



REVISTA

DEL COLEGIO DE MICROBIÓLOGOS Y QUÍMICOS CLÍNICOS DE COSTA RICA

Volumen 22, N°1 • Enero - marzo, 2016 • ISSN:2215-3713

Enero - marzo

CONTENIDO

Artículos

- El virus del Zika
- Zika: sobre microcefalia y Guillain-Barré
- El efecto de los reguladores epigenéticos sobre la remodelación de la cromatina
- Estrategias para optimizar la detección y el aislamiento de micobacterias no tuberculosas en especímenes respiratorios: experiencia en el Hospital Nacional de Niños
- Neutropenia: un vistazo a su etiología y abordaje clínico
- XL Aniversario de Microscopia Electrónica y el INISA: los principales aportes científicos en los primeros años

Carta al editor

- Si no coloniza, no infecta y si no infecta no enferma



COLEGIO DE MICROBIÓLOGOS Y QUÍMICOS CLÍNICOS DE COSTA RICA

Tels.: (506) 2224-2602
(506) 2283-8014
Fax: (506) 2225-5138
Apartado postal: 4614-1000
colmqc@racsa.co.cr
www.microbiologos.cr

JUNTA DIRECTIVA 2016-2017:

Presidenta. Dra. Lidiette Salazar Palma
Secretaria. Dr. Tony Arrieta Araya
Tesorerera. Dra. Carolina Loría Acosta.
Fiscal. Dr. Dennis León Alán
Vocal 1. Dr. Rolando Leiva Escalante
Vocal 2. Dr. José Pablo Montes de Oca Murillo
Vocal 3. Dr. Jorge López Villegas

COMITÉ EDITORIAL:

Dr. Gabriel Muñoz Cernadas (Editor jefe)
Universidad de Ciencias Médicas
CEC-ICIC
Dr. César Cerdas Quesada
Hospital La Católica.
Dr. Rodrigo Cruz Jiménez
Hospital Clínica Bíblica
Dr. Marco Luis Herrera Hidalgo
Hospital Nacional de Niños, CCSS.
Dra. Carolina Loría Acosta
Hospital San Juan de Dios, CCSS.
Dr. Gustavo Villegas Bermúdez
Hospital Nacional de Niños, CCSS.

Revisión de texto en español:

Dr. Carlos Cerdas Chinchilla

Revisión de texto en inglés:

Dr. Rodolfo Gutiérrez Fernández

Diagramador:

Jorge Vargas González

ISSN: 2215-3713

Derechos reservados ©2016

JVDISEÑO

jdiseño1958@gmail.com / 8387+4343



La Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica es publicada trimestralmente por este colegio profesional. Constituye un medio de divulgación del quehacer científico de investigadores nacionales e internacionales y cumple con un propósito de responsabilidad social con nuestros colegiados y con los gremios profesionales afines.

Esta revista publica trabajos originales en español e inglés, es de acceso libre y sin costo de suscripción.

ÍNDICE

Nota del editor

- 1 *Dr. Gabriel Muñoz-Cernadas, Editor jefe.*

Artículos

- 2 **El virus del Zika.** *Eugenia Corrales-Aguilar, Claudio Soto-Garita.* Sección de Virología, Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
- 7 **Zika: sobre microcefalia y Guillain-Barré.** *Eugenia Corrales-Aguilar.* Sección de Virología, Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
- 10 **El efecto de los reguladores epigenéticos sobre la remodelación de la cromatina.** *Kevin Leandro-Sandí.* Laboratorio Clínico, Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera, CCSS.
- 18 **Estrategias para optimizar la detección y el aislamiento de micobacterias no tuberculosas en especímenes respiratorios: experiencia en el Hospital Nacional de Niños.** *Kevin Leandro-Sandí.* Laboratorio Clínico, Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera, CCSS.
- 25 **Neutropenia: un vistazo a su etiología y abordaje clínico.** *Lucía Figueroa-Protti.* Facultad de Microbiología, Universidad de Ciencias Médicas.
- 34 **XL Aniversario de Microscopía Electrónica y el INISA: los principales aportes científicos en los primeros años.** *Francisco Hernández-Chavarría.* Escuela de Artes Plásticas, Universidad de Costa Rica.

Carta al editor

- 39 **Si no coloniza, no infecta y si no infecta no enferma.**
Marco Luis Herrera-Hidalgo
- 40 • Instrucciones para los autores
- 42 • Próximos eventos

Nota del editor

En 1879 el Dr. John Shaw Billings creó el Index Medicus, que consistió en un amplio índice bibliográfico de revistas científicas cuyos artículos se centraban en las ciencias médicas. En ese momento el Dr. Billings ocupaba el cargo de director de la biblioteca de la Oficina del Cirujano General del ejército de los Estados Unidos, que posteriormente se convertiría en la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos.

El Index Medicus se publicó hasta el año 2004, ya que con el desarrollo de los sistemas informáticos durante la década de los años 60 del siglo pasado, se comenzó a computarizar las revistas indexadas dando inicio al MEDLARS, una base de datos bibliográficos y actualmente PUBMED continúa esta labor.

La inclusión de una revista a este índice depende de la política y la calidad científica de los artículos que publica, la cual es evaluada.

En el año 1995, en la Universidad Autónoma de México surgió la idea de crear un sistema de información sobre las revistas de investigación científica, técnico-profesionales y de divulgación científica y cultural que se editan en los países de América Latina, el Caribe, España y Portugal, naciendo de esta forma Latindex.

Latindex es un proyecto cooperativo no lucrativo que, a través de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, ofrece asesoría a los directores y editores de revistas de esta universidad, así como de otras universidades o instituciones que cuentan con publicaciones en diferentes áreas de investigación. Para estar incluida en la base de datos de Latindex, una revista debe cumplir con un mínimo de criterios previamente establecidos, los cuales son evaluados por parte de esa vicerrectoría.

El catálogo de revistas indizadas en Latindex está en Internet, disponible de una forma gratuita a todos aquellos que la quieran utilizar.

El año pasado solicitamos por primera vez la evaluación de nuestra revista la cual superó satisfactoriamente este proceso y pasó a formar parte del Catálogo de Latindex. Citando las palabras de la Dra. Alice L. Pérez,

Vicerrectora de Investigación, expresadas en la carta en la cual se comunicó el resultado, *“esto significa un reconocimiento a los esfuerzos realizados por el Consejo Editorial en la mejora de la revista, tanto en los aspectos formales como en su contenido. Adicionalmente, implica un aval a la calidad de esta publicación.”*

Este logro se debe al esfuerzo de un número importante de personas que han trabajado desinteresadamente para que nuestra revista adquiriera esta madurez después de 21 años de publicarse. Creo obligatorio destacar en este momento, además de los miembros actuales y anteriores del comité editorial, a la Dra. Lidiette Salazar Palma, presidenta del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica, quien confió en nuestra propuesta y en nuestro trabajo, al Dr. Wilbert Alfaro Bourrouet, quien trabajó sin descanso y a menudo solo durante muchos años difíciles tratando de implantar la calidad científica de la revista, al Dr. Carlos Cerdas Chinchilla y al Dr. Rodolfo Gutiérrez Fernández, responsables de la revisión de los textos en español e inglés respectivamente, y al señor Jorge Vargas González, diagramador y encargado de la impresión, quien ha sido además, paciente consejero y guía en muchas de las decisiones que se deben tomar para publicar con éxito cada número de la revista.

También debo destacar el trabajo anónimo e imprescindible de muchos colaboradores que han actuado como revisores de artículos relacionados a sus áreas de conocimiento y a todos los autores que con sus artículos han contribuido al mantenimiento y crecimiento de esta revista.

Este logro nos estimula y compromete a seguir trabajando para publicar la revista en línea y que tenga una mayor presencia internacional, se promueva el prestigio de los autores y podamos medir el factor de impacto de los artículos publicados. 

Dr. Gabriel Muñoz-Cernadas
Editor jefe

El virus del Zika

Zika virus

Eugenia Corrales-Aguilar¹, Claudio Soto-Garita^{II}

Resumen:

El virus del Zika es un arbovirus emergente. Se transmite por medio de los mosquitos del género *Aedes*. Fue descrito por primera vez en mosquitos y monos del bosque Zika en Uganda, en 1947; posteriormente, en seres humanos en el África sub-sahariana para luego llegar al sureste asiático a mediados del siglo XX. En el presente siglo, se diseminó por las islas del Pacífico y llegó a Suramérica, específicamente, en el 2014. Desde entonces, se ha diseminado rápidamente por todo el continente americano; llegó al sur de los Estados Unidos a principios de este año 2016. Desde el punto de vista clínico, se parece mucho a la enfermedad febril causada por los virus del dengue y chikungunya. Sin embargo, recientemente, y por el gran número de personas infectadas en el continente americano, se le ha asociado con la aparición de infecciones congénitas que causan microcefalia y con síndrome de parálisis tipo Guillain-Barré. Costa Rica ya reportó el primer caso importado y es muy probable que el virus esté circulando en los mosquitos vectores. La presente revisión tiene como objetivo brindar información acerca de este arbovirus emergente y discutir su diagnóstico.

Palabras clave: Zika, virus, *Aedes*, Costa Rica

Abstract:

Zika virus is an emerging arbovirus. It is transmitted through *Aedes* mosquitoes. Zika virus was first described in 1947 from mosquitoes and monkeys found in the Zika forest in Uganda, and then it was found circulating in humans in sub-Saharan Africa prior to its arrival to the Asian Southeast in the middle of the twentieth century. In the 21st century, it disseminated through the Pacific Islands and arrived to South America spreading rapidly into the whole continent and arriving to the south part of USA at the beginning of 2016. Its clinical manifestations are similar to the febrile disease caused by dengue and chikungunya. Nevertheless, recently and due to the high amount of people infected in the American continent, it has been associated to congenital disease inducing microcephaly and with a paralysis syndrome named Guillain-Barre. In Costa Rica the first imported case was already detected and it is highly probable that virus circulation among mosquito vector is already taking place. Here, we provide information about this emerging arbovirus and discuss its diagnostic approach.

Key words: Zika, virus, *Aedes*, Costa Rica

Introducción

El virus del Zika pertenece a la familia Flaviviridae, género Flavivirus. Es un virus ARN de banda simple y de polaridad positiva. Esta familia viral posee como miembros distintos arbovirus (del inglés *arthropod borne virus*: virus transmitidos por artrópodos) de importancia clínica: el virus de la fiebre marilla (YF), el virus del oeste del Nilo (WNV) y el virus del dengue (DENV), entre otros. El virus zika fue aislado por primera vez en 1947, en la región de los bosques de Zika en Uganda, en un mono ⁽¹⁾. El primer caso en seres humanos fue detectado en Nigeria en 1954 ⁽²⁾. El

mosquito vector transmisor pertenece al género *Aedes* ⁽³⁾. La transmisión, tanto urbana como selvática por distintas especies de *Aedes*, ya ha sido demostrada ^(4,5).

La presentación clínica se parece mucho, no solo a la enfermedad febril causada por el dengue, sino también a aquella producida por el virus del Chikungunya ⁽⁶⁻⁹⁾: fiebre acompañada de poliartralgia, mialgias, un exantema maculopapular y cefalea. Lo anterior viene a complicar aún más el panorama complejo de diagnóstico de estas enfermedades. Tratándose de un virus emergente y de alta incidencia en zonas tropicales, no se han realizado muchas investigaciones para el posible desarrollo de

Artículo recibido el 05/02/2016, aceptado para su publicación el 10/02/2016
I y II. Sección de Virología, Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET),
Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica
Correspondencia: eugenia.corrales@ucr.ac.cr

una vacuna efectiva o algún tratamiento antiviral debido al bajo número de casos hasta el momento y su poco impacto clínico con respecto a los otros arbovirus⁽¹⁰⁾. Sin embargo, esto está actualmente cambiando debido a los brotes masivos en las Islas Yap en la Micronesia en el 2007⁽¹¹⁾, a la expansión del virus en el continente americano y a la posible asociación con el desarrollo de microcefalia⁽¹²⁾.

Aspectos virológicos

El genoma de este virus codifica para tres proteínas estructurales C, M y E, y para 7 proteínas no estructurales que cumplen funciones en la replicación y el ensamblaje viral⁽¹³⁾.

Los análisis para dilucidar el origen del virus zika fueron realizados desde el punto de vista prácticamente retrospectivo, basándose en secuencias de aislamientos obtenidos en África y el sureste asiático durante el siglo XX⁽¹⁴⁾. Estudios filogenéticos estiman que la fecha de emergencia en África del virus zika es en 1920, con un rango desde 1892 a 1947⁽¹⁴⁾. Ensayos serológicos realizados en Uganda, en los años finales de 1940, demostraron la seropositividad en el 6.1% de la población⁽¹⁾. No obstante, a finales de los años 1960, se realizó un estudio en Kenia y se demostró una seropositividad promedio del 52%, con muchas variaciones entre áreas⁽¹⁵⁾. En 1980, los estudios serológicos en Nigeria demuestran un 56% de seropositividad en su población⁽¹⁶⁾. No fue hasta la epidemia del 2007, en la Isla de

Yap⁽¹¹⁾ donde se comenzó sistemáticamente a secuenciar el virus hasta obtener el primer genoma completo⁽¹³⁾. Después de la Isla de Yap en el 2007, el siguiente brote ocurrió en la Polinesia francesa en el 2013⁽¹⁸⁾, donde 42 casos fueron asociados al síndrome de Guillain-Barré⁽⁹⁾. Con análisis filogenéticos, determinaron que este virus encontrado en la Polinesia francesa está más relacionado con las cepas del linaje del sureste asiático que con aquellas cepas de la Isla de Yap^(17,19), lo que sugiere un evento independiente de introducción a la Polinesia. Luego, la diseminación viral continuó en esa área del Pacífico en el 2014 hacia Nueva Caledonia, las islas Cook y la Isla de Pascua^(7,20,21). Basados en estudios filogenéticos, se ha demostrado que la trasmisión hacia el continente americano surgió desde las islas del Pacífico^(12,22). Los primeros reportes de casos en seres humanos se dieron en Bahía, Brasil⁽²³⁾, en febrero del 2015. Para diciembre del mismo año, el virus ya se había diseminado por la mayor parte del territorio brasileño^(24,26). Se cree que la causa de esta introducción al territorio brasileño se debe a dos eventos deportivos masivos realizados en esa época: el campeonato mundial FIFA de fútbol o a un evento internacional de carreras en canoas^(25,27). Este último evento es el que se cree más probable que sea responsable de la introducción del virus a Brasil, ya que los participantes en esta carrera fueron mayormente solo miembros de equipos de países o islas del Pacífico afectados con zika. Desde entonces, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado casos en varios países latinoamericanos⁽²⁸⁾, encontrando en este momento 25 territorios donde se ha reportado la

presencia del virus. Además, la OMS declaró a las infecciones del virus zika como una emergencia global a principios de febrero del año en curso^(29,30).

Cuadro 1. Sintomatología y hallazgos de laboratorio diferenciales entre el dengue, el zika y el chikungunya.

Síntomas y hallazgos de laboratorio	Chikungunya	Dengue	Zika
Fiebre (>39°C)	+++	++	+
Mialgias	++	++	+
Artralgias	+++	+	+
Cefalea	++	++	+
Rash (exantema)	++	++	+
Dolor retroorbital	+/-	++	+
Conjuntivitis	-	-	++
Hipotensión	+/-	++	-
Sangrados	+/-	++	-
Neutropenia	+	+++	-
Trombocitopenia	+	+++	-
Hematocrito elevado	-	++	-
Periodo de incubación	3-7 días	3-10 días	3-12 días
Duración de la enfermedad	2-10 días (el dolor articular puede prolongarse por meses o años)	2-10 días	4-7 días
Basado en ^{6,8,9,11,24,28,31}			

Manifestaciones clínicas

La infección por el virus del Zika posee características comunes en su presentación clínica con otros arbovirus como el chikungunya y el dengue (Cuadro 1)^(6,8,9,11,24,28,31). Después de un periodo de incubación de 3 a 12 días, se presenta una fiebre asociada a artralgia, exantema maculopapular, cefalea, vómito, edema, y en algunos casos, se asocia a conjuntivitis. La enfermedad es aguda y dura un promedio de 4 a 7 días. Se observó una asociación con síntomas de parálisis motora tipo

Guillain-Barré en Polinesia, lo que podría complicar una enfermedad que hasta hace unos meses era considerada autolimitada⁽⁹⁾. Además, se ha relacionado con presencia de trastornos congénitos, específicamente con microcefalia^(24,28,32,33). La asociación de causalidad todavía no se ha demostrado científicamente y más estudios virológicos y epidemiológicos son necesarios⁽³⁰⁾. Hasta el momento no se han reportado muertes directas causadas por el virus.

Transmisión

El principal modo de transmisión del virus es por medio de vectores, específicamente mosquitos del género *Aedes*. También se ha reportado la transmisión congénita^(24,33,32), la sexual⁽³⁴⁾, perinatal⁽³⁵⁾ y por transfusiones de preparados sanguíneos de casos asintomáticos⁽³⁶⁾.

Diagnóstico

El virus del Zika es difícil de diagnosticar, ya que comparte los vectores, la distribución geográfica y los síntomas con el dengue. Esto hace el diagnóstico, desde el punto de vista clínico o por nexos epidemiológicos, poco confiable^(11,23). Como ya se mencionó anteriormente, dengue, zika y chikungunya presentan síntomas como fiebre, exantema maculopapular, artralgia, cefalea y pueden estar cocirculando^(11,23) o coinfectando pacientes^(7,11,23). Debido al potencial de producir enfermedades severas o graves por el dengue, es necesario el diagnóstico diferencial entre los tres (cuadro 1)⁽⁸⁾.

La confirmación de laboratorio es recomendada en el caso de infecciones por el virus del Zika, sin embargo, esto es un reto. A pesar de que es probable que una determinación serológica de IgM contra zika no tenga reacción cruzada con alfavirus como el chikungunya, es muy probable que haya reacciones cruzadas con otros flavivirus especialmente con el dengue^(7,11,24,37,38). Una de las recomendaciones actuales es obtener un diagnóstico por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) de sangre, saliva o, curiosamente, de orina en los primeros 5-6 días de enfermedad^(11,24,39). Las concentraciones de ARN viral son más altas en saliva tempranamente después de aparición de los síntomas, pero se mantiene detectable en orina por períodos más largos⁽²⁴⁾. Se reporta que se puede encontrar orina positiva para el ARN viral hasta 10 días después del inicio de los síntomas⁽²⁴⁾.

Los estudios serológicos se pueden realizar en sueros pareados entre los 6 días después del inicio de los síntomas y 2-3 semanas después^(11,37,39). Sin embargo, se reportan gran número de casos falsamente positivos si el virus Zika no ha sido el primer flavivirus infectante⁽¹¹⁾, como sería el caso más probable para Costa Rica; pero también se ha observado en menos ocasiones serocruzamiento contra otros flavivirus si las personas se infectan por primera vez con el Zika⁽¹¹⁾. Para dilucidar un poco mejor estos fenómenos de serocruzamiento, se recomienda la realización de ensayos de neutralización (PRNT) viral contra distintos flavivirus^(11,23,38,39).

También se complica el panorama diagnóstico cuando existan coinfecciones entre zika y dengue, entre dengue y chikungunya o chikungunya y zika^(7,40); es sumamente difícil diferenciar entre estos virus. Hasta el momento, no se han confirmado infecciones concomitantes con los tres virus. Sin embargo, existe un reporte de un caso en Colombia donde se identifica a un paciente con coinfección triple, pero solo demuestran RT-PCR positivo para Zika. La positividad para dengue y chikungunya la diagnostican con una IgM, que se sabe que puede estar positiva por serocruzamiento⁽⁴¹⁾.

Costa Rica ante el riesgo de zika

Desde febrero del 2014 hasta finales de enero del 2016, 25 países y territorios del continente americano han confirmado la circulación autóctona del virus del Zika: Brasil, Barbados, Bolivia, Colombia, Costa Rica, Curazao, Ecuador, El Salvador, Guadalupe, Guayana francesa, Guatemala, Haití, Honduras, Islas Vírgenes, Jamaica, Martinica, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Puerto Rico, República Dominicana, San Martín, Surinam y Venezuela^(28,42).

El 26 de enero del 2016, se reportó el primer caso diagnosticado de zika en un paciente masculino en Costa Rica⁽⁴³⁾. Este paciente informa haber estado en Colombia anteriormente, donde se infectó, lo cual define que el caso sea importado. Hasta el día de hoy (4 de febrero del 2016), no se han confirmado casos en Costa Rica debido a transmisión autóctona. Se sospecha de un caso de un ciudadano norteamericano que se infectó en Nosara (Guanacaste), pero aún no está confirmado. Aún así, Costa Rica presenta todas las condiciones favorables para el desarrollo de una epidemia por el virus del Zika. Su población, al no haber estado en contacto previo con este virus, es susceptible a la infección. Además, como ya sabemos por los casos de dengue y chikungunya que se observan anualmente, los *Aedes* están presentes en la

mayor parte del territorio nacional y en los últimos años *Ae. albopictus* ha ampliado su distribución ⁽⁴⁴⁾.

El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos de América (CDC, por sus siglas en inglés) ha declarado una alerta para evitar viajes a zonas de Latinoamérica donde se encuentran los brotes de zika, particularmente, a mujeres embarazadas para prevenir las posibles malformaciones congénitas producidas por la infección ⁽³¹⁾. Esto, debido a observaciones realizadas en Brasil, donde se ha identificado un aumento en los casos de microcefalia en zonas donde se presentaron brotes por el virus del Zika, y además, se ha podido detectar el virus en pocos bebés nacidos con esta malformación ^(32,33). Sin embargo, y como se mencionó anteriormente, no se ha demostrado aún causalidad. Costa Rica ya está incluida entre los países con alerta de viajes para embarazadas. Cabe resaltar que debido al panorama incierto sobre la causalidad de la infección por el virus del Zika y las manifestaciones congénitas de microcefalia, es entendible la declaración de una alerta y de emergencia global. Esto debe traducirse en un aumento no solo en la prevención de la infección, sino también en un diagnóstico oportuno en esta población en riesgo.

Conclusiones

En estos momentos, no existen vacunas contra el zika en estados avanzados de desarrollo. Sin embargo, debido a plataformas disponibles para la producción de vacunas contra otros flavivirus se presume que la producción de una vacuna puede ser rápidamente desarrollada ⁽⁴⁵⁾, sin embargo, tendrán los mismos problemas que vacunas contra dengue, chikungunya, encefalitis de San Luis y otros arbovirus: los brotes se presentan esporádicamente y no son predecibles; y la vacunación anticipada de poblaciones susceptibles a un brote puede ser muy costosa y poco eficiente ⁽⁴⁵⁾.

Cualquier área geográfica donde esté presente el mosquito *Aedes* es un área potencial para la introducción, transmisión y establecimiento de enfermedades causadas por arbovirus como el zika. Esto implica que, para evitar más casos por este virus, el chikungunya y el dengue, la medida más inmediata y efectiva es el control de vectores. Con el fin de eliminar los criaderos, se deben tomar estas medidas: evitar conservar agua en recipientes como macetas, botellas, basura en el exterior de las viviendas, lugares de trabajo y de estudio, para evitar que se conviertan en criaderos; tapar tanques de agua de uso doméstico para almacenamiento; destapar desagües para evitar agua estancada; además, evitar el contacto o picadura por el mosquito por medio de

la utilización de ropa que cubra la piel, usar repelentes recomendados, o por el uso de métodos de barrera como mallas antimosquitos en ventanas y puertas. Si logramos como individuos, comunidad, ciudadanía eliminar los criaderos de *Aedes*, lograremos disminuir los casos de infecciones por estos tres virus.

Referencias

- Dick, G. W. A., Kitchen, S. F. & Haddow, A. J. (1952). Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **46**, 509–20.
- Macnamara, F. N. (1954). Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **48**, 139–45.
- Diagne, C. T. *et al.* (2015). Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. *BMC Infect. Dis.* **15**, 492.
- Grard, G. *et al.* (2014). Zika Virus in Gabon (Central Africa) – 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e2681.
- Berthet, N. *et al.* (2014). Molecular characterization of three Zika flaviviruses obtained from sylvatic mosquitoes in the Central African Republic. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **14**, 862–5.
- Corrales-Aguilar, E., Troyo, A. & Calderón-Arguedas, Ó. (2015). Chikungunya: a threatening virus. *Acta Med. Costarric.* **57**, 07–15
- Dupont-Rouzeyrol, M. *et al.* (2015). Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 381–2.
- Kelser, E. A. (2015). Meet dengue's cousin, Zika. *Microbes Infect.* doi:10.1016/j.micinf.2015.12.003
- Roth, A. *et al.* (2014). Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections – an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Eurosurveillance* **19**, 20929 . doi: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.41.20929>
- Gatherer, D. & Kohl, A. (2015). Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. *J. Gen. Virol.* doi:10.1099/jgv.0.000381
- Lanciotti, R. S. *et al.* (2008). Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1232–9.
- Zanluca, C. *et al.* (2015). First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **110**, 569–72.
- Kuno, G. & Chang, G.-J. J. (2007). Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch. Virol.* **152**, 687–96.
- Faye, O. *et al.* (2014). Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e2636.
- Geser, A., Henderson, B. E. & Christensen, S. (1970). A multipurpose serological survey in Kenya. 2. Results of arbovirus serological tests. *Bull. World Health Organ.* **43**, 539–52.

16. Adekolu-John, E. O. & Fagbami, A. H. (1983). Arthropod-borne virus antibodies in sera of residents of Kainji Lake Basin, Nigeria 1980. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**, 149–51.
17. Buathong, R. *et al.* (2015). Detection of Zika Virus Infection in Thailand, 2012-2014. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **93**, 380–3.
18. Cao-Lormeau, V.-M. *et al.* (2014).-Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 1085–6.
19. Alera, M. T. *et al.* (2015). Zika virus infection, Philippines, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 722–4.
20. Pyke, A. T. *et al.* (2014). Imported zika virus infection from the Cook islands into Australia, 2014. *PLoS Curr.* **6**, 10.1371/currents.outbreaks.4635a54dbffba2156fb2fd76dc49f65e.
21. Tognarelli, J. *et al.* (2015). A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Arch. Virol.* doi:10.1007/s00705-015-2695-5
22. Enfissi, A., Codrington, J., Roosblad, J., Kazanji, M. & Rousset, D. (2016). Zika virus genome from the Americas. *Lancet* **387**, 227–228.
23. Campos, G. S., Bandeira, A. C. & Sardi, S. I. (2015). Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 1885–6.
24. ECDC, E. C. for D. P. and C. Rapid risk assessment: Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome. at: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/zika-virus-rapid-risk-assessment-8-february-2016.pdf>
25. Gautret, P. & Simon, F. (2015). Dengue, chikungunya and Zika and mass gatherings: What happened in Brazil, 2014. *Travel Med. Infect. Dis.* doi:10.1016/j.tmaid.2015.12.004
26. Bogoch, I. I. *et al.* (2016). Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. *Lancet* **387**, 335–336.
27. Musso, D. (2015). Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 1887.
28. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Epidemiological Update: Neurological syndrome, congenital anomalies, and Zika virus infection. 17 enero 1–8 (2016). at <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11599&Itemid=41691&lang=es>
29. WHO. WHO | WHO Director-General summarizes the outcome of the Emergency Committee regarding clusters of microcephaly and Guillain-Barré syndrome. (2016). at <<http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/emergency-committee-zika-microcephaly/en/>>
30. Samarasekera, U. & Triunfol, M. (2016). Concern over Zika virus grips the world. *Lancet.* doi:10.1016/S0140-6736(16)00257-9
31. CDC. Zika Virus in Central America - Alert - Level 2, Practice Enhanced Precautions - Travel Health Notices | Travelers' Health | CDC. (2016). at <<http://wwwnc.cdc.gov/travel/notices/alert/zika-virus-central-america>>
32. Tetro, J. A. (2016). Zika and microcephaly: causation, correlation, or coincidence? *Microbes Infect.* doi:10.1016/j.micinf.2015.12.010
33. Oliveira Melo, A. S. *et al.* (2016). Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **47**, 6–7.
34. Musso, D. *et al.* (2015). Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 359–61.
35. Besnard, M., Lastere, S., Teissier, A., Cao-Lormeau, V. & Musso, D. (2014).-Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill.* **19** (13) pii:20751.
36. Musso, D. *et al.* (2014). Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill.* **19**(15) pii:20761.
37. Hayes, E. B. (2009). Zika virus outside Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 1347–50.
38. Duffy, M. R. *et al.* (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2536–43.
39. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Zika virus (ZIKV) Surveillance in the Americas : Interim guidance for laboratory detection and diagnosis. 1–4 (2015). at <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11599&Itemid=41691&lang=es>
40. Cardoso, C. W. *et al.* (2015). Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses, Salvador, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 2274–6.
41. Villamil-Gómez, W. E., González-Camargo, O., Rodríguez-Ayubi, J., Zapata-Serpa, D. & Rodríguez-Morales, A. J. Dengue, chikungunya and Zika co-infection in a patient from Colombia. *J. Infect. Public Health* (2016). doi:10.1016/j.jiph.2015.12.002
42. OPS/OMS. OPS OMS | Países y territorios que notificaron transmisión autóctona en la Región de las Américas en 2015-2016. (2016). at <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11603&Itemid=41696&lang=es>
43. Presidencia de la República de Costa Rica. Primer caso importado de Zika en Costa Rica – Presidencia de la República de Costa Rica. *Comun. Prensa* (2016). at <<http://presidencia.go.cr/prensa/comunicados/primer-caso-importado-de-zika-en-costa-rica/>>
44. Calderón-Arguedas, Ó., Avendaño, A., López-Sánchez, W. & Troyo, A. (2010). Expansion of *Aedes albopictus* skull in Costa Rica. *Rev Ibero-Latinoam Parasitol* **69**, 220–222.
45. Fauci, A. S. & Morens, D. M. (2016). Zika Virus in the Americas - Yet Another Arbovirus Threat. *N. Engl. J. Med.* doi:10.1056/NEJMp1600297

Zika: sobre microcefalia y Guillain-Barré

Zika: microcephaly and Guillain-Barre

Eugenia Corrales-Aguilar¹

Resumen:

Desde finales del año 2015, el virus del Zika se ha asociado con la aparición de infecciones congénitas que causan microcefalia y con trastornos neurológicos tipo Guillain-Barré en adultos. Un gran número de noticias en la prensa nacional e internacional han reportado en los últimos dos meses sobre esta problemática. En el mes de marzo del 2016, surgieron varios estudios científicos que indican una posible causalidad más allá de la pura especulación mediática. Esta revisión explicará estos estudios y enunciará las incógnitas aún presentes sobre este virus.

Palabras clave: Zika, microcefalia, Guillain-Barré

Abstract:

At the end of 2015, Zika virus was associated with congenital infections causing microcephaly and with neurological disorders like Guillain Barre syndrome in adults. A large number of news in national and international press media have reported about this issue. During the month of March in 2016, some scientific studies have been published which relate from a possible causation beyond mere media speculation. Here some of this new information will be discussed and several open questions about this virus will be mentioned.

Key words: Zika, microcephaly, Guillain Barre

Un reciente estudio, publicado en la revista *Lancet* el 15 de marzo de este año, reporta la observación de un aumento en defectos congénitos producto del brote epidémico causado por el virus zika en los territorios de la Polinesia francesa en el brote del 2013-2014 ⁽¹⁾, lo que refuerza la relación que se le ha otorgado a este virus en los problemas médicos en infantes reportados en Suramérica ^(2,3). Los médicos de la Polinesia francesa no detectaron en aquel momento el aumento en defectos congénitos durante el brote; pero tras los reportes observados en otras naciones como Brasil, donde se indicó un aumento dramático en casos de microcefalia ^(2,3), decidieron revisar nuevamente los expedientes médicos de las mujeres que estuvieron embarazadas durante el pico por el virus del Zika. El grupo investigador encontró que ocho fetos en la Polinesia francesa fueron diagnosticados con microcefalia seguido del problema de infecciones por el este virus ⁽¹⁾. El aborto fue reportado en cinco embarazos, sin embargo, no se indica si fueron abortos espontáneos o muerte fetal (feto con más de 20 semanas de gestación). Durante esta epidemia del 2013-2014, dos tercios de la población total

de la Polinesia francesa estuvieron infectados. Según nuevos datos obtenidos con modelaje matemático tras estos estudios, se calculó que un 1% de los fetos de mujeres que fueron infectadas por el virus del Zika, durante el embarazo, resultaron con la condición de microcefalia. Aparentemente, estas infecciones se dieron durante el primer trimestre del embarazo. Esta tasa es 50 veces mayor que la observada anualmente acerca de la aparición de casos de microcefalia en la Polinesia francesa. La tasa normal de microcefalia se estima que es de 2 a 12 casos por 10 000 embarazadas. Interesantemente, la tasa de microcefalia reportada en este estudio refleja un estimado de 95 casos de microcefalia por 10 000 embarazadas infectadas durante el primer trimestre ⁽¹⁾. Este estudio ha sido criticado por el hecho de que se realizó analizando expedientes médicos y no estudiando directamente los productos del nacimiento, abortos o muertes fetales.

Aún así, esta tasa que se observó en la Polinesia francesa aparentemente es menor a la observada en Pernambuco, estado brasileño donde se han reportado la mayor cantidad de casos de microcefalia ^(4,5). Esta área reporta una tasa

Artículo recibido el 23/03/2016, aceptado para su publicación el 25/03/2016
I. Sección de Virología, Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica
Correspondencia: eugenia.corrales@ucr.ac.cr

del 2% de recién nacidos sospechosos de microcefalia nacidos de cualquier mujer embarazada, sea positiva o negativa por el virus del Zika ⁽⁶⁾. Las autoridades de salud brasileñas están actualmente investigando a fondo el gran número de casos sospechosos reportados solo en esta área y han descartado una gran parte de ellos, por lo que los datos reales de casos de microcefalia confirmados causados por la infección de este virus en Brasil no se ha confirmado aún⁽⁷⁾.

Sin embargo, otro estudio publicado en el *New England Journal of Medicine* a principios de marzo por investigadores brasileños, observó también un alto número de malformaciones congénitas en embarazadas ⁽⁸⁾. En este estudio, se detectaron anomalías por medio de exámenes de ultrasonido en 29% de fetos de madres infectadas por zika. Ocho de 88 mujeres con zika durante el estudio parieron, y uno de los fetos nació con microcefalia. Obviamente, los investigadores planean seguir médicamente al resto de las mujeres durante el embarazo y tras el nacimiento de sus hijos o hijas para evaluar los riesgos de defectos congénitos.

Un tema interesante es que la tasa de defectos congénitos relacionados al zika, ya sea en la Polinesia francesa o en Brasil, es mucho más baja que la comparada a otros virus que ya son ampliamente conocidos como causantes de enfermedades y malformaciones congénitas ^(1,6); por ejemplo, el 13% de bebés infectados prenatalmente con el citomegalovirus -un virus de la familia Herpesviridae- nacen con defectos y malformaciones, principalmente con sordera. El porcentaje de bebés que nacen con defectos causados por una infección prenatal con rubéola -un virus inmunoprevenible de la familia Togaviridae- va desde el 38% al 100% ^(1,6).

Uno de los problemas del estudio de la Polinesia francesa es que los investigadores pudieron pasar por alto ciertos defectos en los fetos relacionados a zika. Esto por el tipo de investigación que hicieron: se basaron en madres sintomáticas infectadas por zika que tuvieron bebés con malformaciones congénitas. Probablemente, se perdieron casos en aquellas madres que no manifestaron síntomas y que no fueron diagnosticadas con esta virosis, pero que sus bebés hayan tenido alguna malformación o defecto congénito. Esta es una gran interrogante, si se asume que el 80% de las infecciones por el virus del Zika cursan asintomáticas y que aquellas que presentan síntomas -estos pueden ser leves- lo que podría implicar no visitar al médico u obstetra.

Investigadores en Brasil y en Colombia están realizando, en este momento, un estudio longitudinal de las mujeres embarazadas con o sin zika para poder responder estas interrogantes y determinar si el virus es responsable de las malformaciones o si es una mezcla de condiciones (no

todas necesariamente infecciosas), también ambientales y sociales como por ejemplo pobreza y desnutrición ^(2,8). Con este tipo de estudio, se podrá determinar si niños y niñas nacidos de madres positivas por el virus del Zika tienen una mayor probabilidad de desarrollar problemas congénitos como la microcefalia. Además, se podrá determinar si el grado de replicación viral (carga viral) también sea un factor importante en el desarrollo de la microcefalia.

Evidencia de la presencia del virus ha sido reportada, no solo en el líquido amniótico de las mujeres embarazadas cuyos fetos fueron diagnosticados con microcefalia ⁽⁹⁾, sino también en el tejido cerebral de un producto de aborto con malformaciones observadas en exámenes de ultrasonido ⁽¹⁰⁾. Pero aún no se ha descrito cómo el virus puede estar causando el daño al feto. Un estudio trató de responder esta pregunta usando células progenitoras pluripotenciales diferenciándolas a células cerebrales inmaduras (llamadas células progenitoras neurales corticales) e inoculándolas con una cepa de laboratorio del zika ⁽¹¹⁾. El virus indujo infección en el 85% de las células 72 horas posinoculación. El virus se replicó efectivamente en estas células y produjo un crecimiento celular retardado e interrumpió los procesos normales de división celular. Esto podría contribuir a los efectos observados que resultan en microcefalia. Otro grupo de investigadores utilizaron células pluripotenciales y las diferenciaron a células neurales en formas de neuroesferas, una estructura tridimensional que semeja a un cerebro ⁽¹²⁾. Cuando infectaron estas estructuras con un virus zika aislado de un paciente en Brasil, el virus produjo la muerte de las células y las estructuras resultaron con un tamaño inferior al control sin infectar. Estos dos estudios indican, *in vitro*, que la depleción de este tipo de células progenitoras neurales podría resultar en un menor número de neuronas. Por otro lado, otra incógnita sobre el virus es cómo llega el virus al feto, si infecta la placenta y esto causa el daño al feto o si cruza la placenta e infecta directamente al feto y le causa el daño ⁽¹³⁾.

Con respecto a los desórdenes neurológicos, un nuevo estudio apoya un hallazgo ya reportado previamente durante el brote epidémico de la Polinesia francesa del 2013-2014: la relación de la infección por el virus del Zika y el síndrome de Guillain-Barré (GBS) ⁽¹⁴⁾. En ese brote, 32 000 casos sospechosos de zika resultaron en un aumento marcado en casos de GBS. En ese momento, se reportaron 42 casos de este síndrome, que se caracteriza por una parálisis motora. El 98% de los pacientes con GBS presentaban anticuerpos contra el virus del Zika, lo que sugería que habían sido infectados por el virus previamente. Esto lo compararon con un 56% de sujetos que presentaban anticuerpos contra el zika, pero no tenían GBS (grupo control). Adicionalmente, el 88% de

los sujetos desarrollaron síntomas típicos de la fiebre producida por el zika, generalmente una semana antes de desarrollar GBS.

Actualmente se ha descrito también un aumento en casos de GBS en otras áreas geográficas afectadas por el virus del Zika. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó el viernes 17 de marzo que ocho países o territorios han observado este incremento en GBS desde el 2015 ⁽¹⁵⁾. Aquí se incluyen países como Colombia, Puerto Rico y Venezuela, donde hay evidencia de laboratorio de la infección por el virus del Zika en pacientes que desarrollaron posteriormente GBS. Aún así, es muy poco común desarrollar este síndrome. Normalmente, por ejemplo, en Estados Unidos se reporta una tasa de GBS de 1 en 100 000 habitantes, causado por distintas infecciones bacterianas (por ejemplo *Campylobacter*) o virales (influenza, epstein barr, herpes, dengue, chikungunya, virus del oeste del Nilo) ^(16,17). Se estima que una en 4 000 personas infectadas por el virus del Zika pueden desarrollar GBS ⁽¹⁷⁾. Aquí nuevamente se cuestiona si la aparición de síntomas por la infección viral determina el desarrollo de GBS, en otras palabras, ¿qué sucede con los asintomáticos?

El GBS es un desorden autoinmune. Esto ocurre cuando el sistema inmune reacciona contra patógenos bacterianos o virales desencadenando una respuesta inmune que accidentalmente también reconoce y ataca componentes del sistema nervioso ⁽¹⁸⁾. La enfermedad afecta típicamente el axón, que es la parte de los nervios periféricos que transmite las señales nerviosas, o la capa de mielina que recubre el axón. El resultado es que los pacientes, en el transcurso de semanas, sufren adormecimiento temporal de las piernas, luego un debilitamiento de extremidades inferiores y superiores, que en algunos casos culmina en la imposibilidad de uso de los músculos (parálisis). En general, la recuperación puede tardar de semanas a años, con un 30% de pacientes que aún reportan debilidad muscular tres años después del inicio del cuadro ⁽¹⁸⁾. En los casos reportados de la Polinesia francesa, 74% de los pacientes reportaron debilidad muscular, 64% presentaban debilidad en los músculos faciales y 29% necesitaron apoyo médico para respirar ⁽¹⁴⁾. Esta complicación es la que podría terminar en muerte, aunque en la Polinesia francesa no se reportó ningún fallecido por GBS. Hay tratamiento que puede reducir los síntomas, ayudar a la recuperación y evitar complicaciones posteriores, y a pesar de que actualmente no hay tratamiento contra el virus zika, probablemente al controlar el virus por medio de eliminación de transmisión por vectores o por una vacuna eficiente, se logre también disminuir los casos de GBS causados por este virus.

En conclusión, en el transcurso de los próximos años, nueva información científica, clínica y virológica ayudará

a comprender mejor la infección por el virus zika y sus consecuencias, ya sea en el feto o en adultos. Por ahora, lo importante es evitar la diseminación del virus en nuestro país tomando medidas efectivas para evitar la transmisión.

Referencias

1. Cauchemez, S. *et al.* (2016). Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. *Lancet*. doi:10.1016/S0140-6736(16)00651-6
2. Villamil-Gómez, W. E. *et al.* (2016). Diagnosis, Management and Follow-up of Pregnant Women with Zika virus infection: A preliminary report of the ZIKERNCOL cohort study on Sincelejo, Colombia. *Travel Med. Infect. Dis.* doi:10.1016/j.tmaid.2016.02.004
3. Schuler-Faccini, L. *et al.* (2016). Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65, 59–62.
4. Oliveira Melo, A. S. *et al.* (2016). Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 47, 6–7.
5. Tetro, J. A. (2016). Zika and microcephaly: causation, correlation, or coincidence? *Microbes Infect.* doi:10.1016/j.micinf.2015.12.010
6. Rodrigues, L. C. Microcephaly and Zika virus infection. (2016). *Lancet (London, England)*. doi:10.1016/S0140-6736(16)00742-X
7. Ministério da Saúde, Brasil, Potal da saúde, Boletim Epidemiológico - Volume 47 - nº 08 - 2016 en <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-zika>, Consultado el 22 de Marzo de 2016.
8. Brasil, P. *et al.* (2016). Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro - Preliminary Report. *N. Engl. J. Med.* doi:10.1056/NEJMoa1602412
9. Calvet, G. *et al.* (2016). Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect. Dis.* doi:10.1016/S1473-3099(16)00095-5
10. Mlakar, J. *et al.* (2016). Zika Virus Associated with Microcephaly. *N. Engl. J. Med.* 374, 951–8.
11. Tang, H. *et al.* (2016). Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell*. doi:10.1016/j.stem.2016.02.016
12. Garcez, P. P. *et al.* (2016). Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *PeerJ Prepr.* 4:e1817v1
13. Adibi, J. J., Marques, E. T. A., Cartus, A. & Beigi, R. H. (2016). Teratogenic effects of the Zika virus and the role of the placenta. *Lancet*. doi:10.1016/S0140-6736(16)00650-4
14. Cao-Lormeau, V.-M. *et al.* (2016). Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*. doi:10.1016/S0140-6736(16)00562-6
15. WHO, Zika situation report 17 March 2016, en (<http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/17-march-2016/en/>) Consultado el 22 de Marzo de 2016
16. Smith, D. W. & Mackenzie, J. (2016). Zika virus and Guillain-Barré syndrome: another viral cause to add to the list. *Lancet*. doi:10.1016/S0140-6736(16)00564-X
17. Malkki, H. (2016). CNS infections: Zika virus infection could trigger Guillain-Barré syndrome. *Nat. Rev. Neurol.* doi:10.1038/nrneurol.2016.30
18. Hughes, R. A. C. & Cornblath, D. R. (2015). Guillain-Barré syndrome. *Lancet (London, England)* 366, 1653–66. 

El efecto de los reguladores epigenéticos sobre la remodelación de la cromatina

The effect of epigenetic regulators on chromatin remodeling

Kevin Leandro-Sandi¹

Resumen:

Una miriada de investigaciones ha demostrado, en las últimas décadas, el rol fundamental de la epigenética en la embriogénesis, la diferenciación celular y en la homeostasis. Las huellas epigenéticas son marcas mitóticamente heredables capaces de moldear la cromatina, lo cual genera y mantiene diversidad fenotípica a partir de células que comparten el mismo material genético. Existe una gama de complejos proteicos y de ARN no codificantes que actúan de manera coordinada para esculpirla en estados de represión transcripcional (heterocromatina) y de activación transcripcional (eucromatina). Los reguladores epigenéticos pueden clasificarse como escritores: metiltransferasas de ADN (DNMTs), metiltransferasas de histonas (HMTs), acetiltransferasas de histonas (HATs), enzimas TET, entre otros; como borradores: desmetilasas de histonas (HDMs), desacetilasas de histonas (HDAC); así como lectores y remodeladores de la cromatina: complejos de activación TrxG y complejos de activación Polycomb. Los ARN no codificantes largos (ARNlnc) funcionan como moléculas de andamiaje de macrocomplejos proteicos, mientras que los ARN de interacción con proteínas PIWI (piARN) se asocian con heterocromatina y silenciamiento de transposones.

Palabras clave: Epigenética, eucromatina, heterocromatina, nucleosoma, regulador epigenético, escritor de cromatina, borrador de cromatina, lector de cromatina, remodelador de cromatina, ARN no codificante.

Abstract:

In the last decades, a myriad of research has demonstrated the paramount role of epigenetics in embryogenesis, cellular differentiation, and homeostasis. Epigenetic prints are mitotically heritable marks capable of molding the chromatin, which in turn generates and maintains phenotypic diversity, starting from cells that hold the same genetic makeup. A broad spectrum of protein complexes and non-coding RNAs act in a coordinated fashion to sculpt the chromatin in either a transcriptionally permissive state (euchromatin) or a transcriptionally repressive state (heterochromatin). Epigenetic regulators may be classified as writers (DNA methyltransferases, DNMTs; histone methyltransferases, HMTs; histone acetyltransferases, HATs; TET enzymes, etc), erasers (histone demethylases, HDMs; histone deacetylases, HDACs), as well as readers and chromatin remodelers (TrxG activating complexes, Polycomb repressive complexes). Long non-coding RNAs (lncRNAs) serve as scaffolding molecules for protein macro-complexes, whereas PIWI-protein interacting RNAs (piRNAs) are associated with heterochromatin states and transposon silencing.

Key words: euchromatin, heterochromatin, nucleosome, epigenetic regulator, chromatin writer, chromatin eraser, chromatin reader, chromatin remodeler, non-coding RNA.

Artículo recibido el 06/03/2016, aceptado para su publicación el 16/03/2016.

1. Laboratorio Clínico, Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera, CCSS

Correspondencia: kevin_leandro@yahoo.com

Introducción

En 1942, el biólogo del desarrollo Harry Waddington acuñó formalmente el término “epigenética” y lo definió como una rama de la biología que examinaba las interacciones causales entre los genes y sus productos, y que generaban un fenotipo. Durante las décadas siguientes, se acumuló evidencia que reconocía su importancia en procesos como la embriogénesis, la impronta genética, la inactivación del cromosoma X y la diferenciación celular ⁽¹⁾. Bajo los paradigmas actuales, la epigenética se podría definir, brevemente, como la disciplina que estudia los eventos que le permiten a las células codificar y heredar mitóticamente estados estructurales y funcionales de la cromatina, sin modificar la secuencia del ADN ^(2,3). Entre los reguladores epigenéticos puede mencionarse las proteínas que actúan directamente a nivel del ADN y que controlan la metilación de este sustrato, mientras que otras moléculas, como los ARN largos no codificantes (ARNlnc), actúan como moléculas adaptadoras y de andamiaje. Existen reguladores epigenéticos capaces de *escribir* o *borrar* modificaciones postraduccionales de histonas, mientras que otros *leen* estas modificaciones y reclutan complejos que *remodelan* la disposición espacial de los nucleosomas ⁽⁴⁾. La acción coordinada de estos actores incide directamente en el balance de la eucromatina, una porción rica en genes transcritos y de bajo empaquetamiento, y la heterocromatina, asociada a marcas represivas y a un alto empaquetamiento de los nucleosomas. La sucesión ordenada y coherente de eventos (epi)genéticos posibilita el compromiso de linaje, la maduración, diferenciación y plasticidad celular, y regula la respuesta a estímulos externos ⁽⁵⁾.

La introducción de plataformas de secuenciación de nueva generación (NGS) en 2006, abrió los horizontes para el estudio a gran escala de modificaciones de histonas por inmunoprecipitación seguida de secuenciación (ChIP-seq), y la caracterización del metiloma por medio de secuenciación con bisulfito. Actualmente, el Consorcio Internacional del Epigenoma Humano (IHEC) coordina los esfuerzos internacionales para mapear el epigenoma ^(6,7).

A pesar de que esta rama del conocimiento acumula ya varias décadas de hallazgos cruciales para la biología celular, en nuestro gremio prevalece un gran desconocimiento sobre la temática, lo cual hace necesaria una mayor divulgación a nivel académico y profesional. En la presente revisión, se introducen los conceptos básicos sobre epigenética. Además, se menciona el papel de los escritores, lectores, borradores y remodeladores de la cromatina más conocidos hasta el momento. En una segunda entrega, se dará un vistazo a una serie de anomalías epigenéticas que se observan

con frecuencia en el cáncer, y se hará un recorrido por los descubrimientos más actualizados de la epigenética de la leucemia linfoblástica aguda T, una neoplasia agresiva cuyo componente epigenético jugaría un rol preponderante en su patobiología y que amerita una mirada más cercana.

1.1 Arquitectura normal de la cromatina: niveles de organización

La unidad básica de organización de la cromatina es el nucleosoma. Este octámero posee dos subunidades de cada una de las siguientes histonas “core”: H2A, H2B, H3 y H4, alrededor de las cuales se enrollan aproximadamente 147 pares de nucleótidos de la doble hebra de ADN ⁽⁸⁾. La histona H1, también conocida como “linker”, se ubica entre nucleosomas y permite el andamiaje de los anteriores en una hebra de 10-11 nm, conocida como “cuentas en una cuerda”. El siguiente nivel de organización compacta aún más la cromatina en una fibra de 30 nm: el solenoide. Durante la reproducción celular, los cromosomas alcanzan un grado máximo de condensación. La cromatina se enrolla alrededor de proteínas de andamiaje y forma cromonemas de 200-300 nm, los cuales se organizan, durante la mitosis, en cromátidas de unos 700 nm ^(8,9).

Como se profundizará más adelante, las histonas “core” poseen un dominio estructural y colas C- y N-terminales, las cuales permiten la estabilización de su unión al ADN y son blancos de modificaciones postraduccionales (metilación, acetilación, ubiquitinación, sumoylación, fosforilación, etc.) que modifican la interacción de la cromatina con proteínas lectoras, factores de transcripción y complejos enzimáticos que “escriben” o “borran” dichas marcas ⁽¹⁰⁾. Los cambios en las histonas y el ADN esculpen la arquitectura de la eucromatina y heterocromatina y generan perfiles de transcripción y silenciamiento de genes, lo cual posibilita la existencia de diversidad fenotípica a partir de células que albergan el mismo material genético ⁽¹¹⁾.

1.2 Remodelación de cromatina

1.2.1 Marcas epigenéticas a nivel de ADN

1.2.1.1 Metilación de ADN, islas CpG

La metilación del ADN, ejecutada por metiltransferasas de ADN (DNMTs), comprende la adición de un grupo metilo en la posición C5 de la citosina (5mC). Generalmente, en células somáticas de mamíferos, dicha adición covalente se presenta en el contexto de un dinucleótido CpG, en donde ambos residuos de citosina (uno en cada hebra de ADN) poseen la marca epigenética ⁽¹²⁾.

La metilación del ADN cumple varios propósitos en la célula, los cuales dependen de la región del genoma en la que se ubica y de la interacción dinámica con otras marcas epigenéticas que modelan la cromatina⁽¹³⁾. Las islas CpG son, quizás, el caso más conocido de metilación de ADN. Se trata de secuencias de al menos 500 pb y más de 55% de contenido CG⁽¹⁴⁾. Se ubican en regiones promotoras de la mayoría de genes constitutivos (*housekeeping genes*) y algunos genes que controlan el desarrollo y otros específicos de tejido⁽¹⁵⁾. En condiciones normales, se las encuentra desmetiladas, aunque las regiones 2 kb corriente arriba y corriente abajo, de menor contenido de CpG y conocidas como “orillas CpG” (*CpG shores*), adquieren la marca en genes autosómicos. La metilación de las islas CpG tiene como resultado el silenciamiento del gen⁽¹⁶⁾.

En contraste con lo anterior, los *cuerpos* de genes transcritos activamente poseen una mayor densidad de residuos de citosina metilados. En este contexto, la metilación de ADN podría jugar un rol importante en el *splicing* y en potenciar la elongación del ARN⁽¹³⁾. Además, en las regiones intergénicas ricas en secuencias repetidas, la metilación del ADN parece tener relevancia en conservar la estabilidad genómica, pues evita la transcripción y transposición de dichos elementos repetitivos^(3,12). La metilación de ADN actúa de manera cooperativa con ARNinc y con otros modificadores epigenéticos, tales como el complejo represor Polycomb 2 (PRC2), para silenciar genes y esculpir la heterocromatina. Además, interviene en mecanismos como la impronta genética o la inactivación del cromosoma X mediada por el ARNinc *Xist*^(17,18).

Existen tres metiltransferasas de ADN de importancia: DNMT1, DNMT3A y DNMT3B. La primera permite la transferencia mitótica de las marcas de metilación de ADN de la célula madre a las células hijas. DNMT1 añade el grupo metilo en C5 a la hebra de ADN recién sintetizada; es decir, su actividad se concentra en CpG hemimetilados^(6,8,14). DNMT3A juega un rol fundamental en la metilación *de novo* y además mantiene la integridad de los cañones de metilación. Estos últimos comprenden regiones largas de ADN (> 3.5 kb) con baja densidad de 5mC y que están circundadas por orillas enriquecidas de 5-hidroximetilcitosina (5hmC; ver más adelante apartado sobre proteínas TET y 5hmC)^(19,20). La expresión de los genes de cañones parece estar regida por las marcas H3K4me3 (trimetilación del residuo de lisina en la posición 4 de la histona H3) y H3K27me3, que llevan a activación y represión de la expresión, respectivamente, o a un estado “cebado” o listo (*poised*), si ambas marcas epigenéticas coexisten⁽²¹⁾. Se sabe que

los genes ubicados en los cañones de metilación suelen actuar como reguladores en el desarrollo, como aquellos que codifican por factores de transcripción. De manera importante, se ha constatado que entre los cañones más grandes se encuentra el que alberga el gen *HOXA9*, que suele estar desregulado en la leucemia linfoblástica aguda T (LLA-T)⁽²⁰⁾.

1.2.1.2 Hidroximetilación de residuos de citosina

La familia de proteínas TET posee la facultad de catalizar la oxidación iterativa de 5-metilcitosina (5mC) en 5-hidroximetilcitosina (5hmC)⁽²²⁾. Se postula que dicha modificación del ADN impide el reconocimiento de complejos proteicos encargados de bloquear la transcripción. Como consecuencia, las proteínas TET se asocian con una activación de la expresión génica. La densidad de 5hmC es alta en *enhancers* y cuerpos de genes transcritos activamente⁽²³⁾. Además, se cree que el paso de 5mC a 5hmC resulta crucial para la desmetilación activa y pasiva del ADN. De hecho, DNMT1, a diferencia de su alta afinidad por ADN hemimetilado, posee una baja actividad enzimática en ADN hemihidroximetilado, lo cual contribuye a la “dilución” en la densidad de 5mC en las células hijas después de la mitosis⁽²²⁾.

1.2.2 Marcas epigenéticas a nivel de histonas

La modificación coordinada de las histonas y los cambios estructurales en la cromatina representan dos eventos fundamentales que explican la regulación temporal y específica de linaje celular de la transcripción génica⁽²⁴⁾. A continuación se resumen algunas de las modificaciones más importantes a nivel de histonas.

1.2.2.1 Metilación y desmetilación de histonas

La metilación de residuos de lisina (K) y arginina (R) es un evento postraducciona que, a diferencia de la acetilación, no altera la carga neta de la histona. Dependiendo de su localización, se asocia con activación de la transcripción o con su represión. Así pues, el papel que juega esta modificación en el balance de la cromatina parece depender del contexto en el que se encuentra y de los complejos proteicos lectores que la reconocen⁽¹⁰⁾. En humanos existen al menos 60 metiltransferasas de histonas, las cuales exhiben un alto grado de homología y son capaces de metilar otras proteínas diferentes de histonas⁽²⁵⁾. Hoy en día, se sabe de 5 metilaciones de lisina en colas de histonas que son altamente recurrentes (H3K4, H3K9, H3K27, H3K36 y H4K20), así como de otra en el núcleo proteico de la histona 3 (H3K79)⁽²⁶⁾. Para más detalles, ver el cuadro 1.

Cuadro 1. Metilaciones frecuentes de histonas y su rol en la regulación epigenética

Metilaciones	Enzima(s)*	Función/efecto de la metilación	Referencia
H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3	MLL1 y MLL2	Activación transcripcional. H3K4me3 es marcador por excelencia en regiones promotoras y su densidad es inversamente proporcional a metilación del ADN (e. g. islas CpG)	(12)
H3K9me1, H3K9me2, H3K9me3	SUV39H1 y SUV39H2	Represión transcripcional en regiones pobres en genes (telómeros y pericentrómeros). Asociada a secuencias repetitivas	(28)
H3K79me1, H3K79me2, H3K79me3	DOT1L	Activación transcripcional, regulación del ciclo celular, wdesarrollo embrionario y hematopoyesis	(25)
H3K36me1, H3K36me2, H3K36me3	SETD2	Participa en la reparación de cortes en la doble hebra del ADN	(29)
H3K27me3	EZH2 (parte del PRC2)	Represión transcripcional. Asociada a metilación del ADN y heterocromatina en regiones con alta densidad génica y ricas en CpG	(2)

*Listado no exhaustivo. Menciona las enzimas más emblemáticas o frecuentemente mencionadas en la literatura.

La desmetilación de histonas es ejecutada por proteínas de las familias LSD (*lysine-specific histone demethylase*) o MjC (Jumonji C). La primera de estas proteínas, LSD1, fue descrita en 2004. Las LSD son capaces de remover el grupo -CH₃ en histonas mono- y dimetiladas, pero son incapaces de realizarlo en histonas trimetiladas. Las desmetilasas MjC tienen actividad en histonas mono-, di- y trimetiladas ⁽²⁷⁾.

1.2.2 2 Acetilación y desacetilación de histonas

La acetilación del grupo ε-amino de los residuos de lisina tiene como efecto neto la neutralización de la carga positiva de este aminoácido. Se ha propuesto, por ende, que la disminución en la carga positiva debilita la unión de la histona con el ADN, separándola de él, y favorece la accesibilidad de la maquinaria de transcripción ⁽³⁰⁾. Las encargadas de esta modificación covalente son las acetiltransferasas de histonas (HAT), mientras que la remoción del grupo acetilo es ejecutado por las desacetilasas de histonas (HDAC) ⁽³¹⁾. Las HAT también pueden acetilar factores de transcripción (FT), lo cual favorece su unión al ADN, interacción con otros FT y resistencia a la degradación proteolítica. Estas enzimas actúan también como proteínas de andamiaje, y posibilitan el ensamblaje de complejos de activación de la transcripción en la vecindad de los promotores de genes ⁽³²⁾.

Las desacetilasas, como puede esperarse, se asocian con condensación y empaquetamiento de la cromatina y represión de la transcripción. Algunas también poseen la facultad de desacetilar FT y desalojar HAT, en asociación con complejos de represión ⁽³²⁾.

1.2.2.3 Ubiquitinación de histonas y otras modificaciones

Aún cuando se han descrito más de 100 posibles modificaciones de histonas, existen patrones discretos y de alta frecuencia que contribuyen a modular las interacciones del ADN con el nucleosoma, su posicionamiento y recambio ⁽³³⁾. Entre ellas se encuentran la ubiquitinación y sumoylación. La adición de estos dos polipéptidos grandes (76 aa y ca. 100 aa, respectivamente) acarrear efectos dependientes del contexto en que se imprimen. Por ejemplo, H2BK123ub1 promueve la elongación de la transcripción en cuerpos génicos, mientras que en los promotores ayuda al reensamblaje de la cromatina para establecer una arquitectura de silenciamiento. La sumoylación se asocia con un estado de represión transcripcional, a través de un mecanismo poco entendido. Otro ejemplo es la ADP-ribosilación, que debilita la interacción del nucleosoma con el ADN, favorece el desalojo de nucleosomas y parece tener importancia durante la respuesta de choque térmico ⁽³⁴⁾. La fosforilación de histonas posee un efecto similar y parece contribuir al relajamiento de la cromatina cuando existen

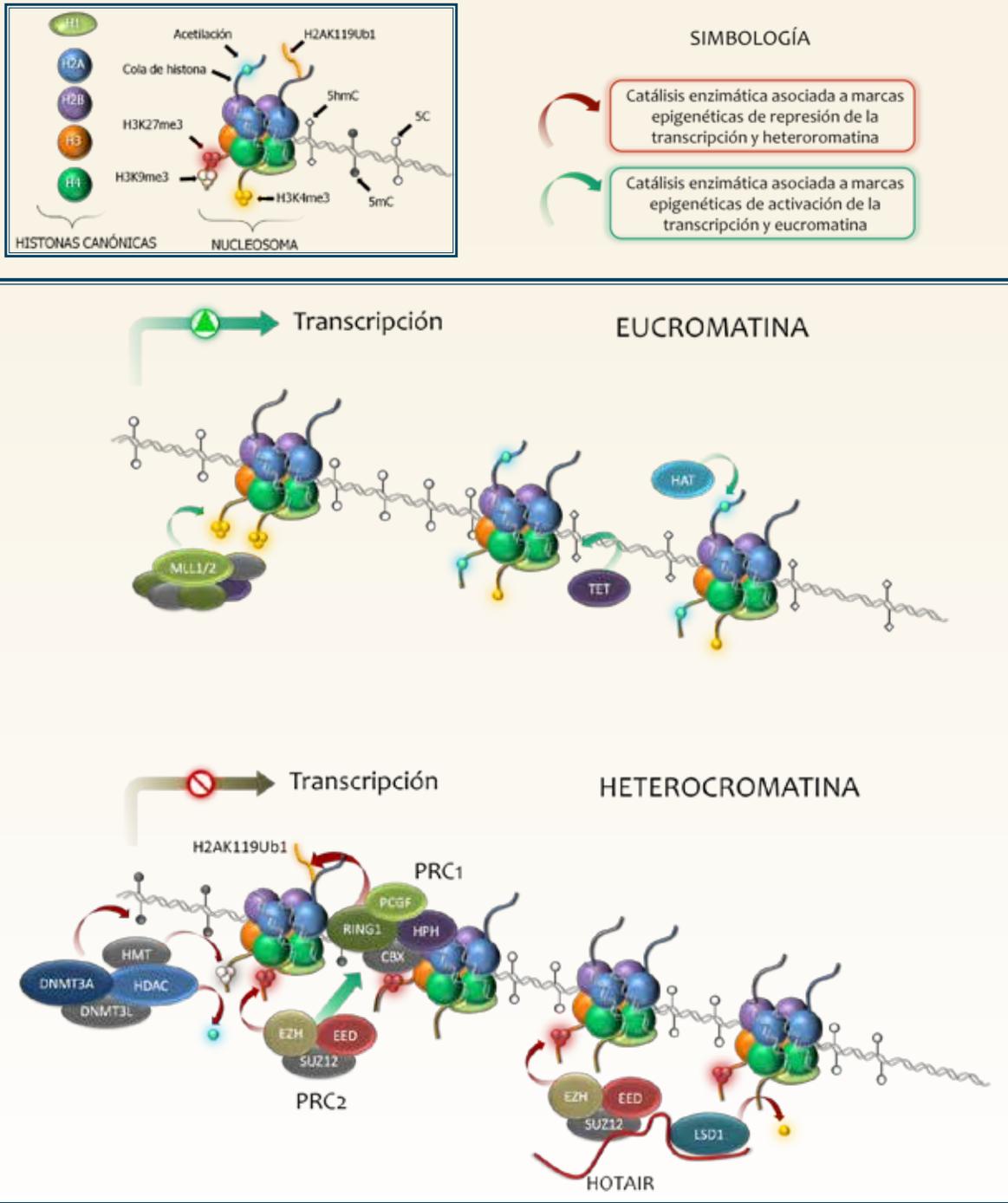


Figura 1. Arriba: el nucleosoma como unidad estructural de la cromatina. Se muestran las histonas canónicas que lo conforman y la simbología asignada a las marcas postraduccionales que se muestran más abajo. En el medio se observan marcas epigenéticas asociadas a la eucromatina, una región rica en genes activamente transcritos. Obsérvese que los nucleosomas se encuentran espacialmente más distantes unos de otros en comparación con el paisaje que forma la heterocromatina. Las islas CpG en promotores se encuentran desmetiladas, mientras que los cuerpos génicos de los genes activamente transcritos suelen poseer una densidad alta de 5hmC, gracias a la acción de proteínas TET. Los complejos TrxG que poseen MLL colocan la marca H3K4me3 en promotores, mientras que las HATs acetilan las colas de histonas. Abajo: se muestran modificaciones frecuentes en la heterocromatina, que exhibe un mayor empaquetamiento de los cromosomas, metilación de las islas CpG, baja densidad de 5hmC en cuerpos génicos, la presencia de las marcas represiva H3K9me3 y de H3K27me3, colocada esta última por PRC2, ubiquitinación de H2AK119Ub por PRC1. Se muestra además el ARNlnc HOTAIR como una molécula de andamiaje que colocaliza a PRC2 y la desmetilasa LSD1. Se sugiere al lector recurrir a esta figura al avanzar a través de la revisión, con el fin de visualizar los contenidos cubiertos en cada apartado.

daños en la doble banda de ADN, lo cual facilitaría el acceso de la maquinaria de reparación. La fosforilación de la histona no canónica H2A.X (γ H2A.X) es un evento bien conocido de este fenómeno ⁽³⁵⁾.

1.2.2.4 Variantes de histonas

Las variantes de histonas, también conocidas como histonas “no canónicas”, son sustitutas codificadas por genes distintos a aquellos que originan las histonas H2A, H2B, H3 y H4, y difieren de ellas en uno o algunos aminoácidos. Su expresión generalmente es mucho menor que las histonas canónicas, y se las encuentra en contextos específicos que le confieren propiedades estructurales y funcionales distintas al nucleosoma. La incorporación de estas variantes repercute en las modificaciones postranscripcionales de histonas y en el remodelamiento de la cromatina. Algunas variantes son H2A.X, H2A.Z, H3.3 y macroH2A. La primera se encuentra en 1-10% de los nucleosomas de mamíferos. H2A.X jugaría un papel importante en la represión transcripcional extraembriónica en células tronco pluripotentes; además, su fosforilación durante la respuesta de daño al ADN desestabiliza al nucleosoma y permitiría el acceso de la maquinaria de reparación de rupturas en la doble hebra de ADN ⁽³⁶⁾. H2A.Z se encuentra enriquecida en el extremo 5' de genes activos, así como en enhancers. Esta variante desestabiliza y facilita la expulsión del nucleosoma ^(6,37). En mamíferos, el papel de la variante H3.3 permanece esquivo. Algunos autores la han asociado con un estado abierto de la cromatina y regiones activamente transcritas en humanos ^(38,39), y otros lo anotan como un contribuyente en el establecimiento de la heterocromatina durante el desarrollo en murinos ⁽⁴⁰⁾. Tales hallazgos contradictorios podrían sugerir que H3.3 se deposita de manera diferente en células tronco y en células comprometidas, o que su papel diverge entre diferentes especies. Por último, la histona macroH2A se ha asociado con un estado de compactación de la cromatina, y se encuentra enriquecida en el cromosoma X inactivo ⁽¹⁷⁾.

1.2.3 Cromatina bivalente

En regiones del genoma con papeles preponderantes en la conservación de la pluripotencialidad y la diferenciación, coexisten la marca de activación H3K4me3 y la marca de represión de la transcripción H3K27me3, lo cual le permite a la célula encender rápidamente genes silentes que están involucrados en el desarrollo y compromiso de linaje ⁽⁴¹⁾. Como es de esperar, este tipo de cromatina se ha descrito con mayor detalle en células embrionarias. Al madurar, las células comprometidas pierden o conservan

dichas marcas en un patrón consistente con la expresión génica propia de su linaje ⁽²⁴⁾.

1.1.4 Complejos de activación TrxG

Los complejos proteicos Trithorax Group (TrxG) actúan como metiltransferasas de histonas y remodeladoras de la cromatina, y permiten mantener un estado transcripcional activo en sus genes diana. En mamíferos, la fracción mayoritaria de la marca H3K4me3, típica de promotores y genes activos, es colocada por TrxG que contienen dominios SET (SET1A/B), mientras que los complejos que poseen los dominios MLL1 y MLL2 son importantes en la activación de genes *HOXA* ⁽⁴²⁾. De manera importante, MLL1 se asocia con MOZ, una HAT de H4K16 y de otros residuos de lisina, lo que posee un efecto aditivo en la activación transcripcional de genes clave en la hematopoyesis ⁽⁴³⁾. Los complejos TrxG que poseen MLL3 y MLL4 se asocian con la desmetilasa de H3K27 UTX, que también coopera en la activación transcripcional al remover la marca de represión impuesta por PRC2 ⁽⁴²⁾.

1.1.5 Complejos de represión Polycomb 1 y 2 (PRC1, PRC2)

Estos conglomerados multiproteicos imprimen marcas de represión transcripcional. Clásicamente, se los ha estudiado como dos complejos que actúan de forma cooperativa y que antagonizan las funciones de las proteínas TrxG ^(42,44). El complejo PRC2 está integrado por EZH (EZH1 o EZH2), EED y SUZ12. EZH coloca la marca de represión H3K27me3, lo cual a su vez atrae a PRC1, quien se une directamente a la cromatina a través de su subunidad chromobox (Cbx). Seguidamente, la proteína RING (RING1a o RING1b), perteneciente a PRC1, deposita la marca H2AK119Ub, la cual antagonizaría la elongación por la ARN Polimerasa II (ver Fig. 1) ^(45,46). En elementos regulatorios de la expresión génica en cis, se ha observado un enriquecimiento en la marca H3K27me3 en promotores CpG reprimidos, lo cual podría funcionar como una suerte de “seguro”, capaz de fijar el silenciamiento del gen. Dichos cambios suelen acompañarse de una disminución en la densidad de acetilaciones de histonas y de las marcas de activación H3K4me1, -me2 y -me3, así como una disminución en la sensibilidad a ADNasas, lo que sugiere un empaquetamiento más compacto del ADN en heterocromatina ⁽⁴⁷⁾.

1.1.6 ARN largos no codificantes (ARNlnc) y ARN de interacción con PIWI (piARN)

Los ARNlnc son transcritos de al menos 200 nt sin capacidad de codificar por proteínas. Como actores del balance epigenético, participan como moléculas

adaptadoras o de andamiaje, lo que les permite aproximar múltiples proteínas remodeladoras de cromatina ⁽⁴⁸⁾. En humanos, el ARNinc *HOTAIR* reúne a PRC2 y a un complejo proteico que contiene a la desmetilasa LSD1. Este ARNinc acerca espacialmente a dos modificadores de histonas que promueven el silenciamiento de la expresión: el *escritor* PRC2, que coloca la modificación H3K27me3, y el *borrador* LSD1, que desmetila a H3K4 ⁽¹⁰⁾. Los ARNinc también poseen un rol fundamental durante la embriogénesis, y participan en la impronta genética y en la inactivación del cromosoma X ^(2,49,50).

Los piARN son ARN pequeños (24-32 nt) no codificantes de cadena sencilla, que forman complejos con proteínas PIWI. Entre sus funciones se encuentra el silenciamiento de transposones y la conservación de las células tronco en los tejidos germinales. Los complejos riboproteicos exhiben tropismo por regiones específicas del genoma, que son complementarias a la secuencia del piARN. El silenciamiento transcripcional es ejecutado por la maquinaria epigenética, que es reclutada en el sitio donde se halla el complejo piARN-PIWI ⁽⁵¹⁾. Ensayos en *Drosophila* han demostrado que piARN-PIWI contribuye a establecer un estado de represión transcripcional de la cromatina, con un aumento en la marca H3K9me3, de la proteína de heterocromatina 1 (HP1) y un decremento en la ocupación de la ARN polimerasa II en el locus de acción del complejo riboproteico ⁽⁵²⁾.

Conclusiones

Como pudo constatarse en las páginas anteriores, la maquinaria epigenética articula procesos finamente coordinados, desempeñados por una plétora de actores que moldean la cromatina y que le permiten a la célula controlar la accesibilidad y expresión diferencial del material genético. Todo ello contribuye a generar una exquisita diversidad fenotípica con una misma secuencia de ADN genómico. La fina sintonización de escritores, lectores, borradores y remodeladores epigenéticos establece un lenguaje que las células heredan mitóticamente a sus células hijas. Como es de esperar, en un balance tan intrincado y delicado, pueden ocurrir desperfectos. En la siguiente entrega, se examinarán algunos de estos trastornos en el contexto del cáncer, y se dará un recorrido más cercano a las alteraciones epigenéticas que se observan en la LLA-T.

Referencias

- Quintero-Ronderos, P., & Montoya-Ortiz, G. (2012). Epigenetics and autoimmune diseases. *Autoimmune Diseases*, 2012, 593720. doi: 10.1155/2012/593720
- Felsenfeld, G. (2014). A brief history of epigenetics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(1), a018200. doi: 10.1101/cshperspect.a018200
- Roy, D. M., Walsh, L., & Chan, T. A. (2014). Driver mutations of cancer epigenomes. *Protein Cell*, 5(4), 265-296. doi: 10.1007/s13238-014-0031-6
- Gillette, T. G., & Hill, J. A. (2015). Readers, Writers, and Erasers. Chromatin as the Whiteboard of Heart Disease. *Circulation Research*, 116, 1245-1253. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303630
- Weishaupt, H., Sigvardsson, M., & Attema, J. L. (2010). Epigenetic chromatin states uniquely define the developmental plasticity of murine hematopoietic stem cells. *Blood*, 115(2), 10.1182/blood-2009-07-235176
- Baylin, S. B. & Jones, P. A. (2011). A decade of exploring the cancer epigenome – biological and translational implications. *Nature Reviews | Cancer*, 11(10), 726-734. doi: 10.1038/nrc3130
- Meissner, A. (2012). What can epigenomics do for you? *Genome Biology*, 13, 420. doi: 10.1186/gb-2012-13-10-420
- Botchkarev, V. A., Gdula, M. R., Mardaryev, A. N., Sharov, A. A. & Fessing, M. Y. (2012). Epigenetic regulation of Gene expression in keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 132, 2505-2521. doi: 10.1038/jid.2012.182
- Hübner, M. R., Eckersley-Maslin, M. A. & Spector, D. L. (2013). Chromatin organization and transcriptional regulation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 23(2), 89-95. doi: 10.1016/j.gde.2012.11.006
- Greer, E. L. & Shi, Y. (2012). Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature Reviews | Genetics*, 13, 343-357. doi:10.1038/nrg3173
- Lohse, B., Helgstrand, C., Kristensen, J. B. L., Leurs, U., Cloos, P. A. C., Kristensen, J. L. & Clausen, R. P. (2013). Posttranslational modifications of the histone 3 tail and their impact on the activity of histone lysine demethylases in vitro. *PLoS ONE*, 8(7), e6753. doi: 10.1371/journal.pone.0067653
- Jin, B., Li, Y. & Robertson, K.D. (2011). DNA methylation: Superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes & Cancer*, 2(6), 607-617. doi: 10.1177/1947601910393957
- Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews | Genetics*, 13(7), 484-492. doi: 10.1038/nrg3230
- Julsing, J. R. & Peters, G. J. (2014). Methylation of DNA repair genes and the efficacy of DNA targeted anticancer treatment. *Oncology Discovery*, 2(1), 3. doi: 10.7243/2052-6199-2-3
- Williams, K., Christensen, J., & Helin, K. (2012). DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO Reports*, 13(1), 28-35. doi: 10.1038/embor.2011.233
- Stirzaker, C., Taberlay, P. C., Statham, A. L., & Clark, S. J. (2014). Mining cancer methylomes: prospects and challenges. *Trends in Genetics*, 30(2), 75-84. doi: 10.1016/j.tig.2013.11.004
- Kelsey, A. D., Yang, C., Leung, D., Minks, J., Dixon-McDougall, T., Baldry, S. E. L., ...Brown, C. J. (2015). Impact of flanking chromosomal sequences on localization and silencing by the human non-coding RNA Xist. *Genome Biology*, 16, 208. doi: 10.1186/s13059-015-0774-2
- Smith, Z. D. & Meissner, A. (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*, 14(3), 204-220. doi: 10.1038/nrg3354
- Ko, M., An, J., & Rao, A. (2015). DNA hypermethylation and hydroxymethylation in hematologic differentiation and transformation. *Current Opinion in Cell Biology*, 37, 91-101. doi: 10.1016/j.ceb.2015.10.009
- Jeong, M., Sun, D., Luo, M., Huang, Y., Challen, G.A., Rodriguez, B., ... Goodell, M.A. (2014). Large conserved domains of low DNA

- methylation maintained by Dnmt3a. *Nature Genetics*, 46(1), 17-23. doi: 10.1038/ng.2836
21. Plongthongkum, N., Diep, D.H. & Zhang, K. (2014). Advances in the profiling of DNA modifications: cytosine methylation and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 15(10), 647-661. doi: 10.1038/nrg3772
 22. Hill, P. W. S., Amouroux, R. & Hajkova, P. (2014). DNA demethylation, Tet proteins and 5-hydroxymethylcytosine in epigenetic reprogramming: An emerging complex story. *Genomics*, 104(5), 324-333. doi: 10.1016/j.ygeno.2014.08.012
 23. Greenblatt, S. M. & Nimer, S. D. (2014). Chromatin modifiers and the promise of epigenetic therapy in acute leukemia. *Leukemia*, 28, 1396-1401. doi: 10.1038/leu.2014.94
 24. Lim, P. S., Li, J., Holloway, A. F. & Rao, S. (2014). Epigenetic regulation of inducible gene expression in the immune system. *Immunology*, 139(3), 285-289. doi: 10.1111/imm.12100
 25. Liu, Y., Liu, K., Qin, S., Xu, C. & Min, J. (2014). Epigenetic targets and drug discovery. Part 1: histone methylation. *Pharmacology & Therapeutics*, 143(3), 275-294. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.03.007
 26. Liu, K., Liu, Y., Lau, J.L. & Min, J. (2015). Epigenetic targets and drug discovery. Part 2: Histone demethylation and DNA methylation. *Pharmacology & Therapeutics*, 151, 121-140. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.04.001
 27. Shi, Y.G. & Tsukada, Y. (2013). The discovery of histone demethylases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9), a017947. doi: 10.1101/cshperspect.a017947
 28. Kim, J. & Kim, H. (2012). Recruitment and biological consequences of histone modification of H3K27me3 and H3K9me3. *ILAR Journal*, 53(3-4), 232-239. doi: 10.1093/ilar.53.3-4.232
 29. Jha, D. K., & Strahl, B. D. (2014). An RNA polymerase II-coupled function for histone H3K36 methylation in checkpoint activation and DSB repair. *Nature Communications*, 5, 3965. doi: 10.1038/ncomms4965
 30. Kondilis-Magnum, H. D. & Wade, P. (2013). Epigenetics and the adaptive immune response. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(4), 813-825. doi: 10.1016/j.mam.2012.06.008
 31. Zhang, C., Zhong, J. F., Stucky, A., Chen, X-L., Press, M. F. & Zhang, X. (2015). Histone acetylation: novel target for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Epigenetics*, 7, 117. doi: 10.1186/s13148-015-0151-8
 32. Haery, L., Thompson, R. C. & Gilmore, T. D. (2015). Histone acetyltransferases and histone deacetylases in B- and t-cell development, physiology and malignancy. *Genes & Cancer*, 6(5-6), 184-213. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4482241/>
 33. Rando, O. J. (2012). Combinational complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code. *Current opinion in genetics & development*, 22(2), 148-155. doi: 10.1016/j.gde.2012.02.013
 34. Zentner, G. E., & Henikoff, S. (2013). Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(3), 259-266. doi: 10.1038/nsmb.2470
 35. Sharma, A., Singh, K., & Almasan, A. (2012). Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. *Methods in Molecular Biology*, 920, 613-626. doi: 10.1007/978-1-61779-998-3_40
 36. Wu, T., Liu, Y., Wen, D., Tseng, Z., Tahmasian, T., Zhong, M., ... Xiao, A. (2014). Histone variant H2A.X deposition pattern serves as a functional epigenetic mark for distinguishing the developmental potentials of iPSCs. *Cell Stem Cell*, 15(3), 281-294. doi: 10.1016/j.stem.2014.06.004
 37. Won, K-J., Choi, I., LeRoy, G., Zee, B. M., Sidoli, S., Gonzalez-Cope, M., & Garcia, B. A. (2015). Proteogenomics analysis reveals specific genomics orientations of distal regulatory regions composed by non-canonical histone variants. *Epigenetics & Chromatin*, 8, 13. doi: 10.1186/s13072-015-0005-9
 38. Lan, F., & Shi, Y. (2015). Histone H3.3 and cancer: A potential reader connection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(22), 6814-6819. doi: 10.1073/pnas.1418996111
 39. Snyers, L., Zupkowitz, G., Almeder, M., Fliesser, M., Stolsler, A., Weipoltshammer, K., & Schöfer, C. (2014). Distinct chromatin signature of histone H3 variant H3.3 in human cells. *Nucleus*, 5(5), 449-461. doi: 10.4161/nucl.36229
 40. Jang, C-W., Shibata, Y., Starmer, J., Yee, D., & Magnusson, T. (2015). Histone H3.3 maintains genome integrity during mammalian development. *Genes & Development*, 29, 1377-1392. doi: 10.1101/gad.264150.115
 41. Harikumar, A. & Meshorer, E. (2015). Chromatin remodeling and bivalent histone modifications in embryonic stem cells. *EMBO Reports*. doi: 10.15252/embr.201541011
 42. Schuettengruber, B., Martinez, A-M., Iovino, N. & Cavalli, G. (2011). Trithorax group proteins: switching genes and keeping them active. *Nature Reviews | Molecular Cell Biology*, 12(12), 799-814. doi: 10.1038/nrm.3230
 43. Perez-Campo, F. M., Costa, G., Lie-a-Ling, M., Kouskoff, V. & Lacaud, G. (2013). The MYSTerious MOZ, a histone acetyltransferase with a key role in haematopoiesis. *Immunology*, 139, 161-165. doi: 10.1111/imm.12072
 44. Steffen, P. A. & Ringrose, L. (2014). What are memories made of? How Polycomb and Trithorax proteins mediate epigenetic memory. *Nature Reviews | Molecular Cell Biology*, 15, 340-356. doi: 10.1038/nrm3789
 45. Luis, N. M., Morey, L., Di Croce, L. & Benitah, S. A. (2012). Polycomb in stem cells: PRC1 branches out. *Cell Stem Cell*, 11(1), 16-21. doi: 10.1016/j.stem.2012.06.005
 46. Onodera, A. & Nakayama, T. (2015). Epigenetics of T cells regulated by Polycomb/Trithorax molecules. *Trends in Immunology*, 21(5), 330-340. doi: 10.1016/j.molmed.2015.03.001
 47. Rothenberg, E. V. (2014). The chromatin landscape and transcription factors in T cell programming. *Trends in Immunology*, 35(5), 195-204. doi: 10.1016/j.it.2014.03.001
 48. Durinck, K., Goossens, S., Peirs, S., Wallaert, A., Van Loocke, W. Matthijssens, F., ... Van Vlierberghe, P. (2015). Novel biological insights in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Experimental Hematology*, 43, 625-639. doi: 10.1016/j.exphem.2015.05.017
 49. Barlow, D. P. & Bartolomei, M. S. (2014). Genomic imprinting in mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6, a018382. doi: 10.1101/cshperspect.a018382
 50. Olivier-Van Stichelen S. & Hanover J. A. (2014). X-inactivation normalizes O-GlcNAc transferase levels and generates an O-GlcNAc-depleted Barr body. *Frontiers in Genetics*, 5, 256. doi: 10.3389/fgene.2014.00256
 51. Martinez, V. D., Vucic, E. A., Thu, K. L., Hubaux, R., Enfield, K. S. S., Pikor, L. A., ... Lam, W. L. (2015). Unique somatic and malignant expression patterns implicate PIWI-interacting RNAs in cancer-type specific biology. *Scientific Reports*, 5, 10423. doi: 10.1038/srep10423
 52. Le Thomas, A., Rogers, A. K., Webster, A., Marinov, G. K., Liao, S. E., Perkins, E. M., ... Tóth, K. F. (2013). Piwi induces piRNA-guided transcriptional silencing and establishment of a repressive chromatin state. *Genes & Development*, 27(4), 390-399. doi: 10.1101/gad.209841.112

Estrategias para optimizar la detección y el aislamiento de micobacterias no tuberculosas en especímenes respiratorios: experiencia en el Hospital Nacional de Niños

Strategies to optimize detection and isolation of non-tuberculous mycobacteria in respiratory specimens: the experience at the National Children's Hospital

Kevin Leandro-Sandí¹

Resumen:

Las micobacterias no tuberculosas (MNT) son patógenos potenciales de vías respiratorias en individuos con fibrosis quística (FQ) y otras neumopatías crónicas. Su aislamiento en el laboratorio puede ser un reto, debido al sobrecrecimiento de otros microorganismos en los medios de cultivo, principalmente *Staphylococcus aureus* y bacilos gramnegativos no fermentadores. El método de descontaminación con gluconato de clorhexidina al 1% se perfila como una excelente alternativa al método de N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sodio (NALC-NaOH) para recuperar MNT de especímenes respiratorios (ER) complejos, debido a su formidable cobertura contra los contaminantes mencionados y por su efecto inhibitorio, prácticamente nulo, sobre MNT. Otro reto en la detección microscópica de las MNT radica en la pobre retención de la auramina-O por especies de MNT como *Mycobacterium fortuitum*, lo que hace necesario el uso de la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) y de un proceso de decoloración más suave para evitar la ocurrencia de un resultado falsamente negativo. En el presente trabajo se comparten algunas estrategias abocadas a mejorar la detección y aislamiento de MNT en ER, las cuales han sido implementadas recientemente en el laboratorio clínico del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera (LCHNN), donde se recibe anualmente una gran cantidad de ER de individuos con FQ.

Palabras clave: micobacterias no tuberculosas (MNT), *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum*, gluconato de clorhexidina, NALC-NaOH, auramina-O, Ziehl-Neelsen, espécimen respiratorio, fibrosis quística (FQ).

Abstract:

Non-tuberculous mycobacteria (NTM) are potential airway pathogens in patients with cystic fibrosis (CF) and other chronic pneumopathies. Their isolation in the laboratory can be challenging, due to the overgrowth of culture media with other microorganisms, mainly non-fermenting Gram-negative rods and *Staphylococcus aureus*. The decontamination method with 1% chlorhexidine gluconate emerges as an excellent alternative to NALC-NaOH for recovering NTM from complex respiratory specimens (RS), given its outstanding coverage against the abovementioned contaminants and its practically null inhibitory effect on NTM. Another challenge is the microscopic detection of certain NTM by means of auramine-O staining, such as *Mycobacterium fortuitum*, owing their poor retention of the fluorochrome; this demands the use of Ziehl-Neelsen staining as well as a milder decoloration step to preclude the occurrence of false negative smears. Here, a number of strategies driven to improve the detection and isolation of NTM in RS are shown; these have been recently implemented at the clinical laboratory of the National Children's Hospital, where annually a greater share of all RS comes from CF patients.

Key words: Non-tuberculous mycobacteria (NTM), *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum*, chlorhexidine gluconate, NALC-NaOH, auramine-O, Ziehl-Neelsen, respiratory specimen, Cystic Fibrosis (CF).

Artículo recibido el 13/03/2016, aceptado para su publicación el 17/03/2016.

1. Laboratorio Clínico, Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera, CCSS

Correspondencia: kevin_leandro@yahoo.com

Introducción

Las micobacterias no tuberculosas (MNT) agrupan un número importante de especies de distribución mundial, muchas de las cuales solían considerarse meramente ambientales y contaminantes de cultivos en el laboratorio. En las últimas décadas, se ha hecho evidente la relevancia clínica de algunas de ellas. Por ejemplo, aquellas pertenecientes al complejo *Mycobacterium avium* (MAC) son patógenos cuya frecuencia de aislamiento no es despreciable en infecciones diseminadas en individuos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) ^(1,2), mientras que su detección en especímenes respiratorios (ER) de mujeres con síndrome de Lady Windermere y en adultos con fibrosis quística (FQ) tampoco es infrecuente ^(3,4). *Mycobacterium kansasii*, una MNT fotocromógena es un importante patógeno en hombres con neumopatías crónicas y en infecciones diseminadas en pacientes inmunocomprometidos ⁽⁵⁾. En la FQ, la emergencia del grupo *Mycobacterium abscessus*, una MNT de crecimiento rápido, representa un serio problema por su difícil erradicación pulmonar y la resistencia a numerosos antimicrobianos ⁽⁶⁾. Esta también es responsable de infecciones asociadas a implantes y dispositivos prostéticos contaminados ^(7,8).

En este trabajo se describen algunos procesos importantes que permiten mejorar la detección y el aislamiento de MNT en muestras respiratorias.

El reto de detectar y aislar MNT en muestras respiratorias de pacientes con fibrosis quística

La fibrosis quística (FQ) es una entidad cuya patología pulmonar se caracteriza por colonizaciones e infecciones bacterianas recurrentes. Durante los primeros años de vida, es frecuente el aislamiento de *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae* en ER, mientras que los bacilos gramnegativos no fermentadores, tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* y *Burkholderia cepacia* suelen recuperarse en cultivos de individuos cercanos a los diez años de edad y más. En la FQ, la colonización polimicrobiana del tracto respiratorio es un escenario común, lo que hace imprescindible la utilización de medios de cultivo selectivos y diferenciales para la detección y aislamiento de estos patógenos potenciales, en especial cuando las altas cargas bacterianas pueden enmascarar la presencia de uno o varios de ellos ^(9,10).

Desde la década de los 90, se reconoce el papel emergente de las MNT en la patología pulmonar de la FQ. El grupo *Mycobacterium abscessus* se reporta globalmente como

la más prevalente en menores de 15 años, usualmente asociada con fenotipo de FQ más severo y mayor exposición a antibioticoterapia intravenosa previa ⁽¹¹⁾. Lo anterior concuerda con la evidencia bacteriológica más reciente del LCHNN, donde se detectó *M. abscessus* en cuatro pacientes con FQ, con edades entre los dos y los once años, durante el año 2015. En individuos de mayor edad, estudios recientes en otros países indican que MAC es la MNT aislada con mayor frecuencia ⁽¹²⁾. En nuestro laboratorio, durante el año 2015, solamente se recibieron muestras de 4 pacientes con FQ de 15 o más años y en ninguna de ellas se aisló MAC.

Durante el año 2015, las muestras de portadores de FQ correspondieron a más del 70% de especímenes respiratorios pediátricos procesados en el LCHNN, por lo cual es fundamental encontrar métodos que mejoren la recuperación y detección de MNT, particularmente de *M. abscessus*. Las recomendaciones internacionales más recientes resaltan la importancia del cultivo concomitante en medios sólidos y líquidos para la recuperación de MNT en muestras respiratorias ⁽¹²⁾; no obstante, en la FQ esto supone un reto de especial complejidad por varios motivos. En primer lugar, el protocolo estándar de descontaminación por el método de NALC-NaOH suele ser insuficiente para eliminar altas densidades de *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Pseudomonas aeruginosa*, en especial cuando esta última exhibe un fenotipo mucóide. La gran diferencia en los tiempos de generación de estas bacterias, en comparación con las MNT, conduce a un sobrecrecimiento de las primeras en medio líquido, en detrimento de la recuperación de las micobacterias que pudiesen encontrarse en la muestra clínica. En segundo lugar, los suplementos antibióticos provistos por los medios de cultivo líquidos fallan en una alta proporción de muestras en inhibir el sobrecrecimiento de los agentes mencionados anteriormente; lo anterior se hace más evidente en presencia de altas cargas de microorganismos multirresistentes después de realizada la descontaminación.

El método de cultivo líquido recomendado por la OMS para la búsqueda de micobacterias tuberculosas (MTB), que responde al acrónimo MGIT® (*Mycobacterial Growth Indicator Tube*), consta de caldo Middlebrook 7H9 modificado, cuyo suplemento antibiótico PANTA® combina la acción de la polimixina B, la anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim (TMP) y azlocilina ⁽¹³⁾. Esta formulación tiene un rendimiento excelente para inhibir flora orofaríngea común, la mayoría de bacilos gramnegativos entéricos y cepas silvestres de *Pseudomonas aeruginosa*. Desafortunadamente, es incapaz de inhibir cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* (prevalente en FQ), de *Staphylococcus*

aureus (para el cual se ha sugerido la adición de vancomicina al suplemento PANTA)⁽¹⁴⁾, y virtualmente no tiene actividad alguna contra cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* resistentes a TMP. Un tercer inconveniente radica en la incompatibilidad del MGIT con otros métodos de descontaminación optimizados para FQ, entre los que sobresale la descontaminación con ácido oxálico y, más recientemente, el método de descontaminación con gluconato de clorhexidina al 1%⁽⁹⁾. Finalmente, el medio de cultivo sólido a base de huevo, Löwenstein Jensen (LJ), sucumbe ante el crecimiento de los agentes antes mencionados, lo que lleva a su rápida licuefacción y a la imposibilidad de detectar y aislar colonias de micobacterias.

Descontaminación con gluconato de clorhexidina

El gluconato de clorhexidina, un antiséptico de extenso uso a nivel hospitalario y de fácil obtención, posee una excelente acción descontaminante contra patógenos prevalentes en FQ y otras patologías pulmonares de perfil microbiológico similar, al tiempo que afecta de forma mínima la viabilidad de las micobacterias (ver fig. 1 y fig. 2). Recientemente, Asmar y Drancourt (2015) resaltaron la factibilidad de emplear la descontaminación con gluconato de clorhexidina como un método estándar para el aislamiento de MTB y MNT, y demostraron que, realizado bajo condiciones óptimas, exhibe un mayor rendimiento que el método de NALC-NaOH⁽¹⁵⁾.

Desde noviembre del 2015, y en concordancia con las recomendaciones de las Fundaciones Americana y Europea de Fibrosis Quística⁽¹²⁾, se utiliza en el HNN la descontaminación con gluconato de clorhexidina al 1% como un método complementario al de NALC-NaOH para el cultivo de esputos y lavados broncoalveolares de pacientes con FQ y patologías semejantes. Además, se ha utilizado exitosamente como un método de “rescate” de *M. abscessus* a partir de MGIT contaminado y sobrecrecido con *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente y *Stenotrophomonas maltophilia* resistente a TMP, así como en la recuperación de *Mycobacterium fortuitum* en un esputo de una paciente con bronquiectasias y múltiples microorganismos acompañantes (ver fig. 3).

Impacto del uso de gluconato de clorhexidina en la interpretación y valoración del cultivo por MNT en FQ

El método de descontaminación con gluconato de clorhexidina exhibe numerosas bondades en el estudio microbiológico de MNT en FQ. En primer lugar, la tasa de cultivos contaminados (y por ende no concluyentes) puede disminuir significativamente sin necesidad de aplicar un método de descontaminación más agresivo que comprometa la viabilidad de las MNT. Además, permite contrastar y valorar la pertinencia de MNT recuperadas de medio líquido con respecto al cultivo sólido inoculado al mismo tiempo. Lo anterior cobra especial importancia en presencia de MNT como *Mycobacterium gordonae*, cuyo aislamiento en bajos recuentos de muestras no invasivas suele reflejar contaminación del cultivo y no una verdadera colonización/infección del tracto respiratorio del paciente. Con el método de NALC-NaOH, esta posibilidad generalmente se pierde cuando el LJ se licúa por el sobrecrecimiento de contaminantes, lo que impide la cuantificación de colonias de la MNT o la eventual detección de dos micobacterias diferentes

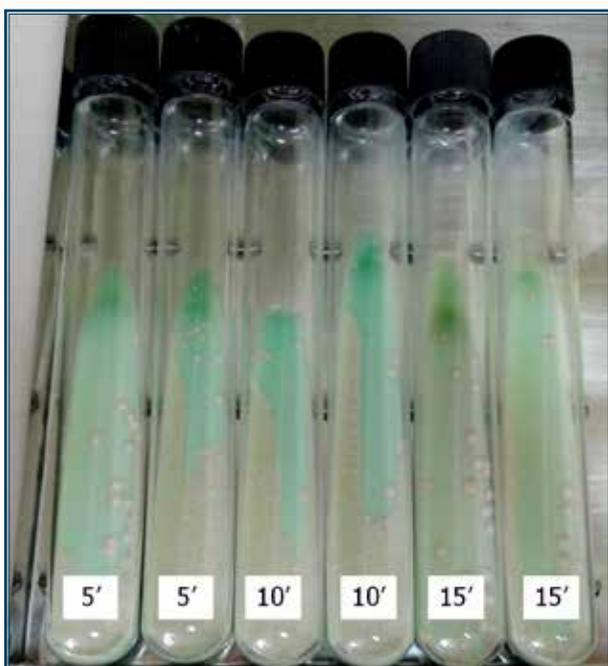


Figura 1. Medio inclinado de Löwenstein-Jensen (LJ) muestra el crecimiento de *M. abscessus* utilizando gluconato de clorhexidina al 1% como descontaminante. En un ensayo simulado, se mezclaron 1×10^6 UFC/ml de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente, que provenía de un lavado broncoalveolar (LBA) de un paciente con FQ, con una densidad equivalente de *Pseudomonas aeruginosa*, que también provenía de un LBA de FQ. Se añadió una cantidad 100 veces menor de *Mycobacterium abscessus* (1×10^4 UFC/ml) y la mezcla se descontaminó por 5, 10 y 15 minutos con gluconato de clorhexidina a una concentración final de 1%. Finalizado el tiempo de incubación, se añadió *buffer* salino de fosfato (PBS) de pH 6.8 y se centrifugó por 15 minutos a 2 300g (fuerza máxima en la centrífuga disponible; idealmente hacerlo a 3 000g o más). Los botones se resuspendieron en un ml de PBS fresco y con 0.2 ml de estos se inocularon los tubos con LJ. El mismo ensayo se replicó utilizando el método estándar de NALC-NaOH. Después de dos días de incubación, las réplicas procesadas con NALC-NaOH evidenciaron una contaminación irremediable del medio inclinado, el cual se licuó en su totalidad.

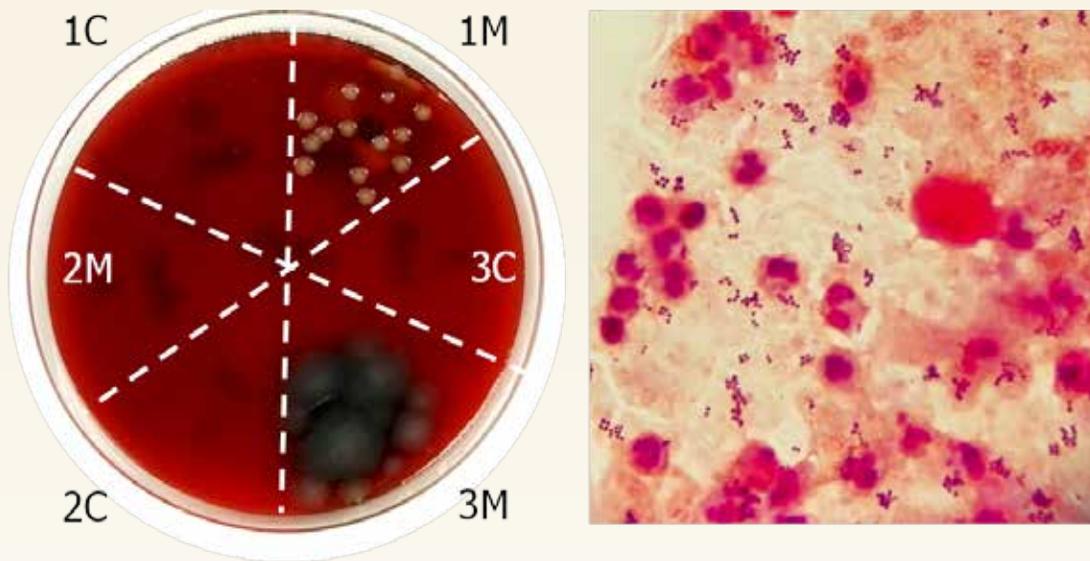


Figura 2. A la izquierda se muestra el crecimiento posdescontaminación de tres LBA de pacientes con FQ, tanto con NALC-NaOH (1M, 2M, 3M) como posdescontaminación con gluconato de clorhexidina al 1% por 5' (1C, 2C, 3C). Para cada muestra, una gota del sedimento descontaminado con NALC-NaOH fue inoculado en agar sangre e incubado por 48 h a 37°C. El remanente de cada sedimento se descontaminó por 5' con clorhexidina al 1 %, y se inoculó de la misma forma en agar sangre. Nótese el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en 1M y su desaparición en 1C, así como el mismo fenómeno con el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en 3M y su ausencia en 3C. Al lado derecho se muestra la tinción de Gram de la muestra 3, un LBA en el que se recuperó *S. aureus* en recuento mayor a 10^5 UFC/ml. Nótese el abundante infiltrado inflamatorio y los abundantes cocos grampositivos en racimos.

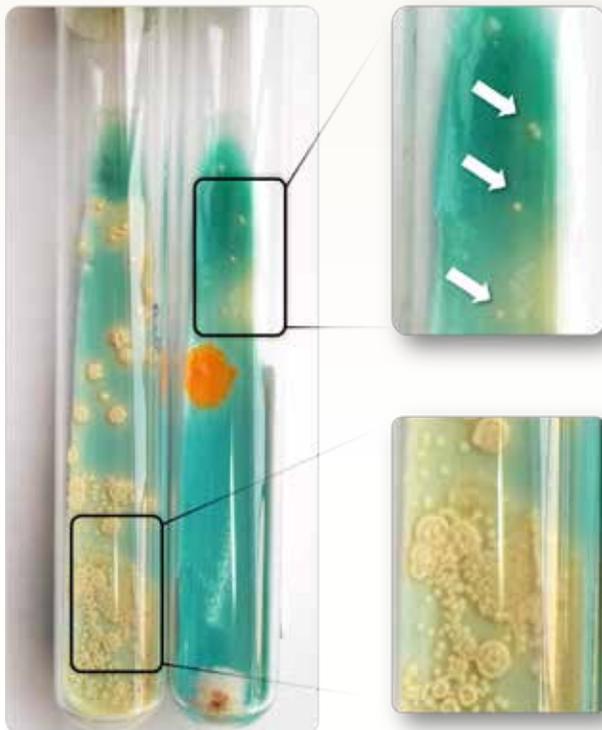


Figura 3. Efecto de la descontaminación con gluconato de clorhexidina al 1% en el rendimiento del cultivo por MNT en un esputo de paciente con bronquiectasias. El tubo de LJ de la derecha fue inoculado con 0.2 ml del sedimento descontaminado por 15' con el método de NALC-NaOH, y de manera concomitante, se inoculó un tubo MGIT, que alcanzó el umbral de positividad al cabo de 3 días de incubación. En el cultivo por piógenos de esta muestra se recuperaron bacilos gramnegativos entéricos mixtos (+), *Staphylococcus aureus* (+) y *Haemophilus parainfluenzae* (3+). El subcultivo en LJ del tubo MGIT positivo se perdió por licuefacción del medio y en agar sangre se recuperó un crecimiento abundante de un bacilo gramnegativo entérico. Al revisar el medio inclinado inoculado de forma paralela al MGIT, se pudo observar un crecimiento de contaminantes en toda la superficie del medio, donde sobresalen dos colonias fúngicas, una levaduriforme en la parte superior y otra micelial en el fondo del tubo. Debido a que la tinción de ZN del tubo MGIT evidenció la presencia de escasos bacilos alcohol-ácido resistentes (BAAR) acompañados de abundantes bacilos tipo entérico, se recurrió al respaldo del sedimento descontaminado con NALC-NaOH, el cual había permanecido por una semana a 4°C. Este se descontaminó con gluconato de clorhexidina al 1% y se sembró en LJ, obteniéndose 2+ de *Mycobacterium fortuitum*. Al cabo de ocho semanas de incubación, puede observarse un pobre crecimiento de las micobacterias en el tubo de la derecha (amplificación con flechas que señalan las colonias). Este registro fotográfico deja patente la gran diferencia que logra el gluconato de clorhexidina en la recuperación de MNT a partir de muestras complejas, donde las micobacterias suelen ser "abrumadas" por la gran densidad de contaminantes de crecimiento más rápido, capaces de resistir la descontaminación inicial con NALC-NaOH.

Recuadro 1. ¿Cómo descontaminar con clorhexidina?

Generalmente, este antiséptico se encuentra en presentaciones al 4%. Se recomienda mezclar 3 partes del espécimen clínico licuado (por adición de N-acetilcisteína o en un sedimento ya descontaminado con NALC-NaOH y neutralizado con PBS) e incubar por 5' a temperatura ambiente, agitando la mezcla en vórtex. Al cabo de este tiempo, neutralizar con PBS y centrifugar por 15', idealmente a 3 000g en centrífuga refrigerada. De no contar con esta posibilidad, adicionar el PBS a 4°C y centrifugar inmediatamente a la velocidad que más se aproxime a una fuerza centrífuga equivalente a 3 000g. Finalmente, decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 1 ml de PBS. Inocular 0.2 ml en un medio sólido a base de huevo, cuya lecitina neutraliza la acción residual de la clorhexidina. Almacenar sedimento remanente en refrigeración como respaldo.

Antes de poner en marcha el método, se recomienda inocular un "testigo" o control negativo para verificar la esterilidad de la solución antiséptica. Además, se sugiere ensayar la metodología con una muestra respiratoria negativa por micobacterias e inoculada artificialmente con una suspensión de MNT cuya carga de micobacterias se aproxime al límite de detección del cultivo (aproximadamente 100 UFC/ml).

en un mismo espécimen, más aun si una de ellas es de crecimiento rápido y la segunda de crecimiento lento. En pacientes con terapia antibiótica contra MNT, la cuantificación de colonias en medio sólido complementa las baciloscopias para monitorear la efectividad del tratamiento, lo que hace esencial disponer de un LJ que conserve su integridad. Finalmente, el gluconato de clorhexidina permite rescatar MNT en medio sólido a partir de cultivos líquidos con crecimientos mixtos de MNT y contaminantes, aun cuando la amplificación de esta última población haya superado con creces la fracción de MNT.

En pacientes pediátricos con FQ, es esencial la detección, el aislamiento y la identificación de MNT, principalmente *M. abscessus*, pues los criterios microbiológicos juegan un rol fundamental en la definición operativa de la enfermedad pulmonar por MNT⁽¹⁶⁾. La relevancia clínica del aislamiento es mayor cuando se trata de especímenes broncoscópicos o se aísla la misma micobacteria de manera reiterada en un paciente dado. Además, en aquellos individuos que se encuentren recibiendo azitromicina como parte de su régimen antimicrobiano, debería interrumpirse su administración mientras se investiga la implicación clínica y pertinencia de un cultivo positivo por MNT, dado que la monoterapia con azitromicina incrementa el riesgo de resistencia y complica así un futuro esquema del agresivo tratamiento para la enfermedad por MNT, en el cual este macrólido debería jugar un rol fundamental, tanto en la fase

intensiva como en la de continuación^(12,17). Por ende, la optimización de los métodos de cultivo y aislamiento de MNT en FQ contribuye a mejorar el panorama diagnóstico y puede incidir en el manejo terapéutico de los pacientes.

Mycobacterium: ¿siempre BAAR?

A pesar de que MTB y muchas MNT resisten sin problemas la decoloración con alcohol-ácido al 0.5% por 2' en el método de tinción con auramina-O, y de alcohol-ácido al 3% por 2' en el método de Ziehl-Neelsen, algunas MNT de crecimiento rápido, como *M. fortuitum*, son incapaces de resistir exitosamente dicha decoloración, y pueden observarse como bacilos alcohol-ácido sensibles (BAAS) o variables (BAAV)⁽¹⁸⁾. En el contexto de un laboratorio de alto volumen que recibe principalmente esputos para estudio por MTB, la auramina-O resulta el método de tamizaje por BAAR más conveniente, tanto por sensibilidad como por rapidez. No obstante, en laboratorios de menor volumen o que manejan muestras respiratorias y extrapulmonares con mayor probabilidad de contener MNT, es recomendable teñir las láminas, no solo con auramina-O, sino también con ZN, aun en aquellas en las que el cribado por auramina-O haya sido negativo. Durante el último año, *M. abscessus* ha sido la MNT detectada con mayor frecuencia en el LCHNN. Afortunadamente, esta micobacteria de crecimiento rápido exhibe una resistencia excelente a la decoloración convencional por ambos métodos de tinción (ver fig. 4).

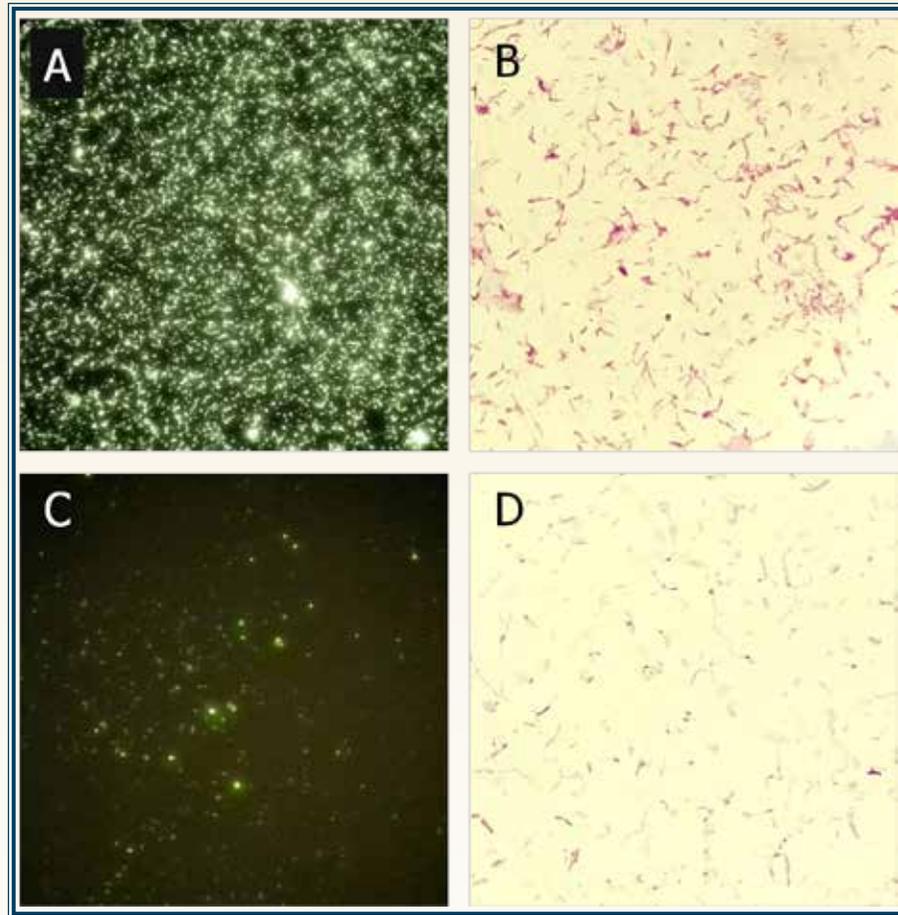


Figura 4. No todas las micobacterias resisten la decoloración con alcohol ácido de la misma manera. A: Cepa de *M. abscessus* teñida con auramina-O (400X). B: La misma lámina del recuadro A teñida con Ziehl-Neelsen (1 000X). C: Cepa de *M. fortuitum* teñida de forma paralela a la lámina del recuadro A (400X). D: Lámina del recuadro C teñida con ZN (1 000X). Nótese la gran diferencia en la intensidad de fluorescencia observada entre las cepas de *M. abscessus* y *M. fortuitum*. La presencia de bajas cargas de esta última puede llevar a falsos negativos en muestras clínicas. Con ZN, la presencia de BAAR es ligeramente más evidente en D, aunque puede notarse que la fracción mayoritaria de los bacilos se observan como “fantasmas”, pues se decoloran fácilmente y tampoco retienen eficientemente el azul de metileno. Para más detalles, ver texto.

Recomendaciones finales

1. Valorar la utilización de gluconato de clorhexidina al 1% como un descontaminante de especímenes respiratorios o para recuperar micobacterias de medio líquido con sobrecrecimiento de bacilos gramnegativos entéricos, bacilos gramnegativos no fermentadores, levaduras y hongos miceliales, estafilococos y flora orofaríngea. Utilizar un medio a base de huevo, como LJ, o añadir lecitina para neutralizar el efecto residual de la clorhexidina.
2. No utilizar el método de Petroff o NALC-NaOH con incubaciones más prolongadas para disminuir la tasa de contaminación de muestras respiratorias. La agresividad de esta estrategia potencialmente llevaría a falsos cultivos negativos en pacientes con enfermedad paucibacilar por MTB o MNT. Almacenar en refrigeración un respaldo de los sedimentos descontaminados con NALC-NaOH por al menos una semana. Estos pueden ser de utilidad cuando los medios líquidos y sólidos se pierden por sobrecrecimiento con los microorganismos mencionados en el punto 1.
3. Siempre verificar la eficacia de la descontaminación en un medio rico no selectivo, como el agar sangre. Su utilización permite monitorear la agresividad del método y permite detectar aquellas muestras que posiblemente

lleguen a requerir un tratamiento adicional con gluconato de clorhexidina para eliminar contaminantes residuales al método de NALC-NaOH.

4. Ante la sospecha clínica y microbiológica de enfrentarse a un espécimen que contenga MNT como *M. fortuitum*, valorar la pertinencia de teñir con ZN y decolorar por menos tiempo (1' en lugar de 2'), con el fin de evitar la ocurrencia de frotis falsamente negativos.

Referencias

1. Latawa, R., Singh, K. K., Wanchu, A., Sethi, S., Sharma, K., Sharma, A., ... Verma, I. (2014). Specific amplification of gene encoding N-terminal region of catalase-peroxidase protein (KatG-N) for diagnosis of disseminated MAC disease in HIV patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 80(2), 122-129. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.06.014
2. Mayskaya, M. U., Otten, T. F., Ariel, B. M., Fedotova, E. P., Hunter, R. L., & Nasyrov, R. A. (2014). Morphological manifestations of the atypical mycobacteriosis caused by nontuberculous mycobacteria in the HIV infected patients. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 44(2), 131-133. Consultado el 10 de marzo de 2016 de: <http://www.annclinlabsci.org/content/44/2/131.full>
3. Moon, S. M., Park, H. Y., Jeon, K., Kim, S-Y., Chung, M. J., Huh, H. J., ... Koh, W-J. (2015). Clinical significance of *Mycobacterium kansasii* isolates from respiratory specimens. *PLoS ONE*, 10(10), e0139621. doi: 10.1371/journal.pone.0139621
4. Yu, J. A., Pomerantz, M., Bishop, A., Weyant, M. J., & Mitchell, J. D. (2011). Lady Windermere revisited: treatment with thoracoscopic lobectomy/segmentectomy for right middle lobe and lingular bronchiectasis associated with non-tuberculous mycobacterial disease. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 40(3), 671-675. doi: 10.1016/j.ejcts.2010.12.028
5. Nei, T., Okabe, M., Mikami, I., Koizumi, Y., Mase, H., Matsuda, K., ... Dan, K. (2013). A non-HIV case with disseminated *Mycobacterium kansasii* disease associated with strong neutralizing autoantibody to interferon- γ . *Respiratory Medicine Case Reports*, 8, 10-13. doi: 10.1016/j.rmcr.2012.11.003
6. Nessar, R., Cambau, E., Reyrat, J. M., Murray, A., & Gicquel, R. (2012). *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67(4), 810-818. doi: 10.1093/jac/dkr578
7. Henry, M. W., Miller, A. O., Kahn, B., Windsor, R. E., & Brause, B. D. (2016). Prosthetic joint infections secondary to rapidly growing mycobacteria: Two case reports and a review of the literature. *Infectious Diseases*, 1-8. doi: 10.3109/23744235.2016.1142673
8. Rüegg, E., Cheretakis, A., Modarressi, A., Harbarth, S., & Pittet-Cuénod, B. (2015). Multisite infection with *Mycobacterium abscessus* after replacement of breast implants and gluteal lipofilling. *Case Reports in Infectious Diseases*, 2015, 361340. doi: 10.1155/2015/361340
9. Alarcón, T., Caballero, E., Cantón, R., & Oliver, A. (2007). *Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística*. E. Cercenado & R. Cantón (Eds.). SEIMC. ISBN: 978-84-612-3982-5
10. Burns, J. L., & Rolain, J-M. (2014). Culture-based diagnostic microbiology in cystic fibrosis: Can we simplify the complexity? *Journal of Cystic Fibrosis*, 13, 1-9. doi: 10.1016/j.jcf.2013.09.004
11. Catherinot, E., Roux, A-L., Vibet, M-A., Bellis, G., Ravilly, S., Lemonnier, L., ... Gaillard, J-L. (2013). *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus* complex target distinct cystic fibrosis patient subpopulations. *Journal of Cystic Fibrosis*, 12(1), 74-80. doi: 10.1016/j.jcf.2012.06.009
12. Floto, R. A., Olivier, K. N., Saiman, L., Daley, C. L., Hermann, J-L., Nick, J. A., ... Haworth, C. S. (2016). US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis: executive summary. *Thorax*, 71, 88-90. doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-207983
13. Stinson, K. W., Eisenach, K., Kayes, S., Matsumoto, M., Siddiqi, S., Nakashima, S., ... Mathai, P. (Eds.). (2014). *Mycobacteriology Laboratory Manual*. Global Laboratory Initiative (GLI) | Stop TB Partnership. Consultado el 10 de marzo de 2016 de: <http://www.stoptb.org/wg/gli>
14. Chang, C. L., Park, T. S., Oh, S. H., Kim, H. H., Lee, E. Y., Son, H. C., & Kim, C. M. (2002). Reduction of contamination of mycobacterial growth indicator tubes with a modified antimicrobial combination. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(10), 3845-3847. doi: 10.1128/JCM.40.10.3845-3847.2002
15. Asmar, S., & Drancourt, M. (2015). Chlorhexidine decontamination of sputum for culturing *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Microbiology*, 15, 155. doi: 10.1186/s12866-015-0479-4
16. Griffith, D. E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B. A., Catanzaro, A., Daley, C., Gorfin, F., ... Winthrop, K. (2007). An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 175(4), 367-416. doi: 10.1164/rccm.200604-571ST
17. Binder, A. M., Adjemian, J., Olivier, K. N., & Prevots, R. (2013). Epidemiology of nontuberculous mycobacterial infections and associated chronic macrolide use among persons with cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188(7), 807-812. doi: 10.1164/rccm.201307-1200OC
18. Alcaide Fernández de Vega, F., Esteban Moreno, J., González Martín, J., & Palacios Gutiérrez, J. J. (2005). *Procedimientos en Microbiología Clínica: 9a. Micobacterias*. E. Cercenado & R. Cantón (Eds.). SEIMC. ISBN: 84-609-7032-9

Neutropenia: un vistazo a su etiología y abordaje clínico

Neutropenia: a short review on its etiology and clinical approach

Lucía Figueroa-Protti¹

Resumen:

La neutropenia se define como un recuento absoluto de neutrófilos (RAN) menor a 1 500 células/ μ l. Puesto que los neutrófilos proveen protección contra una variedad amplia de hongos y bacterias, la frecuencia y la severidad de las infecciones por estos microorganismos son mayores en pacientes neutropénicos; cuanto más bajo sea el RAN y más larga la duración de la neutropenia, hay más riesgo. Sin embargo, la severidad de la neutropenia también depende de otros factores que pueden influenciar la susceptibilidad a infección, como la rapidez de la aparición de la neutropenia, la reserva mieloide en médula ósea, el conteo de monocitos y linfocitos absolutos circulantes, el estado funcional de los fagocitos, la concentración de inmunoglobulinas en suero, la integridad de la piel y las membranas mucosas, la irrigación vascular a los tejidos y el estado nutricional del paciente. Todos estos factores dependerán de la enfermedad subyacente que provoque la neutropenia, la cual puede ser desde un desorden en la producción de neutrófilos, como la neutropenia congénita severa, la neutropenia cíclica, la neutropenia en pacientes con cáncer o producto de inmunodeficiencias o enfermedades metabólicas, hasta un desorden en la distribución o utilización de neutrófilos, como lo son la neutropenia autoinmune, la neutropenia inducida por medicamentos, la neutropenia producto de enfermedades infecciosas o autoinmunes, o incluso de causa idiopática. Cada una de estas posibles causas representa un riesgo mayor o menor de que el paciente desarrolle un cuadro infeccioso severo; por consiguiente, la identificación de la enfermedad subyacente en cualquier paciente neutropénico es de suma importancia. Para esto, es necesario un abordaje clínico que incluya historia familiar y personal, examen físico y pruebas de laboratorio, así como el análisis de la reserva de progenitores en médula ósea.

Palabras clave: neutropenia, neutropenia severa, neutropoyesis hipoplásica, neutropoyesis inefectiva, neutropenia congénita, neutropenia cíclica, neutropenia en cáncer, neutropenia autoinmune, neutropenia idiopática, neutropenia en enfermedades infecciosas.

Abstract:

Neutropenia is defined as the reduction in the absolute number of neutrophils in the blood circulation below 1 500/ μ l. Since neutrophils provide protection against a wide variety of bacterial and fungal pathogens, the frequency and severity of infections caused by these organisms is increased in patients with neutropenia; the lowest and longer the neutropenia, the greater the risk of infection. Nevertheless, neutropenia severity also depends on some other factors that can influence this risk, such as the myeloid reserve in the bone marrow, the absolute count of circulating monocytes and lymphocytes, the phagocytes functionality, the immunoglobulins concentration, the integrity of skin and mucous membranes, the vascular supply to tissues, and the nutritional status of the patient. All of these factors will rely on the subjacent disorder or disease that is causing the neutropenia: it can be a disorder that affects the neutrophil production in the bone marrow, such as severe congenital neutropenia, cyclic neutropenia, cancer, an immunodeficiency, or metabolic diseases; on the other hand, it can be a disorder in the distribution or utilization of neutrophils in peripheral blood, for example autoimmune neutropenia, drug-induced neutropenia, idiopathic neutropenia, or in patients with other autoimmune diseases. Each one of these conditions represents a higher or lower risk for the development of severe infectious diseases; therefore, the determination of the underlying cause of a low absolute number of neutrophils in the blood circulation requires an exhaustive clinical approach that includes familiar and personal history, physical examination, general and specific lab test, as well as the examination of the bone marrow progenitors.

Key words: neutropenia, severe neutropenia, hypoplastic neutropoiesis, ineffective neutropoiesis, congenital neutropenia, cyclic neutropenia, neutropenia in cancer, autoimmune neutropenia, idiopathic neutropenia, neutropenia in infectious diseases.

Artículo recibido el 04/01/2016, aceptado para su publicación el 17/03/2016.

I. Facultad de Microbiología, Universidad de Ciencias Médicas

Correspondencia: figueroapl@ucimed.com

Introducción

La neutropenia se define como un recuento absoluto de neutrófilos (RAN) menor a dos desviaciones estándar debajo del promedio normal de la población.⁽¹⁾ En términos generales, a nivel clínico, la neutropenia se describe como un RAN 1 000 células/μl en infantes, un RAN 1 500 células/μl desde el primer año hasta los diez años y un RAN 1 800 células/μl a partir de los diez años.^(1,2,3,4,5) Además de la edad, la concentración de neutrófilos en sangre es influenciada por el grupo étnico, la actividad metabólica, factores genéticos y factores ambientales.⁽¹⁾ Es conocido que las poblaciones negras y de judíos yemenitas tienen niveles promedio de RAN más bajos que poblaciones europeas o asiáticas; sin embargo esta diferencia es modesta y no se ha reconocido ninguna consecuencia a nivel clínico.^(1,2,3)

La neutropenia puede ser clasificada según el RAN y según su duración. En cuanto al RAN, la neutropenia en individuos mayores de un año se clasifica como leve cuando el RAN está entre 1 000 – 1 800 células/μl, moderada entre 500 – 1 000 células/μl y severa con <500 células/μl.^(1,2,3,5,6) Según la duración de la neutropenia, esta se clasifica como crónica cuando el paciente tiene un RAN <1 500 células/μl en diferentes ocasiones por tres o más meses consecutivos, y aguda cuando el RAN < 1 500 células/μl es transitorio o menor a tres meses.^(2,3,5,6)

El proceso de maduración de los neutrófilos tarda de 10-12 días en la médula ósea. Partiendo de una célula madre multipotencial, la célula se transforma en varias generaciones celulares que se reconocen morfológicamente; en orden de maduración estas son mieloblasto, promielocito, mielocito, metamielocito, neutrófilo en banda y neutrófilo segmentado o maduro. Estos últimos salen a circulación donde su vida media es de 7 horas antes de que se extravasen a tejidos periféricos. Ante un estímulo inflamatorio, se induce la activación y producción de neutrófilos con un aumento en la proliferación y maduración de los precursores en médula ósea. Los neutrófilos en sangre periférica proveen protección contra una variedad amplia de hongos y bacterias. Consecuentemente, la frecuencia y la severidad de las infecciones por estos microorganismos son mayores ante la presencia de neutropenia.^(4,6,7)

Los síntomas y signos de un paciente neutropénico son muy variables, lo que puede retrasar su diagnóstico. Los médicos deberían prestar atención a una neutropenia cuando se manifiestan RAN repetidamente bajos y se acompañan de fiebre e infecciones frecuentes y atípicas. De esta manera, los síntomas van a depender del sitio anatómico donde se localice la infección; los más comunes son el tracto respiratorio, el tracto gastrointestinal y, en menor frecuencia, la piel.⁽⁵⁾ En pacientes con cáncer, en

los cuales es común que se presente neutropenia producto de la quimioterapia, el uso de catéteres venosos centrales ha tenido un impacto en la frecuencia y el espectro de las infecciones. La habilidad de ciertos organismos de producir biopelículas y la baja penetración de los agentes antimicrobianos dentro de estas hace que las bacteriemias relacionadas con catéter sean difíciles de erradicar sin su remoción.^(4,6)

Una característica importante de la neutropenia es que es un dato de laboratorio, pero no representa un diagnóstico o entidad por sí misma. Su origen e importancia son extremadamente variables; puede representar tanto un factor predisponente a infecciones severas y mortales, como es bien conocido para pacientes con malignidades, como puede ser diagnosticada incidentalmente en personas asintomáticas por un hemograma de rutina.⁽²⁾ En esta revisión bibliográfica se describirán las causas que pueden provocar una neutropenia y el abordaje clínico que se requiere para determinar su origen.

Causas de neutropenia

En términos generales, la neutropenia puede ser ocasionada por cuatro mecanismos fisiopatológicos:

1. Neutropoyesis hipoplásica: cuando hay una disminución en la producción de neutrófilos debido a anomalías genéticas intrínsecas de las células progenitoras o por factores extrínsecos que cambian el microambiente de la médula ósea como infiltración de tumores, fibrosis o irradiación.
2. Neutropoyesis inefectiva: existe una producción adecuada de los precursores granulocíticos, sin embargo, su destrucción en médula ósea conduce a un arresto en la maduración y a RAN disminuidos. Esta neutropoyesis puede ser producto de mutaciones o defectos adquiridos.
3. Remoción o utilización acelerada de neutrófilos circulantes: hay una producción eficiente y efectiva de neutrófilos, pero estos son removidos de forma prematura de la circulación.
4. Movimiento de células desde la circulación hacia la microcirculación capilar: la marginación aumentada de neutrófilos puede ser provocada después de la inyección de endotoxina, por la exposición a membranas de diálisis o por tratamiento intravenoso con G-CSF o GM-CSF, los cuales disminuyen transitoriamente el RAN.^(1,6)

Internacionalmente, está aceptado que el riesgo de sufrir infecciones frecuentes y severas es inversamente proporcional al RAN.^(1,5) Además, cuanto más larga sea la duración de la neutropenia, hay mayor riesgo de infección.^(4,8) De esta manera, el diagnóstico de neutropenia crónica severa (RAN <500 células/ μ l por 3-6 meses o más) indica un riesgo mayor de infección.^(1,5) No obstante, muchos pacientes con neutropenia moderada-severa tienen un curso benigno, lo cual implica que otros factores pueden influenciar la susceptibilidad a infección, entre ellos la rapidez de la aparición de la neutropenia, la reserva mielóide en médula ósea, el conteo de monocitos y linfocitos absolutos circulantes, el estado funcional de los fagocitos, la concentración de inmunoglobulinas en suero, la integridad de la piel y las membranas mucosas, la irrigación vascular a los tejidos y el estado nutricional del paciente.^(1,2) Estos factores dependerán de la enfermedad subyacente.⁽⁵⁾

Por consiguiente, los pacientes con neutropenia requieren de una evaluación minuciosa y es sumamente importante que el médico esclarezca su origen. Los desórdenes en los precursores hematopoyéticos que afectan la producción y liberación de neutrófilos de la médula ósea inducen un mayor riesgo de infección que ante una neutropenia ocasionada por un aumento en el consumo o en la destrucción de neutrófilos circulantes.^(1,5) Para términos de esta revisión bibliográfica, las causas de la neutropenia se dividirán en dos grandes grupos: los desórdenes en la producción de neutrófilos (ya sea por neutropoyesis hipoplásica o neutropoyesis inefectiva) y los desórdenes en la distribución o utilización de neutrófilos.

Desórdenes en la producción de neutrófilos

Neutropenia congénita severa y neutropenia cíclica

La neutropenia congénita severa (NCS), o agranulocitosis, fue descrita por primera vez en 1956 por Kostmann como una enfermedad de herencia autosómica recesiva en una familia en Suecia.⁽¹⁾ Actualmente, se conoce que la NCS consiste en un grupo de trastornos genéticos que resultan en una producción de neutrófilos prácticamente nula desde el nacimiento, lo cual conlleva a un alto riesgo de infecciones severas desde edad muy temprana y predisposición al desarrollo de una leucemia mielocítica aguda.^(5,7,9) Además, contrario a lo descrito en un inicio, se conoce que la mayoría de las mutaciones responsables de esta patología tienen una herencia autosómica dominante.^(1,7,9)

Los individuos con NCS manifiestan una hipoplasia mielóide con arresto en el estado de promielocito/mielocito.^(7,9) El RAN normalmente es 200 células/ μ l

y es frecuente la presencia de monocitosis, anemia leve, trombocitosis y esplenomegalia. Los conteos y la función de linfocitos son normales y los niveles de inmunoglobulinas son normales o aumentados.⁽¹⁾ El cuadro clínico que manifiestan los pacientes con NCS incluye otitis, gingivitis, neumonía, enteritis, peritonitis y bacteriemia usualmente en los primeros meses de vida, por lo que este trastorno requiere tratamiento y vigilancia rutinaria.^(5,6,8)

Existe otro fenotipo de neutropenia esporádica o de herencia autosómica dominante que se denomina neutropenia cíclica, la cual es una enfermedad caracterizada por episodios recurrentes regulares de neutropenia severa, usualmente cada 21 días.^(1,6,10) En contraste con la NCS, los pacientes con neutropenia cíclica usualmente manifiestan sus síntomas un poco más adelante en su primer año de vida y tienen un mejor pronóstico. Durante los episodios de neutropenia, que normalmente duran de 3-6 días, los pacientes presentan fiebre, encías inflamadas, úlceras bucales, malestar, dolor abdominal, linfadenopatía cervical y posiblemente infecciones.^(5,7,10) Además, los niveles bajos del RAN son asociados con picos en los niveles de monocitos.⁽⁵⁾ El diagnóstico de la neutropenia cíclica solo puede ser realizado con diferentes conteos seriales de leucocitos, por lo menos dos o tres veces por semana por un mínimo de seis semanas que confirmen el ciclo de 21 días. La mayoría de los niños sobrevive a la adultez con síntomas más leves a partir de la pubertad y, a diferencia de la NCS, este padecimiento no confiere un riesgo aumentado de desarrollar leucemia. También, hay muy pocos casos de neutropenia cíclica adquirida en adultos, los cuales tienen asociada una proliferación clonal de linfocitos con gránulos grandes.⁽¹⁾

Se han descrito varios genes cuyas mutaciones son responsables de estas patologías. El 60% de los pacientes con NCS y los pacientes con neutropenia cíclica presentan mutaciones heterocigotas de herencia autosómica dominante en el gen que codifica la elastasa de neutrófilos, denominado *ELANE*. Esta proteína pertenece a una clase de serínproteasas y es expresada exclusivamente en las líneas celulares mielocíticas y monocíticas, en donde está almacenada como una proteasa activa en los gránulos azurófilos (o primarios) lista para ser liberada ante un estímulo inflamatorio. En el ambiente extracelular, la elastasa de neutrófilos actúa rompiendo proteínas de matriz extracelular, mientras que los inhibidores de serínproteasa antagonizan su actividad.^(1,7,9,11,12,13)

Hasta el momento, se conocen por lo menos 52 diferentes mutaciones en el gen *ELANE*, pero no se ha encontrado una correlación entre la mayoría de las mutaciones y el fenotipo clínico. Además, el mecanismo por el cual las

mutaciones en la elastasa producen neutropenia no se conoce con certeza, sin embargo, se sabe que no es por falta de función porque la proteína mutante mantiene su actividad proteolítica, la especificidad de sustrato y la capacidad de ser inhibida después de cumplir su función.⁽⁷⁾ Por diversas observaciones, el mecanismo por el cual estas mutaciones producen enfermedad se ha relacionado con el fallo en el funcionamiento de dos mecanismos celulares importantes. El primero es un tráfico errático de las vesículas del aparato de Golgi hacia la membrana celular. Esta hipótesis se plantea a partir de que, en perros, la neutropenia cíclica resulta de la mutación de una proteína involucrada en este proceso. El segundo, es una respuesta aberrante al estrés en el retículo endoplasmático.⁽⁹⁾ Esta organela ha desarrollado una respuesta a proteínas desplegadas (UPR, por sus siglas en inglés) como mecanismo de protección celular que contrarresta los efectos dañinos ocasionados por proteínas plegadas inapropiadamente. Esta respuesta consiste en la inhibición de la síntesis proteica, la degradación de las proteínas mal plegadas y el incremento en la transcripción de chaperonas que intervienen para que el proceso de plegamiento se dé correctamente. Si este sistema de adaptación es insuficiente, el estrés bioquímico provoca apoptosis celular.^{7,14} Se ha sugerido que las elastasas mutantes, al no ser transportadas correctamente, inducen el UPR en el retículo endoplasmático. Un estudio demostró que la expresión de muchas elastasas mutantes en una línea celular mielóide resultó en un tráfico intracelular interrumpido y la acumulación de elastasa citoplasmática. Adicionalmente, la apoptosis estaba incrementada, lo cual fue asociado al aumento en la expresión de la chaperona BiP (proteína de unión a inmunoglobulinas, por sus siglas en inglés) en el retículo endoplasmático.

Otros estudios también observaron un aumento en la expresión de BiP en precursores granulocíticos aislados de pacientes con NCS.^(7,9) Asimismo, en un estudio reciente con células madre pluripotentes inducidas, Nayak *et al.* (2015) comprobaron que los promielocitos de pacientes con NCS tienen una apoptosis aumentada con respecto a promielocitos de pacientes control y también que la capacidad de estallido respiratorio está disminuida. Además, confirmaron que, en promielocitos de pacientes con NCS, la elastasa de neutrófilos no es correctamente transportada a los gránulos primarios y permanece en el retículo endoplasmático, donde la expresión de proteínas chaperonas como BiP está aumentada.⁽⁹⁾

Por otro lado, los pacientes con NCS con herencia autosómica recesiva en su mayoría tienen una mutación en el gen *HAX-1*, que codifica por una proteína mitocondrial. Estas mutaciones parecen estar involucradas en la desestabilización del potencial de la

membrana mitocondrial, lo cual conduce a una apoptosis acelerada de células mieloides, así como a anomalías neurológicas. Adicionalmente, estas mutaciones producen defectos en la vía de señalización del receptor del factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF, por sus siglas en inglés). Asimismo, mutaciones en el gen para la glucosa-6-fosfatasa (*G6PC3*) también pueden causar una neutropenia severa producto de la apoptosis de precursores que, en algunos casos, se asocia a un cuadro clínico de manifestaciones no hematológicas.^(1,11,13,15,16) Otras mutaciones en genes de herencia autosómica recesiva, autosómica dominante, ligada al cromosoma X o esporádicas descritos en la literatura son *GFII*, *WAS*, *p14*, *TAZ*, *JAGNI* y *TCIRG1*, sin embargo, en muchos pacientes la causa genética sigue sin conocerse.^(1,7,13)

Adicionalmente, las mutaciones en el gen codificante para el receptor del G-CSF también ocurren en pacientes con NCS. La mayoría de estas mutaciones causan truncamientos en la porción distal del dominio citoplasmático del receptor, lo cual se asocia a una sensibilidad alterada hacia el G-CSF. Estas mutaciones no son la causa primaria de la neutropenia pero sí son parte de la evolución a mielodisplasia o leucemia mielocítica aguda.^(1,11)

El tratamiento que se utiliza para ambas patologías es la administración de G-CSF, el cual es efectivo aumentando los RAN, reduciendo las fiebres recurrentes e infecciones y, en pacientes con neutropenia cíclica, acortando los periodos neutropénicos lo suficiente para prevenir los síntomas y las infecciones. El G-CSF actúa mejorando la expresión de un factor de transcripción crítico para la granulopoyesis de “emergencia” llamado CEBPB. Desafortunadamente, el tratamiento no disminuye el riesgo de los pacientes con NCS de desarrollar una leucemia mielocítica aguda y, además, el 5% de los pacientes no responden al G-CSF. Incluso se reporta que el riesgo de malignidad aumenta en pacientes que necesitan altas dosis de G-CSF o que responden pobremente al tratamiento. El único tratamiento curativo es el trasplante de células madres hematopoyéticas, el cual se usa generalmente en pacientes que no responden al tratamiento con G-CSF o que están desarrollando una leucemia mielocítica aguda.^{1,5,6,7,8,9}

Debido a que en muchos pacientes con NCS se requiere de dosis muy altas de G-CSF para tener respuesta y que este tratamiento no corrige la función anormal de los neutrófilos ni la evolución hacia leucemia mielocítica aguda, Nayak *et al.* (2015), en el estudio mencionado anteriormente, proponen un nuevo tratamiento que incluya dosis bajas de G-CSF con Sivelestat, un medicamento que se utiliza actualmente para inhibir la elastasa de neutrófilos en la terapia de daño pulmonar

agudo. Esta propuesta parece ser muy prometedora porque rescata la vía “basal” de la granulopoyesis, reflejado por la expresión del factor de transcripción CEBPA, aumenta tres veces la colocalización de la elastasa con la mieloperoxidasa, la cual se encuentra en gránulos primarios, y disminuye la expresión de chaperonas como BiP en el retículo endoplasmático. Cabe aclarar que estos estudios fueron realizados *in vitro* y, para una utilización clínica, se requiere de ensayos clínicos.⁽⁹⁾

Históricamente, estas patologías se habían visto como desórdenes monogénicos, sin embargo, la coexistencia de varios fenotipos, la falta de correlación entre el genotipo y el fenotipo y la identificación de pacientes con mutaciones en múltiples genes, ha evidenciado que son síndromes multigénicos. Asimismo, la observación de que la misma mutación puede provocar fenotipos tan diferentes como NCS y neutropenia cíclica, apoya esta evidencia. De esta manera, se predice que una mutación genética es la causa dominante de la enfermedad y, las mutaciones secundarias, podrían tener un efecto sinérgico y empeorar el fenotipo de la enfermedad. Además, algunos datos sugieren que las mutaciones en el gen *ELANE* no son suficientes para causar el fenotipo de NSC y que otros genes pueden actuar como modificadores en la sobrevivencia del promielocito y su respuesta a G-CSF, como sucede con las mutaciones en el receptor de G-CSF.^(7,9)

Enfermedades inmunodeficientes primarias

La neutropenia es un signo de enfermedades inmunodeficientes congénitas y, además, es un factor que contribuye a la susceptibilidad a infecciones en estos pacientes. En la mayoría de estas condiciones, la neutropenia se atribuye a un desorden de producción basado principalmente en la examinación histológica de la médula ósea. Por ejemplo, la neutropenia es muy común en la agammaglobulinemia ligada al X, la inmunodeficiencia común variable, el síndrome de hiper IgM ligado al X y la disgenesia reticular; y es menos común en la deficiencia de adenosina deaminasa, en los síndromes de Wiskott-Aldrich y Omenn y en la mutación para la proteína independiente del factor de crecimiento 1 (GFI-1, por sus siglas en inglés). La terapia con G-CSF es efectiva para la mayoría de estos pacientes.^(1,6,13)

Enfermedades metabólicas

Muchos desórdenes metabólicos también pueden relacionarse con una alteración en la producción de neutrófilos. Por ejemplo, el síndrome de Swachman-Diamond es un desorden de herencia autosómica recesiva que combina una baja estatura, deficiencia exocrina

pancreática y fallos en la médula ósea por una mutación que afecta el gen *SBDS*, la cual ocasiona una proliferación defectuosa y apoptosis aumentada en los progenitores mieloides tempranos. Otro ejemplo es la enfermedad de glucogenosis tipo Ib, caracterizada por hipoglucemia, hepatoesplenomegalia, convulsiones y problemas en el desarrollo causada por una mutación que afecta la proteína de transporte intracelular para la glucosa. Además de la neutropenia, los neutrófilos de estos pacientes tienen poca capacidad de estallido respiratorio y quimiotaxis defectuosa.^(1,6,13) El tratamiento con G-CSF también es eficiente para corregir la neutropenia de estos individuos; sin embargo, sin trasplante de médula ósea el riesgo de evolución a síndromes mielodisplásicos o leucemia mielocítica aguda es mayor.⁽¹⁾

Neutropenia en pacientes con cáncer

La neutropenia como consecuencia de una producción alterada es una característica común de varias enfermedades que afectan las células madre hematopoyéticas, como la leucemia, los síndromes mielodisplásicos y la anemia aplásica.⁽¹⁾ Los episodios infecciosos producto de la neutropenia contribuyen significativamente a la morbilidad en niños con malignidades hematológicas de alto riesgo¹⁷ y, en general, los pacientes con malignidades hematológicas desarrollan una neutropenia asociada a infecciones mucho más frecuentemente que pacientes con tumores sólidos, en los cuales la neutropenia generalmente es de corto plazo y la función de los neutrófilos es normal.⁽⁴⁾

En las últimas décadas, el pronóstico de pacientes con enfermedades neoplásicas ha mejorado gracias al progreso y el desarrollo de un arreglo de agentes quimioterapéuticos y biológicos y al amplio uso de modalidades como el trasplante de células madre hematopoyéticas; desafortunadamente, una de las complicaciones de estas opciones de tratamiento es la inmunosupresión profunda asociada y el consiguiente riesgo a infección. En particular, la neutropenia sigue siendo la consecuencia desfavorable más común de la quimioterapia citotóxica y, las complicaciones infecciosas se observan principalmente durante los periodos neutropénicos.^(1,4,17)

La sobrevivencia promedio de estos pacientes depende en gran medida del reconocimiento y el tratamiento temprano de infecciones. Además del riesgo de muerte, los eventos infecciosos pueden interferir con la terapia antineoplásica y favorecer el desarrollo del cáncer. De manera que, es de suma importancia que la quimioterapia antimicrobiana empírica se defina según las tendencias epidemiológicas y los patrones de susceptibilidad/resistencia locales. La mayoría de las infecciones surgen

de microbiota endógena, solo un pequeño porcentaje son adquiridas de fuentes exógenas o por exposición al ambiente, lo cual también debe ser tomado en cuenta para su tratamiento.⁴

Neonatos de madre hipertensas

Las mujeres hipertensas a menudo tienen bebés con bajo peso al nacer y RAN bajos, atribuibles a una producción disminuida. Esta neutropenia generalmente es severa con alto riesgo de infección, pero resuelve en pocas semanas. El G-CSF aumenta los RAN, pero no se ha establecido ningún beneficio clínico.⁽¹⁾

Deficiencias nutricionales

La neutropenia es una característica temprana y consistente de las anemias megaloblásticas que resultan de deficiencia de vitamina B12 o ácido fólico, y también de la deficiencia de cobre en los pacientes con nutrición parenteral. Asimismo, el alto consumo de alcohol puede suprimir la producción celular en médula ósea.⁽¹⁾

Desórdenes en la distribución o utilización de neutrófilos

Neutropenia autoinmune

La neutropenia causada por desórdenes inmunológicos surge de una alteración en la distribución de neutrófilos en la sangre. Lo anterior se explica por una aceleración de su remoción mediada por autoanticuerpos.⁽¹⁸⁾ La superficie de los neutrófilos comparte antígenos con otros tejidos, entre los que figuran los antígenos i-I y los pertenecientes al antígeno leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés). Además, tienen antígenos específicos como NA-1, NA-2, NB-1, NC-1 y NC-9a. Los autoanticuerpos antineutrófilos más asociados con neutropenia son anti-NA-1 y anti-NA2.^(1,18) El diagnóstico definitivo de esta patología se logra por la determinación de estos autoanticuerpos.^(2,18) Existen muchas pruebas disponibles para la detección de anticuerpos antineutrófilo, las más comunes son aglutinación directa de neutrófilos e inmunofluorescencia directa e indirecta. El resto del hemograma y la morfología en médula ósea son normales y los anticuerpos antinucleares son negativos.⁽¹⁾

La neutropenia autoinmune incluye trastornos diversos, principalmente con aparición en la niñez temprana. Sin embargo, típicamente no se requiere de intervención médica debido a que los pacientes tienen una reserva de neutrófilos en médula ósea suficiente; por ende, tienen un bajo riesgo de infección y tienden a entrar en remisión de manera espontánea.⁽⁵⁾ El abordaje debe ser conservador y expectante, y el tratamiento con G-CSF debe ser

utilizado únicamente ante la presencia de infecciones recurrentes.^(1,18)

Neutropenia neonatal aloinmune

En algunos casos, la neutropenia en el recién nacido es producto del pasaje trasplacentario de IgG materna antiánigenos específicos de los neutrófilos del infante, principalmente al NA-2 heredado del padre. Esta enfermedad ocurre en uno de cada 2 000 neonatos y dura 2-4 meses, hasta que se pierdan los anticuerpos maternos. El cuadro clínico puede ser severo o leve. Usualmente no se reconoce hasta que se presentan infecciones bacterianas en un bebé que, por lo demás, está sano. Excepto por una disminución en la cantidad de neutrófilos maduros en sangre periférica, el resto del hemograma y la celularidad en médula ósea son normales. Al igual que para la neutropenia autoinmune, el diagnóstico se hace por aglutinación directa de neutrófilos o pruebas de inmunofluorescencia y el tratamiento generalmente es conservador.⁽¹⁾

Enfermedades autoinmunes

Algunos pacientes con enfermedades autoinmunes cursan con neutropenias leves que, generalmente, no necesitan tratamiento. En el lupus eritematoso sistémico, por ejemplo, la neutropenia es ocasionada por un aumento en la apoptosis mediada por Fas-Fas ligando. También, la neutropenia puede ser provocada por el aumento de anticuerpos en la superficie del neutrófilo y de los inmunocomplejos circulantes. Otras enfermedades autoinmunes que pueden presentar neutropenia son la artritis reumatoide y el síndrome de Sjögren.⁽¹⁾

Neutropenia inducida por medicamentos

En 1922, el primer medicamento relacionado con neutropenia severa que causó sepsis y muerte en seis pacientes fue la aminopirina. Actualmente, se estima que la neutropenia causada por medicamentos tiene una frecuencia anual de 3-12 casos por cada millón de habitantes.⁽¹⁾

Existen dos tipos de mecanismos por los cuales los medicamentos provocan neutropenia. El primero no está relacionado con la dosis y se cree que tiene un origen inmune, similar a la anemia hemolítica inducida por medicamentos. Este tipo es más común en mujeres, adultos mayores y pacientes con historia de alergia, principalmente a medicamentos. La neutropenia suele ocurrir relativamente temprano en el curso del tratamiento con medicamentos a los que el paciente ha sido previamente expuesto.^(1,19)

El otro tipo es en realidad un desorden en la producción de neutrófilos que resulta de la interferencia del medicamento con la síntesis proteica o la replicación celular. Este efecto generalmente no es selectivo e involucra todas las células con alta tasa proliferativa como células madre hematopoyéticas y células del epitelio gastrointestinal. La toxicidad, que es dosis dependiente, se debe a la gran cantidad de radicales libres y metabolitos en circulación. Los principales medicamentos que ocasionan esta reacción son fenotiazinas, medicamentos antitiroideos, cloranfenicol y clozapina. También, esta reacción tóxica está relacionada con pacientes que reciben múltiples medicamentos, lo cual provoca un metabolismo lento de los mismos o deterioro del sistema renal excretor por lo que tienen una concentración alta en plasma.⁽¹⁾

Los síntomas que presentan los pacientes con neutropenia inducida por medicamentos son fiebre, mialgia y dolor de garganta, usualmente sin manifestaciones en la piel o evidencia de alergia en algún otro lugar del cuerpo. Puede haber una linfopenia leve, pero los demás valores hematológicos están normales. El tratamiento usualmente consiste en cuidado de soporte y suspensión del medicamento. No hay muchos estudios que expliquen la neutropenia asociada a medicamentos; a pesar de ello, ensayos clínicos sugieren que la tasa de recuperación se puede predecir a partir del grado de hipoplasia medular presente en el momento en que se descubre la neutropenia. En los pacientes con una médula ósea normal, los neutrófilos reaparecen en sangre aproximadamente 4-7 días después de detener la ingestión del medicamento. Por el contrario, cuando los precursores tempranos están depletados, la recuperación puede tomar más tiempo.^{1,19}

Neutropenia en enfermedades infecciosas

La mayoría de las neutropenias agudas que se reportan en niños son producto de infecciones por virus de la familia Herpesviridae.^{2,5,20} No obstante, la neutropenia puede ser el resultado de enfermedades agudas o crónicas provocadas por bacterias, virus o parásitos y muchos mecanismos están involucrados, tanto desórdenes en la producción, así como en la distribución o utilización de neutrófilos. El aumento de la adherencia de neutrófilos a células endoteliales alteradas puede ocurrir en dengue, sarampión y otras infecciones virales. En infecciones severas con bacterias gramnegativas, la neutropenia probablemente es el resultado del aumento en la utilización de neutrófilos en el sitio de infección. También, algunas infecciones crónicas que pueden cursar con esplenomegalia, tales como tuberculosis, brucelosis, fiebre tifoidea, malaria y kala azar, probablemente causen neutropenia por secuestro esplénico e invasión y supresión

de la médula ósea. Por otro lado, algunas infecciones virales, como la mononucleosis infecciosa, la hepatitis infecciosa, la enfermedad de Kawasaki y la infección por el VIH pueden desencadenar neutropenias severas y prolongadas, las cuales se asocian a pancitopenia producto de la infección de los precursores hematopoyéticos. Otros agentes, como *Rickettsia* y *Bartonella*, pueden infectar células endoteliales y pueden causar leucopenia, neutropenia, trombocitopenia y anemia como parte de un proceso vascular generalizado.^(1,5)

Neutropenia idiopática crónica

La neutropenia idiopática crónica es la más común en adultos, principalmente en mujeres de 18 a 35 años de edad. Se clasifica como idiopática porque no tienen una etiología asociada identificable. Usualmente, estos pacientes no hacen remisión espontánea, pero tienen una reserva normal en médula ósea y no presentan infecciones significativas; no obstante, existen pacientes con granulopoyesis inefectiva y RAN <500 células/ μ l quienes sí presentan infecciones severas. La falta de historia clínica de episodios de fiebre e infecciones y los RAN históricamente normales sugieren que la condición es adquirida en la mayoría de los casos. Los conteos de eritrocitos y plaquetas están normales y puede evidenciarse linfopenia leve.^{1,5}

Desde una perspectiva clínica, es muy difícil distinguir entre una neutropenia crónica idiopática y una neutropenia autoinmune. Por ende, el diagnóstico se hace básicamente por exclusión con ausencia de autoanticuerpos antineutrófilo. En lugares donde no se ensayan anticuerpos antineutrófilo o pruebas moleculares, se puede clasificar erróneamente una neutropenia autoinmune o congénita como neutropenia idiopática crónica.^{1,2}

Para la mayoría de los pacientes, el curso clínico puede ser predicho a partir de los RAN, la examinación de la médula ósea e historia previa. En general, los pacientes con niveles más bajos de neutrófilos en sangre y médula ósea tienen casos más severos, sin embargo, esto no siempre se cumple. Generalmente, no hay evolución a leucemia, anemia aplásica o síndromes mielodisplásicos. El tratamiento va a depender del RAN, el estado de la médula ósea y la predisposición a infección y otras enfermedades. El G-CSF aumenta los neutrófilos en la mayoría de los pacientes y es útil en el tratamiento de pacientes con fiebre e infecciones recurrentes.^{1,5}

Finalmente, existen otros síndromes de causa desconocida con buen pronóstico en niños, tales como la neutropenia familiar benigna y neutropenia crónica benigna, que

probablemente sean causados por mutaciones genéticas aún no dilucidadas.⁽¹⁾

Abordaje Clínico

El manejo de neutropenias congénitas y adquiridas representa diferencias según el tipo de enfermedad subyacente.⁽²¹⁾ En muchos casos, el abordaje clínico requiere de mucho tiempo e investigación, sin embargo, es trascendental llegar al origen de la neutropenia para conocer el riesgo que tiene el paciente de presentar infecciones y de desarrollar otras patologías malignas, así como para definir cuál es el tratamiento más adecuado para cada individuo.⁽²⁾ Se debe tomar en cuenta que el tratamiento con G-CSF no está estandarizado para todas las patologías y casi no hay datos disponibles en cuanto a cuál es el mejor esquema para aplicarlo.⁽²¹⁾ Asimismo, es importante que, ante el hallazgo de una neutropenia por un hemograma de rutina, esta sea idealmente confirmada en al menos tres muestras espaciadas por varias semanas; esto debido a que, normalmente, el RAN fluctúa fisiológicamente por lo que está sujeto a variación.⁽³⁾

La evaluación de los pacientes con neutropenia comienza con un estudio minucioso de la historia familiar y personal. La primera debe tomar en cuenta el origen étnico, la presencia de consanguinidad así como otros casos de neutropenia en la familia; mientras que la historia personal debe enfocarse en la ocurrencia de infecciones virales y bacterianas con sus características (cantidad, agente etiológico, sitio, frecuencia, severidad y patrón cíclico) y el consumo de medicamentos que está recibiendo (tipo, duración, dosis), particularmente los que se asocian con neutropenia.^(2,3,5,21)

Seguidamente de la historia del paciente, se debe hacer una examinación clínica y exámenes de laboratorio que orienten el diagnóstico de la etiología de la neutropenia y determinen su significancia. La examinación clínica debe incluir la identificación de sitios/signos de infección, la evaluación del tamaño del bazo, ganglios linfáticos e hígado y la búsqueda cuidadosa de hallazgos clínicos sugestivos de neutropenia congénita, entre los que se puede mencionar: rasgos dismórficos, desarrollo psicomotor, anomalías en el esqueleto, albinismo, verrugas, función del corazón y síntomas neurológicos.^(1,2,3,5,21)

Los exámenes de laboratorio básicos por realizar en un paciente neutropénico son un hemograma completo con conteos absolutos, función hepática y renal, electrolitos séricos, proteína C reactiva, glucosa en ayuno y gases arteriales. Además, según la orientación diagnóstica dada por la pesquisa clínica, se pueden complementar los estudios

con ensayos como la cuantificación de las inmunoglobulinas séricas, detección de anticuerpos antineutrófilos, detección de anticuerpos antinucleares, factor reumatoide y pruebas serológicas para patógenos virales como CMV, VEB, HHV6, VIH y Parvovirus B19.^(2,3,5,21) También, para el diagnóstico de infecciones se realizan cultivos o ensayos moleculares.⁽²⁾

En pacientes con neutropenia severa crónica, pancitopenia o infección severa, en los cuales las investigaciones de primer nivel no fueron informativas y ningún signo o síntoma es específico para una enfermedad asociada, es necesaria la evaluación de la médula ósea tomando en cuenta su morfología, análisis virológicos, citogenéticos y de inmunofenotipo. La examinación medular permite descartar la presencia de enfermedades malignas hematológicas y valorar la severidad de la enfermedad neutropénica.^(1,2,3,5,21)

Si los pacientes muestran signos o síntomas sugestivos de una determinada enfermedad, se pueden realizar investigaciones de mayor profundidad de acuerdo a esa patología. Por ejemplo, en el caso de sospecha de inmunodeficiencia, se puede hacer un análisis en citómetro de flujo (CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD16+ CD56+), la prueba de NBT, la determinación de subclases de IgG y la evaluación de anticuerpos específicos en respuesta a la vacunación. Además, se puede evaluar la expresión de CD40 ligando, la determinación de subconjuntos CD4+ y CD8+ de linfocitos T vírgenes y de memoria, el fenotipo de la subpoblación de linfocitos B periféricos y análisis moleculares. Cuando hay sospecha de una enfermedad metabólica, se realizan ácidos orgánicos urinarios y aminoácidos urinarios y séricos. Cuando la morfología de la médula ósea muestra un arresto en la maduración en estado de promielocito/mielocito o presencia de una clona citogenética o celularidad significativamente reducida, es pertinente estudiar la presencia de mutaciones ELANE y HAX-1.^(2,5,21)

Es importante que cada paciente tenga un seguimiento de la evolución de la neutropenia con determinaciones de RAN frecuentes tanto en los periodos febriles como afebriles y que su tratamiento esté dirigido por los hallazgos clínicos, los resultados del laboratorio y la etiología que explica su padecimiento. De esta manera, el manejo de cada paciente neutropénico o, idealmente, debería ser individual y según el progreso y severidad clínica que presente.⁽¹⁾

Conclusiones

Existen numerosas enfermedades en las que un paciente puede presentar neutropenia. En algunas, este dato de

laboratorio podría indicar un riesgo altísimo de infección, mientras que en otras, este dato no implica ninguna sintomatología clínica. En general, cualquier enfermedad que comprometa la producción de neutrófilos maduros en médula ósea por un largo periodo implica un alto riesgo para los pacientes de desarrollar infecciones severas, aunque esto también dependerá de muchos otros factores. Por consiguiente, ante la detección de una neutropenia, es trascendental que se determine la causa subyacente y el estado general del paciente mediante una examinación exhaustiva que incluya historia familiar y personal, examinación física y pruebas de laboratorio. Además, es esencial que los profesionales en salud tengan una perspectiva clara de las posibles etiologías en las que el paciente puede cursar con neutropenia, y la importancia que este dato representa en cada individuo, para así brindar el mejor apoyo diagnóstico y terapéutico. Finalmente, queda pendiente el esclarecimiento de muchos aspectos fisiopatológicos, así como la determinación y validación de nuevas terapias orientadas a mejorar la calidad de vida de los pacientes neutropénicos.

Referencias

- Dale DC y Welte K. (2015). Chapter 65: Neutropenia and Neutrophilia. En: Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal JT, Levi MM, Press OW, Burns LJ, Caligiuri M (Eds), *Williams Hematology*, 9e.
- Angelino G, Caruso R, D'Argenio P, Calò Carducci FI, Pascone R, Lanciotti M, Cancrini C, Palma P, Aiuti A, Rossi P y Finocchi A. (2014). Etiology, clinical outcome, and laboratory features in children with neutropenia: Analysis of 104 cases. *Pediatric Allergy and Immunology* 25:283-289.
- Boxer LA. (2012). How to approach neutropenia. *American Society of Hematology Education Book* 2012(1):174-182.
- Nesher L y Rolston KVI. (2014). The current spectrum of infection in cancer patients with chemotherapy related neutropenia. *Infection* 42:5-13.
- Shaver A, Walkovich K y Boxer L. (2014). Chronic neutropenia. *Hematology* 19(7):431-432.
- Tirali RE, Yalçinkaya-Erdemci Z y Çehreli SB. (2013). Oral findings and clinical implications of patients with congenital neutropenia: a literature review. *The Turkish Journal of Pediatrics* 55:241-245.
- Bouma G, Ancliff PJ, Thrasher AJ y Burns SO. (2010). Recent advances in the understanding of genetic defects of neutrophil number and function. *British Journal of Haematology* 151:312-326.
- Zafrani L y Azoulay E. (2014). How to treat severe infections in critically ill neutropenic patients? *BMC Infectious Diseases* 14:512.
- Nayak RC, Trump LR, Aronow BJ, Myers K, Mehta P, Kalfa R, Wellendorf AM, Valencia CA, Paddison PJ, Horwitz MS, Grimes HL, Lutzko C y Cancelas JA. (2015). Pathogenesis of *ELANE*-mutant severe neutropenia revealed by induced pluripotent stem cells. *The Journal of Clinical Investigation* 125(8):3103-3116.
- Juranovic T, O'Suoji CC, Sivakumaran TA, Zhang K, Estallila OC y Jelic TM. (2014). Hematogones in the Peripheral Blood of a 5 1/2-Month-Old Boy with Cyclic Neutropenia Due to Heterozygous, Novel *ELANE* Mutation p.Q97P, c.290 A>C. *Pediatric and Developmental Pathology* 17:393-399.
- Alizadeh Z, Fazlollahi MR, Houshmand M, Maddah M, Chavoshzadeh Z, Hamidieh AA, Shamsian BS, Eshghi P, Pour SB, Jahromi HS, Mansouri M, Movahedi M, Nayeypour M, Pourpak Z y Moin M. (2013). Different Pattern of Gene Mutations in Iranian Patients with Severe Congenital Neutropenia (Including 2 New Mutations). *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology* 12(1):86-92.
- Eyles JL, Roberts AW, Metcalf D y Wicks IP. (2006). Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils-forgotten mediators of inflammatory disease. *Nature Clinical Practice Rheumatology* 2:500-510.
- Klein C. (2009). Molecular basis of congenital neutropenia. *Haematologica* 94(10):1333-1336.
- Hetz C, Chevet E y Harding HP. (2013). Targeting the unfolded protein response in disease. *Nature Reviews - Drug Discovery* 12:703-719.
- Banka S, Chervinsky E, Newman WG, Crow YJ, Yeganeh S, Yacobovich J, Donnai D y Shalev, S. (2011). Further delineation of the phenotype of severe congenital neutropenia type 4 due to mutations in G6PC3. *European Journal of Human Genetics* 19:18-22.
- Smith BN, Evans C, Ali A, Ancliff PJ, Hayee B'H, Segal AW, Hall G, Kaya Z, Shakoori AR, Linch DC y Gale RE. (2012). *British Journal of Haematology* 158:146-149.
- Zwitzerloot AM, Mavinkurve-Groothuis AMC, Galama JM, Verweij PE, Hoogerbrugge PM y Warris A. (2012). Importance of neutropenia for development of invasive infections at various phases of treatment for hemato-oncological diseases in children. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 44:355-362.
- Mariotti J, Caberlon S, Bertinato E, Podda G, Pugliano MT y Cattaneo M. (2014). Primary autoimmune neutropenia in adults: case report and review of the literature. *Transfusion* 54:2906-2910.
- Akamizu T, Ozaki S, Hiratani H, Uesugi H, Sobajima J, Hataya Y, Kanamoto N, Saijo M, Hattori Y, Moriyama K, Ohmori K y Nakao K. (2002). Drug-induced neutropenia associated with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): possible involvement of complement in granulocyte cytotoxicity. *Clinical and Experimental Immunology* 127:92-98.
- Alexandropoulou O, Kossiva L, Haliotis F, Giannaki M, Tsolia M, Panagiotou IP y Karavanaki K. (2013). Transient neutropenia in children with febrile illness and associated infectious agents: 2 years' follow-up. *European Journal of Pediatrics* 172:811-819.
- Fioredda F, Calvillo M, Bonanomi S, Coliva T, Tucci F, Farruggia P, Pillon M, Martire B, Ghilardi R, Ramenghi U, Renga D, Menna G, Pusiol A, Barone A, Gambineri E, Palazzi G, Casazza G, Lanciotti M y Dufour C. (2012). Congenital and acquired neutropenias consensus guidelines on therapy and follow-up in childhood from the Neutropenia Committee of the Marrow Failure Syndrome Group of the AIEOP (Associazione Italiana Emato-Oncologia Pediatrica). *American Journal of Hematology* 87(2):238-243. 

XL Aniversario de Microscopia Electrónica y el INISA: los principales aportes científicos en los primeros años

XL Anniversary of Electron Microscopy and INISA: the main scientific contributions in the early years

Francisco Hernández-Chavarría¹

Resumen:

Recientemente se ha celebrado el cuadragésimo aniversario del Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMic) y del Instituto de Investigaciones en Salud (INISA); ambas instituciones, junto con el Centro de Investigación en Biología Molecular y Celular (CIBCM), nacieron en la Facultad de Medicina de la Universidad de Costa Rica (UCR). Al inicio, las dos primeras compartieron temas de investigación, como epidemiología de rotavirus, *Campylobacter* y *Cryptosporidium* en el marco de la etiología de las diarreas infantiles. Además de aportes en este tema, el INISA impulsó la lactancia materna y promovió el alojamiento conjunto madre/niño en los servicios de maternidad; además inició e impulsó el establecimiento de la rehidratación oral en el país; con esta intervención, en 1978, las enfermedades diarreicas fueron desplazadas de entre las diez principales causas de mortalidad infantil en el Hospital Nacional de Niños.

Palabras clave: Rotavirus, *Campylobacter*, *Cryptosporidium*, lactancia materna, alojamiento conjunto madre-hijo, rehidratación oral.

Abstract:

Recently were celebrated the XL anniversary of the Center for Research on Microscopic Structures (CIEMic) and the Institute of Health Research (INISA), both institutions, together with Center for Research in Molecular and Cellular Biology (CIBCM), were born in the Faculty of Medicine, University of Costa Rica (UCR). At the beginning the first two shared research topics as epidemiology of rotavirus, *Campylobacter* and *Cryptosporidium* under etiology of childhood diarrhea. Besides the contributions on this issue, INISA promote breastfeeding and rooming-in mother-infant maternity services; also initiated and promote the establishment of oral-rehydration in the country; with this intervention, in 1978, the diarrheal diseases was displaced among the ten leading causes of infant mortality, in the National Children Hospital.

Key words: Rotavirus, *Campylobacter*, *Cryptosporidium*, breastfeeding, rooming-in mother-child, oral-rehydration.

Artículo recibido el 27/01/2016 / Aceptado para su publicación el 10/02/2016.

I. Escuela de Artes Plásticas, Universidad de Costa Rica.

Correspondencia: franciscohernandezch@gmail.com

En un lapso relativamente corto se celebran los tetragésimos aniversarios de tres centros de investigación de la Universidad de Costa Rica, que por diversas circunstancias vieron la luz en la Facultad de Medicina, cuando su decano era el doctor Rodrigo Gutiérrez, y actualmente constituyen entes independientes: CIEMic, INISA y CIBCM.

Microscopia Electrónica, actualmente Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMic), es la más vieja de esta tríada, pues en el año 2014 celebró su cuadragésimo aniversario. Se inició como la Unidad de Microscopia Electrónica (UME), un pequeño edificio detrás de la Facultad de Medicina, lugar que albergó el primer microscopio electrónico que tuvo el país⁽¹⁾. Le sigue el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), que en el 2015 tuvo su celebración; este se asentó, inicialmente, en el primer piso del edificio de la Facultad de Medicina, para ser más preciso, en dos oficinas y un pequeño laboratorio. Por otro lado, la historia de Biología Molecular (conocido hoy como CIBCM) es un poco más compleja, pues se inició en la Facultad de Agronomía como el Centro de Investigación en Virus y Células (CIVIC), bajo la dirección del doctor Rodrigo Gámez; sin embargo, se unió a esta tríada con su adscripción al INISA y se trasladó a la Facultad de Medicina, específicamente al edificio que ocupaban las antiguas “perreras”, como se conocía en esa época la edificación que albergaba parte del bioterio de esta facultad, cuando los perros callejeros eran parte de las prácticas docentes. Esa área fue remodelada por el doctor Gámez y se independizó del INISA bajo la nueva denominación de Centro de Investigación en Biología Molecular y Celular (CIBCM). A pesar de la anterior contextualización histórica, esta narración se centra en la celebración de los respectivos cuarenta años del INISA y Microscopia Electrónica, la cual me atrevo a escribir, pues mi vida académica nació en ambas instituciones; además, aparte de ese origen común, también hubo coincidencia en algunos temas de investigación, como por ejemplo, la epidemiología y ultraestructura de rotavirus⁽²⁻⁴⁾, *Campylobacter*⁽⁵⁻⁷⁾ y *Cryptosporidium*^(8,9).

En cuanto a la historia y desarrollo de la microscopia electrónica en Costa Rica, previamente escribí algunos artículos; el último de los cuales cuando celebró sus 35 años⁽¹⁰⁾; por lo que en esta oportunidad solo señalo los aportes de esos primeros años, cuando coincidí en ambas instituciones.

El Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) fue fundado por iniciativa del Consejo Universitario y el CONICIT en 1974, con el fin de abordar la investigación en salud; en la mira figuraban las enfermedades infecciosas y sus implicaciones en la nutrición y el desarrollo humano, como indica el nombre de uno de estos laboratorios. La figura promotora e inspiradora del INISA fue el doctor Leonardo Mata, su fundador y primer director; los aportes

científicos más significativos en esos primeros años fueron: esclarecer la etiología de las diarreas en el país, investigar y promover la rehidratación oral, promoción de la lactancia materna y alojamiento conjunto madre/hijo en los salones de maternidad; esto último iniciado en el Hospital San Juan de Dios.

I. Etiología de las diarreas

Antes de 1970, la etiología de las enfermedades diarreicas se reducía a algunas cepas enteropatógenas de *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella*, además de algunos casos debidos a parásitos. La suma de todos estos agentes explicaba tan solo un 20% de los casos y el resto permanecían como diarreas de etiología desconocida o inespecífica, y los científicos más aventurados, hablaban de una posible etiología viral; lo que en realidad fue cierto y cambió el panorama mundial de las diarreas.

Los virus de las diarreas

Un hecho premonitorio fue el hallazgo de virus semejantes a reovirus en un brote de diarrea bovina en Nebraska⁽¹¹⁾, lo que fortalecía la hipótesis de la posible etiología viral en las diarreas infantiles, cuyas evidencias epidemiológicas se habían documentado desde la década de 1920, e incluso se había aislado un agente filtrable capaz de inducir diarrea en terneros⁽¹²⁾. Sin embargo, el descubrimiento definitivo que sustentaría la etiología viral de las diarreas ocurrió prácticamente por duplicado, pues se hicieron dos publicaciones secuenciales en la revista *The Lancet*. El primer informe, firmado por el equipo de la Dra. Ruth Bishop de Australia, describía el hallazgo de partículas virales semejantes a reovirus descubiertas en biopsias duodenales de niños con diarrea, y por el origen anatómico del hallazgo le denominaron “duovirus”⁽¹³⁾. El segundo informe, y que fue el que desató la avalancha de investigaciones equivalentes en diferentes partes del mundo, fue la visualización de esas partículas virales en frotis fecales contrastados con tinción negativa⁽¹⁴⁾. Este último informe describía una metodología sumamente simple y rápida, lo cual permitía un diagnóstico expedito; lo único que se necesitaba era un microscopio electrónico y esto hizo que se buscaran esos virus en prácticamente todos los centros de microscopia electrónica en salud, incluyendo el INISA⁽¹⁵⁾. Los frutos de tales investigaciones fueron copiosos, no solo al documentar el hallazgo de rotavirus, sino que apareció toda una pléyade de agentes virales causantes de diarrea; ya para 1977, se describía en Costa Rica el primer brote epidémico de diarrea asociado a rotavirus⁽¹⁶⁾, cuyos hallazgos corroboraban las curvas epidemiológicas descritas en países templados del hemisferio norte, donde comenzaba a vislumbrarse un patrón anual con picos de alta prevalencia para finales y principios de cada año, por lo que recibió los apelativos de “los virus del frío” o los “virus de invierno”, hecho que fue secundado por

los informes provenientes del hemisferio sur, principalmente de Australia, que documentaban esos brotes epidémicos a mediados de año, lo que corresponde al invierno en esas latitudes. En Costa Rica, esa primera descripción mostraba un pico que se iniciaba en noviembre y decaía para marzo; patrón que se siguió describiendo y que calzaba con las epidemias de diarrea y mortalidad por esta causa que anualmente se presentan en el país y que unos 20 años después de ese primer informe, se volvió a corroborar ⁽¹⁷⁾.

Otros agentes bacterianos

En paralelo a la investigación de la etiología viral de las diarreas, se pensaba en otras variedades de *E. coli* aparte de las cepas enteropatógenas clásicas, pues se iniciaba la investigación de cepas con capacidad toxigénica y hemorrágica, lo cual llevó a la identificación de toda una gama de factores de virulencia en *E. coli*, que en aquellos años se describieron haciendo uso de una serie de acrónimos, iniciados con ECE, que significaba *E. coli* entero, para concluir con el factor de virulencia en cuestión, así aparecieron las ECEP, ECET, ECEI, ECEH y ECEAg, que respectivamente se referían a enteropatógeno clásico, enterotoxigénico, enteroinvasivo, enterohemorrágico y enteroagregativo⁽¹⁸⁾; el INISA también se abocó al estudio de las cepas toxigénicas de *E. coli* ^(19,20).

Campylobacter, un agente termofílico y microaerofílico, descrito en la década de 1940, como causal de abortos bovinos y esporádicamente relacionado con diarreas, fue otro de los “nuevos agentes bacterianos” involucrados con la etiología de las diarreas, pues en realidad, su relación con las diarreas permitió describir una segunda especie, *C. jejuni*, ya que la primera había sido *C. fetus*; posteriormente, la investigación en diarreas permitió redefinir el género y la familia Campylobacteraceae. Las dos especies de *Campylobacter* más importantes en diarreas de humanos son *C. jejuni* y *C. coli*. Este nuevo agente también figuró en la investigación realizada en el INISA ⁽²⁰⁾ y también en la UME ⁽²¹⁾; más aún, desde esta última, se describieron métodos simples y baratos para su aislamiento e identificación, como el uso de una bolsa plástica inflada para generar la atmósfera microaerofílica requerida por este agente, que resultaba en uno de los obstáculos para su aislamiento, pues el método usual emplea una jarra de anaerobiosis con un sobre generador de la atmósfera requerida por la bacteria, lo cual resultaba caro; sin embargo, sosteniendo la respiración unos segundos e inflando una bolsa plástica, se lograba generar la atmósfera microaerofílica requerida por *Campylobacter* ⁽²²⁾.

Cryptosporidium

Este fue otro agente infeccioso redescubierto con la investigación de la etiología de las diarreas. En este caso, originalmente, había sido descrito a inicios del siglo XX, pero

pasó prácticamente desapercibido como agente causal de diarrea hasta finales de la década de 1970, y su importancia aumentó posteriormente con el sida ⁽²³⁾. También el INISA se unió a la investigación de este agente, documentando los primeros casos en Costa Rica ⁽²⁴⁻²⁵⁾; también la UME se involucró en los análisis de ultraestructura y epidemiología, tanto en humanos como en diarreas bovinas ⁽⁹⁾.

II. Rehidratación oral

En la década de 1970, la principal causa de mortalidad infantil eran las enfermedades diarreicas; el tratamiento de elección era la rehidratación endovenosa, lo que implicaba hospitalización del niño, un procedimiento caro, y a la vez, el traslado del paciente lo tornaba más crítico, especialmente cuando se trataba de niños de zonas rurales alejadas de los centros asistenciales.

La solución fue la rehidratación por vía oral, lo que hoy es tan familiar como ir a la farmacia a comprar un sobre con sales para rehidratación que solo hay que disolver en un vaso de agua. El proyecto se inició con la participación del Dr. Mata en un congreso en el Colera Reserch, un centro de investigación en diarreas en Bangladesh, donde se investigaba la rehidratación oral bajo lineamientos definidos por la UNICEF. La importación, adaptación y evaluación de tal procedimiento contó, como pieza clave, con la participación del doctor David Nalin, del Colera Reserch, para un estudio conjunto en el Hospital Nacional de Niños (HNN) en el cual se involucró el Dr. Daniel Pizarro ⁽²⁶⁻³⁰⁾. La Dra. Carla Odio documentó dramáticamente el impacto positivo de la rehidratación oral en la letalidad por diarreas cuando mostró que esta causa de muerte, que siempre había ocupado el primer lugar en la lista de las diez causas más importantes de mortalidad infantil en el HNN, desaparecía de esa lista en el segundo semestre de 1978, como consecuencia del establecimiento del protocolo para la rehidratación oral a inicios de ese año ⁽³¹⁾.

Pero el objetivo primordial que realmente impactó en la salud fue el trasladar ese procedimiento a la comunidad, o sea, que en el propio hogar se aplicara la rehidratación oral, con lo cual se obviaba el problema de las hospitalizaciones de niños con diarrea; sin embargo, investigaciones de campo, realizadas en África, mostraban que si el volumen de reconstitución de las sales para rehidratación oral no era adecuado, el tratamiento empeoraba los casos, pues si se utilizaba un volumen menor se obtenía una solución hipertónica que en el intestino provocaba la salida de agua intersticial, lo que equivalía a una diarrea por hipertonicidad. Por lo tanto, el volumen de reconstitución era esencial y al respecto se realizó una investigación que estuvo a cargo del comunicador Gabriel Mejía, quien evaluó los tipos de envases más comunes en los hogares, especialmente en

zonas rurales. Concluyó que el concepto de litro no era manejado adecuadamente; sin embargo, prácticamente en todos los hogares de los niños se manejaba el biberón de ocho onzas, que además se trataba de un envase que las madres manipulaban con mucha asepsia, así que la solución más simple fue la adaptación de la fórmula a un volumen de ocho onzas, o sea un biberón o un vaso, como reza la información en los sobres para rehidratación que hoy se expenden en cualquier farmacia. Así, siguiendo estos lineamientos, los primeros sobres se confeccionaron en el INISA; se pesaba en una balanza granataria la proporción de la mezcla de sales para rehidratación, la cual se había producido en el Centro de Investigación en Alimentos (CITA). Esos primeros sobres fueron el inicio de la rehidratación oral en las distintas comunidades de Puriscal⁽³²⁾.

III. Lactancia materna

A finales de la década de 1970, la lactancia materna había decaído notablemente en el país, al grado de que menos del 30% de las madres amantaban a sus hijos, y en la mayoría de los casos, el periodo de lactancia no superaba los tres meses. En ese contexto, se iniciaba en el INISA un proyecto de investigación longitudinal en crecimiento y desarrollo en Puriscal, emulando el estudio de Santa María de Cauqué, Guatemala, que había liderado el Dr. Mata. Para el proyecto de Puriscal se contó con la colaboración del Hospital San Juan de Dios, ya que la mayoría de los niños de Puriscal nacían en ese hospital. Uno de los temas de estudio era el apego madre/niño y la lactancia materna. Por aquellos años, los niños nacían y se llevaban al Servicio de Neonatología y las madres al de Maternidad, o sea, madre e hijo estaban separados. La propuesta del INISA era el alojamiento conjunto y la promoción de la lactancia materna, lo cual se inició con una bomba mecánica para extracción de la leche materna traída por el Dr. Mata de Suecia, con la cual se inició el primer Banco de Leche. Tal vez, el primer aporte importante fue que las madres fuesen conscientes de la cantidad de leche que producían e incluso el banco funcionaba y se creó un fondo del cual se alimentaba a los bebés prematuros o aquellos pocos cuyas madres tenían algún problema con la lactancia⁽³³⁾.

En paralelo, se había iniciado una serie de estudios para documentar las ventajas de la lactancia materna y en ese sentido se evaluó al microscopio electrónico el efecto destructor sobre los rotavirus que inducía la leche materna y la actividad aglutinante de los viriones, evaluado mediante la técnica de inmunomicroscopia electrónica⁽³⁴⁾, lo cual se corroboró posteriormente mediante las pruebas de ELISA, cuantificando la IgA antirrotavirus presente en la leche materna⁽³⁵⁾. También se analizó la ultraestructura de los glóbulos lácteos en leche y calostro, como complemento a los estudios que proponían la ventaja que representaba para

el neonato el contar con un suministro de los fosfolípidos integrantes del factor tensoactivo⁽³⁶⁾.

Con este inicio, los bancos de leche materna se promulgaron, pero la aparición del virus de la inmunodeficiencia humana a inicios de la década de 1980, acabó con la función original de esos bancos, que había sido el tener un fondo para compartir. Sin embargo, los estudios realizados ayudaron a la promoción de la lactancia materna.

Conclusión

La celebración de un aniversario número cuarenta es una oportunidad importante para una mirada retrospectiva y enumeración de lo que se ha hecho. En mi opinión, el mayor logro lo resume la cita textual de la doctora Carla Odio⁽³¹⁾:

A partir de mayo de ese año [1978], aproximadamente la mitad de los pacientes se manejaron por vía oral, con lo cual, se obtuvo un medio más fisiológico de rehidratación, sin problemas de iatrogenia hidroelectrolítica; se eliminó la agresión física y lo que es más importante, las madres aprendieron sobre detección y manejo de la deshidratación, con lo que se disminuyó considerablemente el número de reingresos; y en aquellos que reingresaban, el desequilibrio hidroelectrolítico no era tan severo, con lo que globalmente mejoró el pronóstico⁽¹⁹⁾ y probablemente la nutrición.

Ese párrafo resume muy bien el gran éxito de la rehidratación oral. El hecho de que tan solo un semestre después de su implementación en el HNN la letalidad por diarrea desapareciera de la lista de las diez causas más importantes de muerte infantil, hace suponer que posiblemente este procedimiento represente uno de los aportes a la salud que más vidas ha salvado en estos 40 años; y como mencioné inicialmente, se gestó en el INISA y no debe olvidarse a quienes lo promovieron: los doctores Leonardo Mata, David Nalin, Miron Levine y el equipo del HNN, encabezado por Daniel Pizarro.

Mi relación con el INISA se limitó a sus primeros años, por lo cual en este texto me centré en los logros alcanzados en ese periodo incipiente. Queda la puerta abierta para un análisis complementario de estos cuarenta años de investigación en la salud en Costa Rica.

Referencias

1. Hernández F. (1988). Historia de la microscopia electrónica. II La microscopia electrónica en Costa Rica. *Rev. Cost Cienc Med.* 9, 9597.
2. Hernández F, Akahori H. (1986). Ultraestructura de rotavirus. *Rev Biol Trop.* 34, 89-97.
3. Hernández F, Hiroshi A. (1988). Ultrastructure of outer layer of calf rotavirus. *J Electron Microsc.* 37, 45-46.

4. Hernández F, Akahori H, Hosaka Y. (1990). The finest ultrastructural details of the inner layer of rotavirus revealed by minimal electron doses. *J Electron Microsc.* 39, 105107.
5. Hernández F, Herrera ML, Rivera P, Rodríguez R. (1984). Alteraciones morfológicas ocurridas espontáneamente en *Campylobacter fetus* spp *jejuni*. *Rev Cost Cienc Med.* 5, 61-70.
6. Hernández F, Cipagauta L, Rivera P, Herrera ML, Rodríguez R. (1985). Estudio ultraestructural de *Campylobacter fetus* spp *jejuni*. *Rev. Latamer. Microbiol.* 27, 1120.
7. Hernández F, Rivera P, Herrera ML. (1985). *Campylobacter fetus* spp *jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, bacterias helicoidales y coronavirus en intestino murino. *Rev Biol Trop.* 33, 143-146.
8. Hernández F, Alvarez RM, Oviedo MT. (1987). Epizootiología de las diarreas bovinas en Costa Rica. *Rev Latamer Microbiol.* 29, 113 117.
9. Hernández F, Oviedo MT, Vargas G. (1986). Diagnóstico de *Cryptosporidium*. *Rev Cost Cienc Med.* 7, 213-217.
10. Hernández-Chavarría F. (2011). 35 años de microscopía electrónica en Costa. Rica *Tecnol Marcha.* 24, 53-8.
11. Mebus CA, Underdahl NR, Rhodes MB, Twiehaus MJ. (1969). Calf diarrhea (Scours): Reproduced with a virus from a field outbreak. *Univ Nebraska Agric Exp Station Res Bull.* 233, 1.
12. Light JS, Hodes HL. (1949). Isolation from cases of diarrhea of a filtrable agent causing diarrhea in calves. *J Exp Med.* 90, 113-133.
13. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Rucj BJ. (1973). Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet.* 2, 1281.
14. Fleweth TH, Bryden AS, Davies H. (1973). Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* 2, 1497.
15. Hernández F, Mata, L. (1978). La etiología viral de las diarreas y la microscopía electrónica. *Rev Med Hosp Nal Niños.* 13, 33-44.
16. Hernández F, Mata L, Lizano C, Mohs E. (1977). Prevalencia de rotavirus y descripción de una epidemia de diarrea por este agente en Costa Rica. *Acta Med Cost.* 20, 297-304.
17. González P, Sánchez A, Rivera P, Jiménez C, Hernández F. (1997). Rotavirus and Coronavirus outbreak: etiology of annual diarrhea in Costa Rican children. *Rev Biol Trop.* 45, 989-991.
18. Levine MM. (1987). *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis.* 155, 377-389.
19. Reyes L, Evans DJ, Ramírez JA, Mata L. (1978). *Escherichia coli* enterotoxigénica en niños hospitalizados en Costa Rica. *Rev Med Hosp Nal Niños.* 13, 23-32.
20. Mata L, Simhon A, Padilla R, Gamboa MM, Vargas G, Hernández F, Mohs E, Lizano C. (1976). Diarrhea associated with rotaviruses, enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Campylobacter* and other agents in Costa Rican children, 1976-1981. *Am J Trop Med Hyg.* 32,146-153.
21. Rivera P, Hernández F, Rodríguez R, Herrera ML. (1983). Observaciones sobre la epidemiología de *Campylobacter fetus* spp *jejuni*. *Rev Med Hosp Nal Niños.* 18, 21-29.
22. Hernández F. (1996). A simple and inexpensive method to generate a microaerophilic atmosphere for the isolation of *Campylobacter* sp. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 38, 241-242.
23. Tzipori S, Widmer G. (2008). A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends Parasitol.* 24, 184-189.
24. Mata L, Bolaños H, Pizarro D, Vives M. (1984). Cryptosporidiosis in children from some highland Costa Rican rural and urban areas. *Am J Trop Med Hyg.* 33, 24-29.
25. Mata L, Bolaños H, Pizarro D, Vives M. (1984). Cryptosporidiosis en niños de Costa Rica: estudio transversal y longitudinal. *Rev Biol Trop.* 32,129-135.
26. Nalin DR, Levine MM, Mata L, De Cespedes C, Vargas W, Lizano C, Loria AR, Simhon A, Mohs E. (1978). Comparison of sucrose with glucose in oral therapy of infant diarrhoea. *Lancet.* 2,277-279.
27. Pizarro D, Posada G, Mata L, Nalin DR, Mohs E. (1979). Oral rehydration of neonates with dehydration diarrhoeas. *Lancet.* 2, 1209-1210.
28. Pizarro D, Posada G, Nalin DR, Mata L, Mohs E. (1980). Rehidratación por vía oral y su mantenimiento en pacientes de 0 a 3 meses de edad, deshidratados por diarrea. *Bol Med Hosp Inf.* 37,879-891.
29. Pizarro D, Posada G, Mata L. (1983). Treatment of 242 neonates with dehydrating diarrhoea with an oral glucose-electrolyte solution. *J Pediat.* 102,153-156.
30. Pizarro D, Posada G, Segreda O, Mata L. (1986). Comparación de la eficacia de dos soluciones de rehidratación oral: la solución convencional recomendada por la OMS que contiene bicarbonato de sodio y otra que contiene citrato de sodio. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 43, 402-406.
31. Odio C, Guzmán C, Mohs E. (1979). Letalidad por diarrea en el Hospital Nacional de Niños en 1978. *Rev Med Hosp Nal Niños.* 14, 11-18.
32. Jiménez P, Mata L, García ME, Vargas W. (1982). Estudio de Puriscal. VI. Transferencia de la tecnología de rehidratación oral del hospital al hogar rural. *Rev Med Hosp Nal Niños.* 17, 71-86.
33. Mata L, Allen MA, Araya JR, Carvajal JJ, Rodríguez ME, Vives M. (1982). Estudio de Puriscal. VIII. Efecto de intervenciones hospitalarias sobre la lactancia y la salud en el periodo neonatal. *Rev Med Hosp Nal Niños.* 17, 99-116.
34. Hernández F, Mata L. (1978). Factor aglutinante de rotavirus en calostro y leche de mujeres costarricenses. *Rev Med Hosp Nal Niños.* 13, 45-52.
35. Simhon A, Mata L. (1978). Anti-rotavirus antibody in human colostrum. *Lancet.* 1, 39- 40.
36. Hernández F, Akahori H. (1983). Análisis ultraestructural de membranas de glóbulos grasos lácteos de calostro y leche materna. *Rev Biol Trop.* 31, 21-29. 

Carta al editor

Si no coloniza, no infecta y si no infecta no enferma

Marco Luis Herrera-Hidalgo.*

De todos es conocido que la resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos es un problema de índole global y que los planes y programas de contención de este problema son caros y complicados de implementar, sobre todo en países con idiosincrasias como los nuestros.

Sin pretender ser alarmista, es casi imposible, frenar el desarrollo de resistencia a los antibióticos por las bacterias.

Hablando en el plano mitológicos, Esculapio tuvo dos hijas: Higea y Panacea.

Panacea es la diosa griega de la medicación eficaz e inocua y por supuesto Higea es la diosa de la prevención de la enfermedad usando medidas de higiene. Esto nos hace pensar que desde hace muchos años atrás, los seres humanos intuyeron que solo hay dos formas de enfrentar los procesos infecciosos: los prevenimos o los controlamos usando medicación una vez que estos hayan producido una enfermedad en un ser humano.

Todos los microorganismos utilizan un proceso que le permite causar enfermedad. El proceso se inicia por un primer paso y este es colonización, seguido por infección y luego viene enfermedad. Para que un microorganismo sea capaz de colonizar debe cumplir con un requisito indispensable y es que debe reproducirse bajo las mismas condiciones en las cuales los seres humanos vivimos. Es claro que infección es un paso donde el microorganismos entra en franca competencia con nuestro sistema inmune y en esta batalla, si gana el sistema inmune

conservamos nuestra salud y si por el contrario, gana el agente agresor caemos enfermos y es entonces, cuando vemos fiebre, dolor, inflamación, cambios en el hemograma y elevación de las proteínas de fase aguda.

Como parece muy difícil parar el desarrollo de la resistencia en los microorganismos y cada vez se nos hace más difícil el control del proceso de una enfermedad infecciosa ya implantada, solo nos queda la prevención de este proceso de enfermedad. En este campo podemos utilizar las vacunas y las medidas de higiene como eficaces métodos de prevención.

Las vacunas cumplen un papel fortaleciendo al sistema inmune, dándole armas para que pueda ganar la guerra contra el agente agresor de mejor manera. Y las medidas de higiene tienen su impacto disminuyendo las colonizaciones. De allí la frase: si no coloniza no infecta y si no infecta no puede producir enfermedad. El aseo personal, el lavado y planchado de nuestra ropa, el aseo de nuestras casas y centros de trabajo tienen como fin disminuir colonizaciones y la razón por la cual el lavado de manos es tan eficaz para disminuir las infecciones ligadas a la atención de la salud, es porque se disminuye la cantidad de microorganismos en la manos de las persona, disminuyendo la colonización por microorganismos patógenos o potencial mente patógenos.

Las medidas de higiene tienen la enorme ventaja de que son baratas y están a disposición de todas las personas y solo se necesita una pequeña cuota de educación y un fuerte compromiso para cumplirlas. ④

(*) Jefe División de Microbiología. Laboratorio Clínico
Hospital Nacional de Niños "Dr. Carlos Sáenz Herrera"
Correspondencia: mherrera1157@gmail.com



Instrucciones para los autores

Actualizadas a diciembre de 2015

La Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica (RCMQCCR) se publica trimestralmente. Esta se dedica a la divulgación de trabajos científicos en las diferentes disciplinas de la microbiología, inmunología, parasitología y análisis clínicos en humanos y en animales, así como de las áreas de microbiología de aguas, industrial y de alimentos.

Los artículos enviados a la RCMQCCR deben cumplir con las recomendaciones del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (www.icmje.org/recommendations/) y con las características editoriales para revistas impresas del Catálogo Latindex (www.latindex.com).

Solo se aceptarán para su consideración trabajos originales, en español o en inglés, que serán clasificados en categorías de acuerdo con su naturaleza como trabajos de investigación, casos clínicos, aspectos legales de la profesión, artículos de educación continua, cartas al editor y artículos especiales. Las revisiones bibliográficas serán solicitadas al autor por el editor de la revista. Las cartas al editor se publicarán de acuerdo con el criterio del editor jefe.

El autor principal debe presentar una carta en la que solicite la revisión del artículo para su publicación. En esta se debe consignar el nombre del artículo, el nombre del autor principal y coautores, título profesional o grado académico, el sitio o institución donde se realizó la investigación y su lugar de trabajo actual, el puesto profesional que ocupa en el momento del sometimiento, dirección electrónica y número de teléfono. Este último servirá de vínculo con la revista, pero no será publicado en caso de ser aceptado el trabajo. Esta carta debe venir firmada por el autor y los coautores.

Al someter el original del artículo a revisión, el autor y los coautores deben asegurar que el manuscrito no ha sido previamente publicado y que no está siendo analizado simultáneamente por otra revista. Todos los autores deben firmar la Declaración de Responsabilidad y Conflicto de Intereses; de este modo asumen, formalmente, la autoría del artículo y que, además, en el caso de trabajos de investigación, observacionales o descriptivos, cumplen con los requisitos de la Ley Reguladora de Investigación Biomédica (Ley 9234, publicada en La Gaceta N.º 79 del 25 de abril de 2014), y en caso necesario, con la Normativa para la Aprobación de Estudios Observacionales en los Centros Asistenciales de la Caja Costarricense de Seguro Social. El texto completo de esta normativa se encuentra en la dirección <http://www.cendeisss.sa.cr/etica/MODIFICACION-Y-ADICIONnNORMATIVA.PDF>. Este documento se enviará por correo electrónico después de haber presentado la solicitud de revisión del artículo y debe ser devuelto a las oficinas del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica. Este debe ser escaneado y enviado a la dirección revistacmqc@gmail.com.

Las opiniones, información y conclusiones emitidas en los artículos publicados, así como la veracidad de los resultados y las citas bibliográficas, son responsabilidad exclusiva del autor y coautores.

Todos los artículos deben ser presentados de forma digital en formato de Word.doc o .docx, letra Times New Roman

12, interlineado a 2 líneas, justificado, a la dirección electrónica revistacmqc@gmail.com. Las cartas al editor no deben ser mayores de dos páginas. Las tablas, cuadros y fotografías deben presentarse correctamente identificados. Los artículos de investigación deben presentarse respetando la siguiente estructura: introducción, material y métodos, resultados y discusión. Los artículos especiales, casos clínicos y otros, pueden adaptarse a otros formatos que serán aprobados por el Comité Editorial. Todos los artículos deben ir precedidos por un resumen en español e inglés de no más de 250 palabras y las palabras clave.

1. El título del artículo debe ser conciso, pero informativo, y debe despertar el interés del lector. En el título no se deben emplear abreviaturas.
2. El resumen debe incluir el propósito de la investigación, los materiales y métodos, los resultados y las conclusiones más importantes. Las Cartas al Editor no llevan resumen ni palabras clave.
3. La Introducción debe resumir los antecedentes del estudio y explicar la hipótesis que se pretende analizar. Si usa abreviaturas debe explicar su significado la primera vez que las mencione.
4. Al describir los materiales y métodos, debe explicar correctamente los equipos empleados, métodos y reactivos usados en la investigación. En el caso de estudios con población humana, deben explicarse las características de esta, así como el procedimiento de la obtención del consentimiento informado para la participación en el estudio. La explicación detallada es fundamental para que los resultados puedan ser reproducibles por otro investigador.
5. Los resultados deben ser presentados de una forma cuidadosa y congruente con el texto escrito. Se pueden usar gráficos, cuadros o fotografías para explicarlos.
6. La discusión debe ser referida al trabajo realizado; se deben destacar los hallazgos encontrados y compararlos con otros estudios revisados.
7. Si se incluyen conclusiones, estas deben ser breves y precisas.
8. Las referencias se citarán siguiendo el formato de normas APA (American Psychological Association), que se pueden encontrar en: www.normasapa.com.

El Comité Editorial se reserva el derecho de aceptar, solicitar modificaciones o rechazar los artículos sometidos a su consideración y su fallo es inapelable.

Los artículos aceptados serán enviados de forma anónima a dos revisores externos especialistas en el tema, quienes, si es del caso, harán las sugerencias necesarias para que se corrija y se publique. Este será devuelto al autor principal y se volverá a someter a revisión.

La revista garantiza la confidencialidad en el proceso de revisión de los artículos y contará con un plazo máximo de 60 días para dar su veredicto.

Los artículos aceptados para su publicación pasarán a ser propiedad intelectual de la revista. Los artículos rechazados se destruyen y no se conservará copia de estos. 4



AVISOS DEL COLEGIO

Cuotas que rigen a partir del 1º enero de 2016.

Se avisa a los colegiados que conforme al artículo XLIII del *Reglamento Interno del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica*, corresponde aplicar el aumento automático de la colegiatura y cuota de laboratorio.

Colegiatura **₡12.400** Laboratorio **₡6.200** Técnicos **₡2.000** Miembros exterior **₡2.500**

Estimadas y estimados colegiados

Les recordamos que la base de datos del colegio debe actualizarse de forma continua; por tal razón, les solicitamos que realice la actualización mediante la fórmula que se diseñó para tal fin. Pueden solicitarla mediante el correo electrónico colmq@racsa.co.cr o a través del fax 2225-5138.8 ☎

Aviso de morosidad

Se les recuerda a todos los microbiólogos del país la obligatoriedad del pago puntual de la Colegiatura, según el artículo 15 de la Ley Constitutiva del CMQC-Ley 771. El incumplimiento de este artículo lleva al estado de morosidad y suspensión de la licencia de trabajo. ☎

Próximos eventos



XLI Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica, Monterrey 2016

25 al 28 de mayo de 2016

Monterrey, Nuevo León, México

<http://www.amimc.org.mx/>

V Congreso Internacional de Parasitología Neotropical COPANEO

30 de mayo al 4 de junio de 2016

Lima, Perú

copaneointernacional@gmail.com

Facebook/copaneo

ASM Microbe 2016 (American Society of Microbiology Annual Meeting)

16 al 20 de junio de 2016

Boston, Massachusetts, Estados Unidos

<http://www.asmmicrobe.org/>

XIII Congreso Nacional de Micología

20 al 22 de junio de 2016

Lleida, España

<http://www.congresomicologia2016.es/site/>

XI Congreso de Microbiología del Medio Acuático

20 al 22 de julio de 2016

Oviedo, España

<http://ximma16.uniovi.es/>

68th AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo

31 de julio al 4 de agosto de 2016

Philadelphia, Pennsylvania, Estados Unidos

<https://www.aacc.org/meetings-and-events/2016-annual-meeting-and-expo>

XXXIX Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Alergia e Inmunología Clínica

11 al 13 de agosto de 2016

Buenos Aires, Argentina

<http://www.alergia.org.ar/congresos.php>

XX Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos

14 al 16 de setiembre de 2016

León, España

<http://microalimentos-leon2016.unileon.es/>

XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología 26 al 30 de setiembre de 2016

Rosario, Santa Fe, Argentina

<http://www.alam-cam2016.aam.org.ar/>

XIII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos

27 al 30 de setiembre de 2016

Medellín, Colombia

<http://colmic2016.com/>

VIII Congreso Internacional de Inmunología

28 al 30 de setiembre de 2016

Lima, Perú

<http://www.spi.org.pe/>

XVII Congreso Nacional de Microbiología, Parasitología y Patología Clínica

2 al 4 de noviembre de 2016

San José, Costa Rica

<http://microbiologos.cr/>

6th Congress of the Spanish Proteomics Society

15 al 18 de noviembre de 2016

Cádiz, España

<http://seprot2016.uca.es/index>

XXXVIII Congreso Chileno de Microbiología

22 al 25 de noviembre de 2016

Valdivia, Chile

<http://somich.cl/congreso/>

XXIII Congreso Latinoamericano de Bioquímica Clínica

17 al 20 de setiembre de 2017

Punta del Este, Uruguay

http://colabiocli2017uy.com/punta_este.html



XVII

CONGRESO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA PARASITOLOGÍA Y PATOLOGÍA CLÍNICA



Fecha: 2, 3 y 4 de noviembre del 2016

Lugar: Salón Corcovados, Hotel Crowne Plaza Corobicí

Tema central:

Innovación tecnológica y diagnóstica en Microbiología

Inversión:

-Hasta el 30 de setiembre-
Estudiantes 100 dólares,
Diplomados y técnicos 125 dólares
MQC 150 dólares

Del 1 de octubre al día del congreso:

Estudiantes 150 dólares
Diplomados y técnicos 175 dólares
MQC 200 dólares

CAPRIS MEDICA

Líderes en Diagnóstico

La calidad en sus resultados es nuestro principal objetivo



Cuota mensual
\$119,27

 **ELITechGroup**
SOLUTIONS
tailored to your needs

MICRO LAB 300



Cuota mensual
\$368,79



Cuota mensual
\$249,52

 **sysmex**

PocH-100i

El PocH-100i es el analizador de química clínica y contador ematológico de 3 partes

CAPRIS MEDICA

Líderes en Diagnóstico

Teléfono: 2521-5110 / Fax: 2221-5073

E-mail: ventascaprismedica@capris.co.cr

www.caprismedica.com



Diagnostika

la importancia de una
buena reputación

**QUÍMICA SECA...
LA NUEVA GENERACIÓN.**

- MÁS CONFIABLE!
- MÁS SENCILLA!
- MENOS VOLUMEN DE MUESTRA!
- 100% PRUEBA EFECTIVA!

- ✓ Sin necesidad de agua.
- ✓ Sin drenajes.
- ✓ Sin deshechos líquidos.
- ✓ Sin sistemas de purificación de agua que encarecen la operación del laboratorio.



**OPCIONES
DE FINANCIAMIENTO**

FUJIFILM
FUJI DRI-CHEM
NX500
Automated Clinical Chemistry Analyzer

Felicitemos a los siguientes 20 laboratorios
por la adquisición de su analizador **FUJIFILM** modelo NX500.

LABORATORIO

PROFESIONAL

Laboratorio Clínico Dra. Mercedes Alfaro	Dra. Mercedes Alfaro.
Laboratorio Clínico LABIFORT	Dra. Natalia Vargas.
Laboratorio Clínico Cartín San Rafael	Dr. Walter Cartín - Dra. Vanessa Herrera.
Laboratorio Clínico Cartín Coyal	Dr. Walter Cartín - Dra. Geisel García.
Laboratorio Clínico Cartín Central	Dr. Walter Cartín - Dr. Alberto González.
Laboratorio Clínico Cartín Central	Dr. Walter Cartín - Dr. Luis Diego Alfaro.
Laboratorio Clínico Orotina	Dra. Marianela Arguedas.
Laboratorio Clínico Jacó	Dr. Marco Rodríguez.
Laboratorio Clínico Dr. Jiménez	Dr. José María Jiménez.
Laboratorio Clínico Santa Cruz	Dra. Cecilia González.
Laboratorio Clínico LABIMED San Pedro	Dra. María José Carvajal.
Laboratorio Clínico Coronado	Dra. Nazareth Vargas.
Laboratorio Clínico LEYSA	Dra. Carmen Leiva - Dra. Natalia Salazar.
Laboratorio Clínico MICROSALUD	Dra. Vanessa Castro.
Laboratorio Clínico Dra. Zoila Torres	Dr. Carlos Portilla.
Laboratorio Clínico Navarro y Alpízar El Coco	Dra. Dietrich Faerron.
Laboratorio Clínico Navarro y Alpízar Liberia	Dra. Maureen Navarro.
Laboratorio Clínico Siquirres	Dr. Melvin Méndez.
Laboratorio Clínico Max	Dr. Francisco Faiges.
Laboratorio Clínico Paso Ancho	Dra. Rita Chacón Prendas.

Tel: (506) 2291-3143 • Fax: (506) 2291-4206

Correo: ventas@diagnostika.co.cr • manuel.jimenez@diagnostika.co.cr • La Uruca, San José, Costa Rica

Patrocinado por **FUJIFILM**

Wiener lab introduce un nuevo reactivo "directo" para la determinación de Colesterol HDL en suero y plasma.



HDL Cholesterol fast

PROXIMAMENTE



Nueva presentación más conveniente para el laboratorio.
Menor precio por determinación

Características del método:

- ✓ Método enzimático directo
- ✓ Sistema birreactivo
- ✓ Muestra: suero o plasma

Ventajas:

- ✓ Rápido: menor tiempo de reacción
- ✓ Método simple y preciso
- ✓ Menor interferencia por lípidos endógenos
- ✓ Excelente estabilidad "on board"
- ✓ Reactivos líquidos y listos para usar
- ✓ Adaptaciones disponibles a diferentes analizadores de química clínica



IN VITRO DIAGNOSTICS CENTROAMERICANA S.A.

Pavas-Rohrmoser de la Embajada Americana,
550 mts. Norte. Edificio # 17
Apdo.612-1005 B° México, San José-Costa Rica
Tel: (506) 2231-3270 . Fax: 2231-2949



www.wiener-lab.co.cr
wiener.lab@racsa.co.cr