FJ, Shikha J, Umang M. Pearls and paradigms in Infective Keratitis. Romanian J Ophthalmol 2019;63(2):119-127. https://doi:10.22336/rjo.2019.18
21. Kalaiselvi G, Narayana S, Krishnan T, Sengupta S. Intrastromal voriconazole for deep recalcitrant fungal keratitis: a case series. Br J Ophthalmol. 2015;99(2):195-198. https://doi:10.1136/bjophthalmol-2014-305412.
22. Hariprasad SM, Mieler WF, Lin TK, Sponsel WE, Graybill JR. Voriconazole in the treatment of fungal eye infections: a review of current literature. Br J Ophthalmol 2008;92(7):871-878. https://doi:10.1136/bjo.2007.136515
23. Muralidhar S, Sulthana M. *Nigrospora* causing corneal ulcer--a case report. Indian J Pathol Microbiol 1997;40:549-551. https://www.ijpmonline.org/article.asp?issn=0377-4929;year=1997;volume=40;issue=4;spage=549;epage=51;aulast=Muralidhar;type=0
24. Paul B, Girija Devi PS. Microbial profile of suppurative keratitis a prospective study. J Acad Clin Microbiol 2014;16:8-10. https://www.jacmjournal.org/text.asp?2014/16/1/8/134455
25. Domínguez Nancy. Frecuencia de ulceras corneales de etiología fúngica en el Hospital Universitario de Caracas 2008-2012. Trabajo especial de postgrado-2012. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Caracas, Venezuela.

ESPECTROMETRÍA DE MASAS/MALDI-TOF Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA: TÉCNICAS COMPLEMENTARIAS EN LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMOLÉCULAS

Aura Palencia M[1], Gabriela Romero B[1].

[1]Unidad de Investigación en Toxicología Molecular, Módulo 5, Escuela de Bioanálisis,
Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo, Venezuela. C.P. 2005
Recibido para publicación el 15 julio 2019. Aprobado para publicación el 14 agosto 2019.

RESUMEN:
La introducción de la espectrometría de masas MALDI-TOF (una técnica basada en principios físicos-químicos destinada originalmente a otras aplicaciones) en el diagnóstico clínico, puede aumentar o complementar la eficiencia de diversas técnicas. Actualmente, esta técnica se ha convertido en una alternativa no solo para el diagnóstico temprano de enfermedades infecciosas sino también para estudios epidemiológicos que favorecen nuevas estrategias de prevención y control, sin desplazar a la biología molecular, más bien complementándola. En este artículo se revisan diferentes estudios que evaluan la concordancia en la identificacion de bacterias, virus, hongos y parásitos por MALDI-TOF MS, PCR y técnicas microbiológicas convencionales evidenciandose la eficacia, confiabilidad y excelente desempeño de la espectrometría de masas incluso en cuanto a costo y tiempo.

Palabras claves: Espectrometría de masas, biología molecular, proteómica, huella peptídica.

MASS SPECTROMETRY / MALDI-TOF AND POLYMERASE CHAIN REACTION: COMPLEMENTARY TECHNIQUES IN THE IDENTIFICATION OF BIOMOLECULES

SUMMARY
Introduction of MALDI-TOF mass spectrometry (a technique based on physical-chemical principles originally intended for other applications) in clinical diagnosis can increase or complement the efficiency of various techniques. Currently, this technique has become an alternative not only for early diagnosis of infectious diseases but also for epidemiological studies that favor new prevention and control strategies, without displacing molecular biology, rather complementing it. This article reviews different studies that evaluate concordance between identification of bacteria, viruses, fungi and parasites by MALDI-TOF MS, PCR and conventional microbiological techniques, demonstrating efficacy, reliability and excellent performance of mass spectrometry even in terms of cost and time.

Key words: Mass spectrometry, molecular biology, proteomics, peptide fingerprint.

Introducción

En la actualidad, la investigación basada en biología molecular ofrece un inmenso campo de posibilidades para un mejor entendimiento de los fenómenos biológicos que nos rodean, valiéndose de técnicas cuyo fundamento es aislar ácidos nucleicos o extraerlos con alta pureza, visualizarlos, cortarlos, pegarlos, amplificar una región en una enorme cantidad de moléculas, cortar una determinada región con enzimas de restricción para determinar si por una mutación se gana o se pierde un sitio de restricción, entre otras múltiples variantes (1). Dichas técnicas poseen diversas aplicaciones, generalmente en el diagnóstico de enfermedades hereditarias, búsqueda de alelos o marcadores moleculares asociados a características de interés (2), detección y determinación de especies, genotipo y/o cepa de agentes patógenos humanos, entre otras (3). Las implicaciones que tiene este nuevo conocimiento abarcan campos tan diversos como la medicina, la conservación medio ambiental y la industrial (4,5).

La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es el ejemplo clásico de los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, considerada hoy como una herramienta imprescindible en el laboratorio de biología molecular e ingeniería genética (6). Esta técnica está basada en el uso de cebadores y una enzima, ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa), que permite amplificar el segmento señalado por los cebadores (oligonucleótidos). Es un proceso cíclico de

Solicitar copia a: Aura Palencia (adpalencia@uc.edu.ve)

aproximadamente unas 40 repeticiones de tres pasos que suceden a diferentes temperaturas: desnaturalización, alineamiento o fijación de los cebadores y extensión. Esta progresión es controlada en el tiempo y por los cambios de temperatura (7).

Se han desarrollado variantes de la PCR que amplían su versatilidad dentro de las que se encuentran: PCR múltiple, RT-PCR, PCR anidada, PCR de extensión solapada (mutagénesis), PCR *in situ*, amplificación mediante activación progresiva de la polimerasa, amplificación con rampa decreciente de temperaturas, amplificación asimétrica, amplificación cuantitativa (PCR en tiempo real), amplificación en chips. Hoy existen sistemas capaces de realizar ambas funciones, tanto la RT como la polimerización del ADN, y entonces el proceso se denomina RT-PCR (6). Después de la amplificación el producto de la PCR puede ser detectado por medios, como la electroforesis en gel de agarosa o la electroforesis capilar (5,7).

En este contexto, aun cuando es indiscutible el papel de la PCR para la investigación de diversos organismos de interés clínico, el surgimiento de técnicas basadas en principios físicos-químicos o destinados originalmente a otras aplicaciones pueden aumentar o complementar la eficiencia de dichas técnicas en el diagnóstico clínico. En este sentido, la espectrometría de masas de desorción/ionización láser (MALDI-TOF SM) por sus siglas en inglés, es capaz de analizar cualitativa y cuantitativamente mezclas complejas de diversas sustancias. Asimismo, esta técnica también permite determinar la masa molecular de un compuesto y la de los diversos fragmentos que resultan de la rotura del mismo, proporcionando información sobre la estructura del compuesto inicial (8).

El análisis de perfiles de proteínas mediante MALDI-TOF SM, ha permitido en el campo de la proteómica comparar los espectros de masas obtenidos por dicha técnica con una base de datos biológica de proteínas (9) cuya secuencia se conoce o bien de información genómica, esto es, mediante un enfoque *in silico*. Para esto, se emplean herramientas de software capaces de traducir las secuencias nucleotídicas del genoma, depositadas en la base de datos, a secuencias de aminoácidos (esto es, los componentes de las proteínas); luego, se corta teóricamente la secuencia de la cadena polipeptídica y se calculan las masas absolutas de los péptidos obtenidos (10). Dicha comparación entre huella de tamaños de péptidos obtenida con las depositadas en la base de datos permite asociar estadísticamente la proteína desconocida con la más semejante de la base de datos (asociación que puede ser de identidad) (11). Específicamente, la huella peptídica es única para cada microorganismo, lo que permite identificarlo (12).

Desde hace treinta años, la espectrometría de masas se ha utilizado como una herramienta poderosa para el análisis y la caracterización de proteínas. Sin embargo, es sólo recientemente que esta tecnología, especialmente MALDI-TOF MS, ha entrado en el campo de la microbiología clínica habitual (11,13), permitiendo un diagnóstico más fácil y rápido de patógenos humanos que a través de los métodos de identificación molecular y fenotípica convencional, con una fiabilidad incuestionable y una relación coste-eficacia favorable. Actualmente, se ha convertido en una alternativa no solo para el diagnóstico temprano de enfermedades infecciosas sino también para estudios epidemiológico que favorecen nuevas estrategias de prevención y control, sin desplazar la biología molecular, más bien complementándola (14). Aunado a esto, MALDI-TOF SM se está desarrollando como alternativa a la electroforesis en gel para visualizar fragmentos de ADN generados de forma análoga al procedimiento seguido en el método de secuenciación Sanger y que pueden ser diferenciados en función de su masa, de manera que los polimorfismos de un solo nucleótido pueden ser detectados por la diferente masa de los distintos nucleótidos que formen la secuencia de ADN en cada caso (15).

Con base en lo anteriormente expuesto, a continuación, se presenta una revisión sobre la aplicación de MALDI-TOF SM en la identificación de microorganismos, bien sea caracterizados a través de técnicas moleculares o métodos convencionales.

Espectrometría de masas de desorción/ionización láser (MALDI-TOF SM)

La espectrometría de masas (EM) es una técnica microanalítica usada para identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de las moléculas. Requiere cantidades pequeñas de muestra y obtiene información característica como el peso y algunas veces la estructura del analito. En la EM la muestra es ionizada (y por tanto destruida) usando diversos procedimientos para ello. De todos ellos el más usual y/o utilizado es la técnica denominada de

Impacto Electrónico consistente en el bombardeo de la muestra (previamente vaporizada mediante el uso de alto vacío y una fuente de calor) con una corriente de electrones a alta velocidad (11).

Mediante este proceso, la sustancia pierde algunos electrones y se fragmenta dando diferentes iones, radicales y moléculas neutras. Los iones (moléculas o fragmentos cargados) son entonces conducidos mediante un acelerador de iones a un tubo analizador curvado sobre el que existe un fuerte campo magnético y conducidos a un colector/analizador sobre el que se recogen los impactos de dichos iones en función de la relación carga/masa de los mismos. Cada compuesto es único, y cada uno de los compuestos se ionizará y fragmentará de una determinada manera, y en este principio se basa la espectrometría de masas para identificar cada analito (16).

El MALDI-TOF MS utiliza el cálculo de tiempo de migración (tiempo de vuelo) de cada fragmento de una molécula a través de un trayecto predeterminado previa desorción/ionización láser de la molécula en una matriz determinada (17). Este espectrómetro tiene la capacidad de medir macromoléculas de hasta 100.000 Dalton, dentro de las cuales están los péptidos y proteínas que forman parte de microorganismos. Dado que un microorganismo analizado en el MALDI-TOF MS presentará siempre el mismo espectro de masas, los fabricantes de los sistemas MALDI-TOF MS han diseñado archivos con los espectros de masas de la fragmentación de péptidos y proteínas que presentan estos para una misma emisión del láser y una misma distancia de migración. La identificación se realiza a través de la comparación (correlación) del resultado del microrganismo con todos los espectros de masas que contiene el archivo comercial proporcionado por el fabricante, y de acuerdo a puntos de corte definidos para estas correlaciones (18). Estos archivos junto con los programas informáticos necesarios para su manejo permitieron finalmente el uso de esta herramienta en el campo de la microbiología clínica.

MALDI-TOF SM y microbiología

Está claro que la PCR está reemplazando el aislamiento de virus o el cultivo de bacterias para la detección de agentes que son difíciles o imposibles de cultivar. Hay varias razones para esta tendencia, teniendo en cuenta que el aislamiento requiere la presencia de los microorganismos que se replican (virus o bacterias), cultivos celulares costosos y el mantenimiento de las instalaciones, hasta varias semanas para completar el diagnóstico en algunas ocasiones y una pericia especial que se está perdiendo o disminuyendo hoy en muchos laboratorios. Aunque los ensayos de la PCR inicialmente eran caros y engorrosos, hoy en día son herramientas relativamente accesibles, seguras y fáciles de utilizar en los laboratorios de diagnóstico.

Por su parte, MALDI-TOF MS se puede utilizar para la identificación precisa y rápida de diversos microorganismos tales como bacterias Gram–positivas, enterobacterias, levaduras, bacterias no fermentadoras (12), anaerobias (13) y micobacterias (19). La ventaja sorprendente del método de espectro de masas sobre procedimientos fenotípicos y genotípicos es la preparación simple de la muestra encorto tiempo para el análisis (20-22) y existen proyecciones de innovaciones a esta técnica que la harán más versátil ampliando su utilidad diagnóstica en cuanto a matrices (23).

MALDI-TOF MS permite la identificación de microorganismos mediante el análisis de proteínas, principalmente ribosomales (24), a partir de colonias; este análisis conduce a la creación de un espectro de masas que es específico para cada especie (22, 25). La identificación de los microorganismos por MALDI-TOF MS se basa en que las huellas digitales espectrales varían entre los microorganismos, algunos picos son específicos del género, otros de la especie y otros, a veces, de las subespecies (11). No obstante, los datos publicados en relación con ciertos grupos de microorganismos son todavía controvertidos (22).

En general, los sistemas de identificación de MALDI-TOF MS han recibido la aprobación de la FDA (26), existen dos grandes fabricantes que comercializan esta tecnología, una de ellas es Bruker Daltonics, Bremen (Alemania) (27) cuya técnica se describirá a continuación pues en general ilustra el procedimiento. Para la preparación de la muestra se requiere un inoculo tomado a partir de una colonia aislada en cultivo puro, el cual se deposita por duplicado sobre una tarjeta de análisis y se deja secar a temperatura ambiente. Luego, los pocillos son cubiertos con la matriz (solución saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico en 50% acetonitrilo y 2,5% ácido trifluoro-acético. Los parámetros del equipo se ajustan según recomendaciones del fabricante. Para la calibración del espectrómetro se utiliza una prueba estándar consistente en el perfil proteico de una cepa de *Escherichia coli* DH5 péptido alfa, que posee proteínas

adicionales (BTS; Bruker Daltonics). El estándar BTS se utiliza también como control positivo para validar la corrida. Los espectros para cada aislado se obtienen con 240 disparos del láser en seis regiones distintas en el mismo pocillo y dichos espectros son analizados por el software IMALDI Biotyper RTC 3.0. Los espectros son creados considerando el tiempo requerido por las proteínas para llegar al detector lo que depende de la relación masa/carga de éstas. Cada espectro al ser comparado con la base de datos permite la asignación de un puntaje. Los criterios de identificación señalados por el fabricante son los siguientes: puntaje > 2,000 indica identificación a nivel de especie, puntaje entre 1,700-1,999 indica identificación confiable sólo a nivel de género, mientras que valores < 1,700 no permiten identificación (13, 15,20-22).

Cuando se requiere la extracción, se realiza con etanol/ácido, donde 2-3 colonias aisladas se transfirieren con un asa de siembra o punta de la pipeta al tornillo tubo de extracción y se mezclan en 300 µl de agua doblemente destilada. Se añade etanol absoluto (0,9 ml), el contenido del tubo se mezcla con cuidado, y los tubos se centrifugan a 13.000 g durante 2 min; se descarta el sobrenadante y el sedimento se seca al aire. Aproximadamente 10 µl de la pastilla se mezclan con 50µl de ácido fórmico (70%), antes de la adición de un volumen equivalente de acetonitrilo. La mezcla se centrifuga a 13.000 g durante 2 min y 1 µl del sobrenadante se coloca sobre una placa diana MALDI de acero y se deja secar a temperatura ambiente. Posteriormente, cada muestra se cubre con 1 µl de solución de matriz, que consiste en una solución saturada de α-ciano-4 ácido hidroxi-cinámico (HCCA) en 50 por ciento de acetonitrilo y 2,5 por ciento ácido trifluoroacético (concentración final: 10 mg HCCA/ml) y se seca al aire a temperatura ambiente (13, 20, 28).

El uso de esta técnica puede evidenciarse en diferentes estudios, por ejemplo, Bizzini *et al* (2010), compararon a MALDI-TOF MS con el método convencional fenotípico para la identificación de los aislados de rutina. Las colonias se analizaron por MALDI-TOF MS, por deposición directa sobre la placa diana o después de una etapa de extracción de ácido fórmico-acetonitrilo. Entre 1.371 aislados identificados por métodos convencionales, 1.278 (93,2%) fueron identificados a nivel de especie por MALDI-TOF MS y 73 (5,3%) se identificaron a nivel de género, mientras que en 20(1,5%) no hubo identificación fiable. Los autores señalan que se requiere una etapa de extracción para obtener una identificación MALDI-TOF MS válida para el 25,6% de las 1.278 cepas válidas. En conclusión, los resultados de esta investigación muestran que MALDI-TOF MS es una técnica rápida y fiable, que tiene el potencial de reemplazar la identificación fenotípica convencional para la mayoría de las cepas bacterianas aisladas de forma rutinaria en los laboratorios de microbiología clínica (20).

Panda *et al*, en el 2014, identificaron aislamientos bacterianos clínicos mediante perfiles de proteínas utilizando MALDI-TOF MS. Los aislamientos bacterianos recién cultivados fueron seleccionados de placas de cultivo. La identificación se hizo según la técnica de Bruker Daltonik Gmb H, Bremen, Alemania, empleando el software MALDI Biotyper 1.1, para la identificación microbiana. Se llevó a cabo un análisis comparativo de 82 aislamientos bacterianos clínicos usando MALDI-TOF MS y técnicas convencionales. Entre los aislados clínicos, la precisión a nivel de especie para los aislamientos fue de 98,78%. Uno de los 82 aislados no concordaba con los ensayos convencionales dado que MALDI-TOF MS identificó un *Streptococcus pneumoniae* y por métodos convencionales se identificó como *Streptococcus viridans*. MALDI-TOF MS resultó ser un sistema preciso, rápido, rentable y robusto para la identificación de los aislamientos bacterianos clínicos (21).

Por otra parte, en lo que concierne al empleo de métodos moleculares para detectar los mecanismos de resistencia, éstos se desarrollan mediante diferentes estrategias: a) hibridación ADN-ADN con una sonda de ADN marcada con fluorescencia; la metodología consiste en la identificación de una secuencia específica de ADN (gen que codifica a una resistencia) mediante el reconocimiento de la secuencia homóloga en el ADN en varias muestras clínicas o bacterianas; b) amplificación por PCR de un gen específico; esta técnica amplía en forma exponencial un gen específico de interés (p. ej., β-lactamasas); c) polimorfismo de fragmentos largos de restricción (RFLP), que se basa en el análisis del patrón de restricción de los fragmentos de ADN generados por una enzima de restricción que previamente se amplificaron por PCR (6); esta prueba puede detectar mutaciones puntuales en el ADN que alteren el número de sitios de restricción de la enzima empleada; d) secuenciación nucleotídica de ADN, que consiste en la identificación de la secuencia de las cuatro bases que componen el ADN mediante una síntesis de ADN *in vitro* (técnica de Sanger); esta secuencia puede utilizarse para inferir la secuencia de aminoácidos

que componen a la proteína que codifica este ADN e identificar las posibles alteraciones (mutaciones) al compararse con el gen silvestre. En la actualidad se utilizan nucleótidos marcados con fluorescencia que permite una secuenciación de ADN automatizada y de alto rendimiento (29).

Con respecto a la proteómica, se ha utilizado la espectrometría de masa para identificar polimorfismos y genotipificación de diferentes proteínas en una sola muestra (30, 31). En cuanto al área de la bioinformática, se ha desarrollado una gran cantidad de bases de datos con información biomédica y asimismo se han realizado programas computacionales empleados para establecer las vías de evolución de los genes que codifican a las β-lactamasas de distribución mundial (30).

Chan *et al* (2015), proponen un protocolo para la detección de estafilococos resistentes a meticilina y vancomicina, el cual consiste en combinar el poder de discriminación de especies de MALDI-TOF MS y la capacidad de multiplex en PCR de tiempo real con análisis de la curva de fusión (PCR-MCA) en aislamientos clínicos y hemocultivos positivos. En primer lugar, MALDI-TOF MS se utilizó para la detección de aislados clínicos sospechosos o hemocultivos positivos. Si se identificaban especies de *Staphylococcus* o *Enterococcus*, la misma muestra se sometía a PCR-MCA para la detección de genes relacionados de resistencia/citotóxica a antibióticos, incluyendo genes en una reacción triple para mecA, mecALGA251 y leucocidina Panton-Valentine (PVL) de cultivos de estafilococos aislados de doble PCR del gen mecA / mecALGA251 y los genes nuc para cultivos de sangre de estafilococos y los genes vanA y vanB en una reacción de dúplex en enterococos. El tiempo total de ensayo fue <2,5 h. Los resultados revelaron 100% de concordancia con las pruebas de sensibilidad a los antibióticos u otros métodos de referencia para todos los aislados de cultivo y cultivos de sangre de enterococos. El porcentaje de concordancia para estafilococos de hemocultivos fue del 97,5%. Este estudio concluye que el método evaluado fue rápido, económico, fiable y capaz de detectar genotipos mecALGA251, vanB1 y vanB2, que no están incluidos en la mayoría de los ensayos comerciales. Se requiere el cribado a gran escala para probar aún más el rendimiento de este protocolo, sobre todo para los genotipos que se encuentran con poca frecuencia (32).

MALDI-TOF SM y Virus

Tradicionalmente, el método estándar de oro para la detección directa de los virus es el cultivo de células, aunque el uso de este método a menudo requiere varios días o semanas antes de que se puedan obtener los resultados. La microscopía electrónica y los métodos de detección directa de antígenos basado en inmunoensayo enzimático o inmunofluorescencia son ampliamente utilizados para la detección y / o identificación del virus, aunque algunas de estas técnicas son menos sensibles que el cultivo celular. Por último, las técnicas de amplificación génica basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) proporcionan una alternativa rápida y sensible para la detección y/o identificación de virus (33, 34).

La detección y/o identificación de virus tradicionalmente se basan en los métodos basados en el cultivo de células, microscopía electrónica y detección del antígeno o ácido nucleico. Estas técnicas son buenas, pero a menudo costosas y requieren mucho tiempo; Por otra parte, no siempre conducen a la identificación del virus a nivel de especies o del tipo. Calderaro *et al* en el 2014, en Italia estudiaron MALDI-TOF MS para identificar los poliovirus humanos e identificar biomarcadores específicos de la proteína viral en las células infectadas. Los resultados revelaron que dicha técnica es una herramienta eficaz y de bajo costo para la identificación de los tres serotipos de poliovirus. El método se aplicó en primer lugar a cepas de referencia Sabin, y luego a los aislados de diferentes muestras clínicas, y se comparó con el ensayo de neutralización (patrón de oro) (35).

Los poliovirus presentan diferentes proteínas de la cápside, que confieren la especificidad del receptor celular y antigenicidad. El poliovirus tipo 1 es el serotipo más común encontrado en la naturaleza; sin embargo, los tres serotipos son extremadamente infecciosos y peligrosos, siendo los agentes causantes de la poliomielitis. Una de las principales ventajas de este enfoque es la identificación de cepas de poliovirus mediante análisis MALDI-TOF MS ya que se puede obtener después a 5 días-procedimiento (a partir de la observación de un efecto citopático en el cultivo de la muestra), acortando considerablemente el tiempo necesario para llevar a cabo la prueba de neutralización (que requiere aproximadamente 20 días). Esto confirma la capacidad de la plataforma de MALDI-TOF MS de acortar significativamente los tiempos para los métodos de identificación convencionales en algunos casos y,

por otra parte, la reducción significativa de los costos de reactivos y la necesidad de personal con experiencia (35).

PCR y MALDI-TOF SM en parasitología

Durante las últimas décadas, el estudio a nivel molecular de los parásitos que afectan a los humanos o a sus cultivos y producciones animales ha sido uno de los frentes más activos en parasitología clínica y aplicada. De hecho, hoy en día se ha secuenciado ya el genoma completo de algunos parásitos de especial importancia socioeconómica, como el que causa la malaria humana (*Plasmodium falciparum*) (3). En este sentido, las técnicas para poder detectar y caracterizar el ADN de un patógeno continúan mejorando y desarrollándose. El procedimiento discriminatorio fundamental es la secuenciación del genoma (3). Las técnicas tales como el RFLP, el PCR-RFLP, el RAPD-PCR continuarán desempeñando un papel central en la identificación y discriminación de los aislamientos de la mayoría de los patógenos (4), sin embargo técnicas simples como la PCR convencional continúan demostrando su utilidad, sobre todo en países en desarrollo, donde acceder a equipos de última tecnología puede ser difícil.

La biología molecular, incluyendo técnicas de genotipaje diversas y sobre todo de secuenciación de ADN, ha conllevado una total revolución y la necesidad de revisar muchísimos de los conceptos e ideas sobre evolución de los diferentes grupos parásitos de lo que se sabía hasta hace poco. Merecen especial mención la gran utilidad de los diferentes y numerosos marcadores tanto del ADN ribosomal como del ADN mitocondrial, dadas las valiosísimas y muy útiles características de la multiplicidad repetitiva de los genes y especiadores como la evolución concertada de estos dos tipos de marcadores genéticos, que los convierten en idóneos para este tipo de estudios. La aplicabilidad de estas técnicas se muestra a diferentes niveles. Ya no únicamente para analizar la evolución de grupos de parásitos completos o de conjuntos de especies bien próximas y emparentadas, bien más o menos lejanas, sino también para el estudio de fenómenos microevolutivos locales (36), como sucede en fenómenos de hibridación entre especies de parásitos muy próximos detectables mediante haplotipaje combinado jugando con genes y especiadores diversos y análisis de microsatélites y de introgresión (37).

En cuanto a la técnica MALDI-TOF MS, hasta ahora se ha limitado a la obtención de datos del proteoma parasitario general, para la caracterización de biomarcadores específicos con el fin de discriminar entre especies de *Cryptosporidium* y *Giardia*. Además de esto, Martiny *et al.* (2014), evaluaron su posible aplicación para diferenciar subtipos de *Blastocystis*. En relación a esto, una base de datos con señales de proteínas parasitarias fue construido para cinco subtipos de *Blastocystis*, y los espectros de referencia se compararon con los de 19 cultivos axénicos de ST1, ST2, ST3, ST4 y ST8 y nueve cultivos xenicos líquidos con ST3 y ST4. Las muestras de los cultivos axénicos se prepararon utilizando la extracción con ácido fórmico estándar. Los espectros de referencia revelaron cinco perfiles espectrales diferentes, y la biblioteca de base de datos permitió la discriminación entre todos los cultivos con índices de fiabilidad que van desde 2,038 hasta más de 2,8 cuando se realizó una extracción. El procedimiento de deposición directa como resultado una mayor variabilidad en la discriminación y la identificación directa de MALDI-TOF MS a partir de cultivos líquidos xenicos fue eficaz en 3 de 9 muestras. MALDI-TOF MS resultó ser una tecnología eficaz para discriminar eficazmente subtipos de *Blastocystis* en cultivos axénicos (38).

Cassagne *et al* (2014) en Francia, lograron identificar, a nivel de especie, los promastigotes de *Leishmania* de cultivo *in vitro*. Primero construyeron una base de datos de referencia de espectros incluyendo las principales especies que causan la leishmaniasis humana. El rendimiento de la base de datos de referencia en la identificación de promastigotes de *Leishmania* se probó en un panel de 69 aislados obtenidos de pacientes. Los autores identificaron correctamente 66 de las 69 cepas probadas a nivel de especie, con un registro (puntuación) de valores superiores a 2. Dos aislamientos de *Leishmania* produjeron patrones no interpretables por MALDI-TOF MS, debido a los bajos valores de registro (puntuación). Sólo una cepa de *Leishmania peruviana* se ha identificado erróneamente como las especies estrechamente relacionadas *Leishmania braziliensis*, con un registro (puntuación) de 2.399. MALDI-TOF MS es un enfoque prometedor, pues proporciona la identificación rápida y precisa de *Leishmania* a partir del cultivo *in vitro* a nivel de especie (39).

Por otra parte, Calderaro *et al* (2015), realizaron un estudio para la identificación y diferenciación de *E.*

histolytica y *E. dispar* por MALDI-TOF MS, con el fin de evaluar la aplicación de esta técnica en la práctica de diagnóstico de rutina. MALDI-TOF MS se aplicó a 3 cepas de amibas de referencia y 14 cepas aisladas de heces que habían sido diferenciadas por métodos moleculares. Los extractos de proteína a partir de cultivos de estas cepas en medio mínimo (para las cepas de referencia y cultivos monoxénicos para los aislamientos) se analizaron por MALDI-TOF MS y los espectros obtenidos se analizaron mediante el software estadístico. Cinco picos que discriminan entre cepas de referencia de E. histolytica y E. dispar fueron encontrados por el análisis del perfil de proteínas: 2 picos (8.246 y 8.303 Da) específicos para *E. histolytica* y 3 (4,714; 5,541; 8,207 Da) de *E. dispar*. Todos los aislados clínicos excepto uno mostraron los picos esperados discriminantes para las especies apropiadas. Este estudio muestra que MALDI-TOF MS puede ser utilizado para discriminar entre *E. histolytica* y *E. dispar* utilizando cultivos *in vitro* xenicos y también podría tener potencial para la detección de estas especies en muestras clínicas (40).

Limitaciones de MALDI-TOF SM

Entre las limitaciones de MALDI-TOF SM se puede señalar que tanto el material, como todas las superficies requieren estar extremadamente limpias. Los contaminantes más frecuentes son queratina humana y BSA. La queratina proviene del polvo, pequeños pelos o pelusas y huellas de dedos. Un pequeño pelo contiene cantidades abrumadoras de queratina comparado con la cantidad de proteína de la muestra. Por otra parte, cada espectro de referencia de las bibliotecas se ha creado con especies microbianas individuales, lo cual limita el potencial de discriminacion de la especie cuando se trata de cultivos polimicrobianos (19). Es decir, proporciona una idea general de las especies microbianas dominantes en una muestra de cultivo polimicrobiano, pero con información limitada sobre las especies microbianas residuales. Esto puede explicarse debido a que si las muestras tienen varios componentes, estos competirán por los protones en el proceso de ionización y encontraremos señales más altas de los componentes que están a mayor concentración, mientras que los de baja concentración darán señales débiles que pueden ser eliminadas en el procesado del espectro de masas.

Conclusión

En la actualidad, existe una necesidad crítica de desarrollar métodos precisos, específicos, de alto rendimiento y bajo costo para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, las pruebas de PCR han tenido una enorme proyección como herramienta útil y extremadamente sensible en investigación biomédica, industrial y biológica. Por su parte, la espectrometría de masas MALDI-TOF se ha convertido en un recurso de referencia para la identificación de microorganismos. Se evidencia en diferentes investigaciones, la comparacion en cuanto a los porcentajes de identificaciones por MALDI-TOF MS e identificación convencional o con PCR, donde en algunos casos se observa que la espectrometría de masas es un método más confiable que los utilizados actualmente en el laboratorio para el mismo fin. De manera similar al comparar los costos, cada identificación cuesta en promedio ocho veces menos que la convencional. Una de los características más novedosas de la MALDI-TOF MS, es la obtención de mapas de concentración de analitos sobre cortes de tejido o distintos tipos de superficies orgánicas o inorgánicas. Esto permite describir la distribución espacial de un compuesto químico en una muestra sin apenas tratamiento previo (tejido, célula, material sintético),con una resolución de unas pocas decenas de micras. Por otra parte, esta técnica constituye una herramienta complementaria a las moleculares y en casos como el análisis de polimorfismos de secuencias en genes relacionados con resistencia bacteriana tiene excelentes resultados.

Referencias

1. Vinueza-Burgos C. PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. Rev Electrón Vet 2009; 10(2). [citado junio 2019]. Disponible en: https://www.redalyc.org/pdf/636/63617114013.pdf.
2. Lu Z, Chen Y, Jing X, Hu C. Diagnostic accuracy of MALDI-TOF mass spectrometry for non-small cell lung cancer: a meta-analysis. Biomarkers 2018;23(3):245-252. https://doi.org/10.1080/1354750X.2017.1420822
3. Adams VY, Bencomo HA, Rodríguez LR, Aquino RS, González DI. La biología molecular en el estudio de la inmunopatología. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 2014;30(4):313-318. [citado junio 2019]. Disponible en: https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubheminmhem/rch-2014/rch144c.pdf
4. Palomino-Camargo C, González-Munóz Y. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. Rev.

Perú. Med. Exp. Salud Pública 2014;31(3):535-546. [citado junio 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000300020

5. Astorga MP. Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 277–287.
6. Farfán M. Biología Molecular aplicada al Diagnóstico Clínico. Rev Méd Clín Las Condes 2015;26(6):788-793. https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2015.11.007
7. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en Discapacidad 2013;2(2):70-78. [citado junio 2019]. Disponible en: https://www.medigraphic.com/pdfs/invdis/ir-2013/ir132d.pdf
8. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. Anal Bioanal Chem 2007;389(4):1017-1031. https://doi.org/10.1007/s00216-007-1486-6.
9. Greco V, Piras C, Pieroni L, Ronci M, Putignani L, Roncada P, *et al.* Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical proteomics. Exp Rev Proteomics 2018;15:8:683-696. https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1505510
10. Zaima N, Hayasaka T, Goto-Inoue N, Setou M. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry. Int J Mol Sci 2010;11(12):5040-5055. https://doi.org/10.3390/ijms11125040.
11. Maldonado N, Robledo C, Robledo J. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. Infectio 2018;22(1):35-45. http://dx.doi.org/10.22354/in.v0i0.703.
12. Oviaño M, Rodriguez B, Caballero J, Muñoz J. Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDITOF en microbiología clínica 2019. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2019.
13. Legarraga P, Moraga M, Lam M, Geoffroy E, Zumarán C, García P. Impacto de la espectrometría de masas por MALDI-TOF MS en la identificación rápida de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de importancia clínica. Rev chil infectol 2013;30(2):140-146. http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000200004
14. Patel R. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. Clin Chem 2015;61(1):100-111. http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2014.221770.
15. Relloso MS, Nievas J, Taie SF, Farquharson V, Mujica MT, Romano V, *et al.* Evaluación de la espectrometría de masas: MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de levaduras. Rev Argent Microbiol 2015;7(2):103-107. [citado junio 2019]. Disponible en: https://www.redalyc.org/pdf/2130/213039768004.pdf
16. March G, Eiros JM. Impacto de la Metodología MALDI-TOF en la identificación Clínica de agentes infecciosos. Electron J Biomed 2012;1:60-65. [citado junio 2019]. Disponible en: https://biomed.uninet.edu/2012/n3/march.pdf
17. Wolk DM, Clark AE. Matrix-assisted laser desorption time of flight mass spectrometry. Clin Lab Med 2018;38(3):471-486. http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2018.05.008.
18. Sun X, Guo B. Genotyping single-nucleotide polymorphisms by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight-based mini-sequencing. Methods Mol Med 2006;128:225-230. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-159-8_15.
19. Cao Y, Wang L, Ma P, Fan W, Gu B, Ju S. Accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of Mycobacteria: a systematic review and meta-analysis. Sci Rep 2018;8(1):4131. http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-22642-w.
20. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol 2010;48(5):1549-1554. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01794-09.
21. Panda A, Kurapati S, Samantaray JC, Srinivasan A, Khalil S. MALDI-TOF mass spectrometry proteomic based identification of clinical bacterial isolates. Indian J Med Res 2014;140(6):770-777. [citado junio 2019]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4365351/
22. Zárate MS, Romano V, Nievas J, Smayevsky J. Utilidad de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias. Rev Argent Microbiol 2014;46(2):98-102. [citado junio 2019]. Disponible en: https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1015466
23. Schubert S, Kostrzewa M. MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory: current trends. Curr Issues Mol Biol 2017;23:17-20. http://dx.doi.org/10.21775/cimb.023.017.
24. Fernández-Álvarez C, Torres-Corral Y, Santos Y. Use of ribosomal proteins as biomarkers for identification of Flavobacterium psychrophilum by MALDI-TOF mass spectrometry. J Proteomics 2018;170:59–69. http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2017.09.007
25. Clark CM, Costa MS, Sanchez LM, Murphy BT. Coupling MALDI-TOF mass spectrometry protein and specialized metabolite analyses to rapidly discriminate bacterial function. PNAS 2018;115(19)4981-4986. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1801247115
26. Welker M, Van Belkum A, Girard V, Charrier J, Pincus D. An update on the routine application of MALDI-TOF

MS in clinical microbiology. Expert Rev Proteomic 2019;16(8):695-710. http://dx.doi.org/10.1080/14789450.2019.1645603

27. Kostrzewa M. Application of the MALDI Biotyper to clinical microbiology: progress and potential. Expert Rev Proteomic 2018; 15(3): 193-202. http://dx.doi.org/10.1080/14789450.2018.1438193
28. Garza-Ramos U, Silva-Sánchez J, Martínez-Romero E. Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. Salud Pública Méx 2009;51 (Suppl 3): s439-s446. [citado junio 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342009000900009
29. Van Belkum A, Chatellier S, Girard V, Pincus D, Deol P, Dunne Jr. Progress in proteomics for clinical microbiology: MALDI-TOF MS for microbial species identification and more. Expert Rev Proteomic 2015;12(6):595-605. https://doi.org/10.1586/14789450.2015.1091731.
30. Sturenburg E, Storm N, Sobottka I, Horstkotte MA, Scherpe S, Aepfelbacher M, *et al.* Detection and genotyping of SHV beta-lactamase variants by mass spectrometry after base-specific cleavage of *in vitro*-generated RNA transcripts. J Clin Microbiol 2006;44(3):909-915. https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.909-915.2006
31. Florio W, Tavanti A, Barnini S, Ghelardi E, Lupetti A. Recent advances and ongoing challenges in the diagnosis of microbial infections by MALDI-TOF mass spectrometry. Front Microbiol 2018;(9):1097. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01097.
32. Chan W, Chan T, Lai T, Fuk-Woo J Chan, Lai R, Lai K, Tang B. Complementary use of MALDI-TOF MS and real-time PCR–melt curve analysis for rapid identification of methicillin-resistant staphylococci and VRE. J Antimicrob Chemother 2015;70(2):441-447. https://doi.org/10.1093/jac/dku411.
33. Usme-Ciro JA, Gómez-Castañeda AM, Gallego-Gómez JC. Detección molecular y tipificación del virus dengue por RT-PCR y PCR anidada usando oligonucleótidos mejorados. Salud Uninorte 2012;28(1):1-15. [Citado junio 2019] Disponible en: http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v28n1/v28n1a02.pdf
34. Gómez-Camarasa C, Cobo F. Application of MALDI-TOF Mass Spectrometry in clinical virology. En: Cobo F, Editor. The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in clinical Microbiology. 2018;167–180. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814451-0.00012-5
35. Calderaro A, Arcangeletti MC, Rodighiero I, Buttrini M, Gorrini C, Motta F, *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification. Sci Rep 2014;4:6803. https://doi.org/10.1038/srep06803.
36. Halada P, Hlavackova K, Dvorak V, Volf P. Identification of immature stages of phlebotomine sand flies using MALDI-TOF MS and mapping of mass spectra during sand fly life cycle. Insect Biochem Molec 2018;93:47–56. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.12.005
37. Pérez-Tris J. La parasitología ecológica en la era de la genética molecular. Ecosistemas 2009;18(1):52-59.
38. Martiny D, Bart A, Vandenberg O, Verhaar N, Wentink-Bonnema E, Moens C, *et al.* Subtype determination of Blastocystis isolates by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2014;33(4):529-536. https://doi.org/10.1007/s10096-013-1980-z.
39. Cassagne C, Pratlong F, Jeddi F, Benikhlef R, Aoun K, Normand A, *et al.* Identification of *Leishmania* at the species level with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Microbiol Infect 2014;20(6):551-557. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12387.
40. Calderaro A, Piergianni M, Buttrini M, Montecchini S, Piccolo G, Gorrini C, *et al.* MALDI-TOF Mass Spectrometry for the detection and differentiation of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar. PLoS ONE 2015;10(4):e0122448. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122448

AGRADECIMIENTO PARA LOS ARBITROS DE 2019

La contribución de los árbitros es esencial para mantener y mejorar la calidad de los trabajos publicados en la Revista Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas. Por esta razón queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento a los colegas quienes han dedicado tiempo y esfuerzo para el arbitraje de los trabajos publicados en nuestra revista durante el año 2019.

Abiguey Vásquez

Angélica Castro

Celsy Hernández

Edith Ortega

Giuseppe Ferrara

Hilda Stekman

Jenny Figueira

María Mercedes Panizo

Merlyn Vivenes

Noel Silva

Rafael Apitz

Shasbleidy Díaz

Yacelli Bustamante

ÍNDICE POR AUTORES AÑO 2019

B

Briceño, Ramón

véase Bustamante, Yacelli 2019;22(1):2-11

Bustamante, Yacelli

Expectativas de los usuarios pacientes de servicios de bioanálisis. Experiencia Venezuela 2019;22(1):2-11

C

Camejo María Isabel 2019;22(2): 37-47

véase Goncalves, Juvic

Casart, Ysabel

véase Goncalves, Juvic 2019;22(2): 37-47

D

Dominguez, Nancy

Véase Ferrara, Giuseppe 2019;22(1): 18-26

Duarte, Andreína

Véase Ferrara, Giuseppe 2019;22(1): 18-26

F

Ferrara, Giuseppe

Candidemia en recién nacidos en el Hospital Universitario De Caracas 2019;22(1): 18-26

G

Garcés, María Fatima

Editorial 2019;22(1):1

Editorial 2019;22(2):35-36

véase Hernández, Celsy 2019;22(1): 12-17

Valores de referencia de Zinc y Cobre en niños aparentemente sanos 2019;22(2): 48-56

Goncalves, Juvic

Sulfato de magnesio y su acción anti-inflamatoria en explantes de placenta 2019;22(2): 37-47

H

Hernández, Celsy

Parámetros Bioquímicos de rutina en niños diagnosticados con Trastorno del Espectro Autista 2019;22(1): 12-17

Véase Garcés, María Fatima 2019;22(2): 48-56

M

Macero, Carolina

Véase Moreno Calderón, Xiomara 2019;22(2): 57-62

Martínez, Clara

véase Hernández, Celsy 2019;22(1): 12-17

Márquez, Ana Cecilia

véase Hernández, Celsy 2019;22(1): 12-17

Véase Garcés, María Fatima 2019;22(2): 48-56

Mendoza, Fabiola

véase Bustamante, Yacelli 2019;22(1):2-11

Moreno Calderón, Xiomara
Véase Hernández, Celsy 2019;22(1): 12-17
Generalidades en microbiota intestinal 2019;22(1):27-34
Véase Garcés, María Fatima 2019;22(2): 48-56
Queratitis asociada a lentes de contacto por *Nigrospora* sp 2019;22(2): 57-62
N
Núñez, María Luisa
véase Hernández, Celsy 2019;22(1): 12-17
P
Palencia, Aura
Espectrometría de masas/maldi-tof y reacción en cadena de la polimerasa: técnicas complementarias en la identificación de biomoléculas 2019;22(2): 63-71
Panizo, María Mercedes
Véase Ferrara, Giuseppe 2019;22(1): 18-26
Patiño, Yraima
véase Garcés María Fatima 2019;22(2): 48-56
R
Rodríguez, Betania
véase Hernández, Celsy 2019;22(1): 12-17
véase Garcés, María Fatima 2019;22(2): 48-56
Romero, Gabriela
Véase Palencia, Aura 2019;22(2): 63-71
Rondón, Anny
Véase Ferrara, Giuseppe 2019;22(1): 18-26
S
Silva, Derys
véase Moreno Calderón, Xiomara 2019;22(2): 57-62
V
Villamizar, Lewis
véase Bustamante, Yacelli 2019;22(1):2-11
Vialva, Andris
Véase Moreno Calderón, Xiomara 2019;22(1):27-34

ÍNDICE POR TITULOS 2019

C

Candidemia en recién nacidos en el Hospital Universitario De Caracas 2019;22(1): 18-26

E

Espectrometría de masas/MALDI-TOF y reacción en cadena de la polimerasa: técnicas complementarias en la identificación de biomoléculas 2019;22(2): 63-71

Expectativas de los usuarios pacientes de Servicios de Bioanálisis. Experiencia Venezuela 2019;22(1):2-11

G

Generalidades en microbiota intestinal 2019;22(1):27-34

P

Parámetros Bioquímicos de rutina en niños diagnosticados con Trastorno del Espectro Autista 2019;22(1): 12-17

Q

Queratitis asociada a lentes de contacto por *Nigrospora sp* 2019;22(2): 57-62

S

Sulfato de magnesio y su acción anti-inflamatoria en explantes de placenta 2019;22(2): 37-47

V

Valores de referencia de Zinc y Cobre en niños aparentemente sanos 2019;22(2): 48-56

ÍNDICE PALABRAS CLAVE AÑO 2019

A

Autismo 2019;22(1): 12-17

B

Biología molecular 2019;22(2): 63-71

C

Candidemia 2019;22(1): 18-26

Cobre 2019;22(2): 48-56

Cultivo 2019;22(1):27-34
2019;22(2): 57-62

E

Espectrofotometría de absorción atómica 2019;22(2): 48-56

Espectrometría de masas 2019;22(2): 63-71

Evolución 2019;22(1):27-34

Expectativas 2019;22(1):2-11

Explantes de placenta 2019;22(2): 37-47

F

Funciones 2019;22(1):27-34

G

Glicemia 2019;22(1): 12-17

H

Hipocolesterelomia 2019;22(1): 12-17

Hipoxia 2019;22(2): 37-47

Huella peptídica 2019;22(2): 63-71

K

KOH al 20 % 2019;22(2): 57-62

M

Microbiota intestinal 2019;22(1):27-34

N

Natamicina 2019;22(2): 57-62

Nigrospora sp. 2019;22(2): 57-62

Niños 2019;22(2): 48-56

P

Parámetros bioquímicos 2019;22(1): 12-17

Pediatría 2019;22(2): 48-56

Proteómica 2019;22(2): 63-71

R

Recién nacido 2019;22(1): 18-26

Requisitos 2019;22(1):2-11

S

Secuenciación 2019;22(1):27-34

Servicios de Bioanálisis 2019;22(1):2-11

Simbiosis 2019;22(1):27-34

Sistema de Gestión de la Calidad 2019;22(1):2-11

Sulfato de magnesio 2019;22(2): 37-47

T

Trastorno del Espectro Autista 2019;22(1): 12-17

U

Unidad de Cuidado Intensivo neonatal 2019;22(1): 18-26

V

Valores de referencia 2019;22(2): 48-56

Voriconazol 2019;22(2): 57-62

Z

Zinc 2019;22(2): 48-56

INFORMACION PARA LOS AUTORES

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

Envío del Trabajo

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

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

Sistema de Arbitraje

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

Normas Editoriales

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

Los artículos originales deben guardar la siguiente estructura:

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

Resumen debe establecer los objetivos del estudio, los procedimientos básicos (selección, métodos de observación y análisis) los hallazgos más importantes, proporcionar datos específicos y, significación estadística y las conclusiones principales sobre la base de los resultados del estudio.

No debe contener referencias ni siglas que no estén identificadas. El límite máximo son 250 palabras y no debe ser estructurado.

Al final del resumen deben estar 3 a 10 palabras clave, que incluyan descriptores en inglés, de la lista del "Medical Subject Headings (MeSH) y en español de la lista de "descriptores en Ciencias de la Salud" (DECS).

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

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

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

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

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

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

Las Revisiones pueden ser solicitadas por el Editor preferentemente a especialistas sobre un tema de importancia científica en la actualidad, pero también se aceptan revisiones de autores, las cuales seguirán el proceso de arbitraje externo En la revista también se publican reportes cortos de hallazgos de interés para el ámbito de la revista, así como casos clínicos cuya ocurrencia sea un verdadero hallazgo.

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

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

para reproducirlos y conceda el reconocimiento al autor. No incluya más de 5 cuadros, máximo de 5 columnas y 8 filas.

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

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

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

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

Ejemplos de referencias:

Artículos de revista

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

1. Artículo de revista ordinario

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

Libros

2. Individuos como autor:

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

3. Editores como autor:

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

4. Capítulo de libro:

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

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

Material electrónico

5. Artículo de revista en Internet:

Vázquez de la Torre MJ, Vázquez Castellanos JL, Crocker Sagastume R. Hipertensión arterial en niños escolares con sobrepeso y obesidad. Respyn [Serie en Internet] 2011 Jul-Sep

[citada 5 nov 2011]; 12(3): [6 pantallas]. Se consigue en: URL: http://www.respyn.uanl.mx/xii/3/articulos/Hipertension_arterial.htm.

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

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

Artículo de revisión:

El artículo de revisión facilita la actualización y revisión de un aspecto científico, realizado por especialistas en el tema: ofrece al lector interesado una información condensada sobre un tema, realiza interpretaciones y adelanta explicaciones en tópicos específicos relacionados al área del Bioanálisis.

El número máximo de autores es cuatro. El artículo requiere de, al menos, 40 referencias con prioridad de los últimos cinco (5) años. En caso de que esto no sea posible, deben especificarse las razones (tópicos muy poco frecuentes o muy poco investigados previamente). El texto deberá expresar con claridad las ideas a ser desarrolladas, y tratara de transmitir un mensaje útil para la comprensión del tema central del artículo de revisión.

Las secciones básicas del artículo de revisión son: página inicial, resumen, (en español y en inglés), introducción, texto, referencias bibliográficas. El cuerpo de las revisiones es libre, aunque es conveniente subdividirlo en secciones.

El autor o los autores de un artículo de revisión deben plasmar su interpretación crítica de los resultados de la revisión bibliográfica con claridad y precisión, y dejar siempre la inquietud sobre aquellos tópicos del tema que requieren una mayor o más profunda investigación. La extensión de los artículos de revisión no debe ser mayor de 6000 palabras, excluyendo las referencias.

Acta Científica
de la Sociedad Venezolana
de Bioanalistas Especialistas

CONTENTS

Vol. 22 - No 2 2019

EDITORIAL
María Fátima Garcés..... 35

ORIGINAL ARTICLES:
Magnesium sulphate and its anti-inflammatory action in placenta explants
Juvic Madeleyne Goncalves, Ysabel Cristina Casart, María Isabel Camejo..... 37

Reference values of zinc and copper in apparently healthy children
María Fátima Garcés, Celsy Hernández, Yacelli Bustamante, Yraima Patiño, Betania Rodríguez, Ana Cecilia Márquez, Xiomara Moreno..... 48

Contact lens associated keratitis due to *Nigrospora* sp
Xiomara Moreno, Carolina Macero, Derys Silva..... 57

REVIEW ARTICLE:
Mass spectrometry / MALDI-TOF and Polymerase Chain Reaction: complementary techniques in the identification of biomolecules
Aura Palencia M., Gabriela Romero B..... 63

THANKS TO THE 2019 REFEREES 72

INDEX BY AUTHORS, TITLES AND KEYWORDS YEAR 2019..... 73

INFORMATION FOR AUTHORS 77

Diseño y diagramación: Ana María Reyes, digivi@gmail.com
Soporte Web: Nexus Radical, Altemar Pérez, aperez@estudiopro.com