


TRIBUNA

Volumen 19, número 1, 2018

DEL INVESTIGADOR

www.tribunadelinvestigador.com




INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL

70

AÑOS

ACTO INAUGURAL DEL
JUBILEO DEL SETENTA
ANIVERSARIO DEL INSTITUTO
DE MEDICINA TROPICAL DE
LA UNIVERSIDAD CENTRAL
DE VENEZUELA


Dr. Félix Pifano / Fundador

PROGRAMA

Bienvenida:
Dra. Belkisyló Alarcón de Noya

Conferencia:
Dr. Julio Castro

"Nuevas y viejas epidemias: nuevos
y viejos métodos de vigilancia
y control. ¿Que nos espera?"

Conferencia:
Dr. Oscar Noya

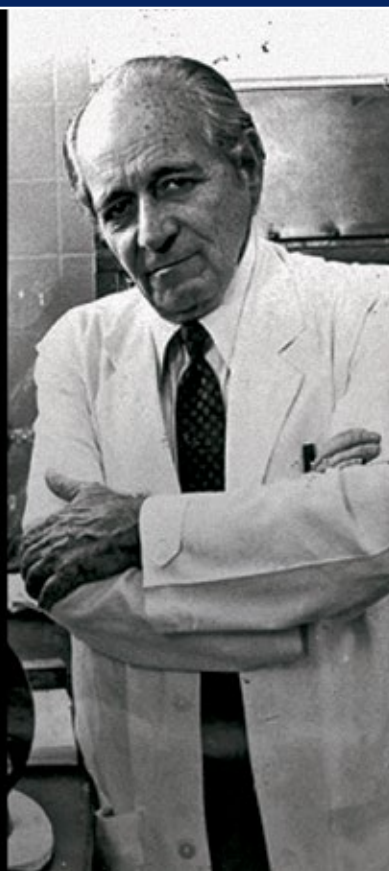
"Malaria en Venezuela: 60 años
de historia".

Palabras de las autoridades de
la Facultad de Medicina

Coral

Clausura

Auditorio del Instituto de Medicina Tropical
Universidad Central de Venezuela
Viernes 20 de Octubre de 2017
hora 8:30 a.m.



Revista de la Asociación
para el Progreso de
la Investigación
Universitaria (APIU)

www.apiu.org.ve

70 años del Instituto de Medicina Tropical "Dr. Félix Pifano", UCV.

Depósito legal pp-94-0014 - ISSN 1856-9080 - ISSN-e: 1315-3374
Indizada en: LIVECS / LILACS / LATINDEX / Saber UCV

CONSEJO DIRECTIVO PERÍODO 2018-2020

Alexis Mendoza-León
Presidente

Leonel Salazar Reyes-Zumeta
Vicepresidente

Maira Cabrera
Tesorera

Isabel Andueza
Secretaria de Actas

Juan Fernando Marrero
Secretario de Correspondencia

TRIBUNA DEL INVESTIGADOR COMITÉ EDITORIAL 2018-2020

Consuelo Ramos De Francisco
Editor-Jefe

Tomás Istúriz
Editor adjunto

EDITORA INVITADA

Belkisyolé Alarcón de Noya

REPRESENTANTES EN EL CONSEJO EDITORIAL

Alberto Lovera
Arquitectura

Gabriela Contreras
Ingeniería

Liliana López
Ciencias

Elizabeth Marcano de Díaz
Ciencias Veterinarias

Levi Galindo
*Asesor Técnico Acceso Abierto
(Open Journal)*

COORDINACIÓN

Consuelo Ramos De Francisco

Belkisyolé Alarcón de Noya

Alexis Mendoza-León

SECRETARIA DE COORDINACIÓN

Rosario Rivas G.

Contenido

EDITORIAL	4
TRIBUNA DEL INVESTIGADOR ABRE SUS PUERTAS AL INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL, EN EL AÑO JUBILAR DE LA CONMEMORACIÓN DE LOS 70 AÑOS DE SU FUNDACIÓN <i>Belkisyolé Alarcón de Noya</i>	
ARTÍCULOS	
El Instituto de Medicina Tropical explora caminos hacia el multidiagnóstico simultáneo de enfermedades infecciosas y parasitarias. <i>The Tropical Medicine Institute explores ways towards the simultaneous multidagnosis of infectious and parasitic diseases.</i> Oscar Noya, María Angelita Lorenzo, Sandra Losada, Marilyan Toledo, Adriana Gauna, Henry Bermúdez.	7
Medicina Tropical y su proyección actual: un breve panorama. <i>A brief overview: Tropical Medicine and its current projection.</i> Nathalie Chacón Fonseca y Luis Alfonso Colmenares Suárez.	15
La Cátedra de Microbiología en sus 125 años. <i>The Chair of Microbiology in its 125 years.</i> María Eugenia Landaeta, Zobeida Uzcátegui, Sofía Mata Essayag.	24
Recuento histórico del departamento de microbiología, parasitología y Medicina Tropical. <i>Historical record of the department of microbiology, parasitology and Tropical Medicine.</i> Zobeida Uzcátegui, Sofía Mata Essayag.	33
El problema de la tuberculosis multiresistente (tb-mdr) y extremadamente resistente (tb-xdr) a fármacos: implicaciones epidemiológicas y técnicas rápidas para el diagnóstico. <i>The problem of multidrug-resistant (tb-mdr) and extensively drug-resistant tuberculosis (tb-xdr): epidemiological implications and rapid techniques for diagnosis.</i> Ana Antonietta Guspini, Iraní Pérez, Giorgina Mendoza, Andreína Duarte, Susana González Rico.	47
Tratamiento de la leishmaniasis tegumentaria americana con meglumina en pacientes con inmunoterapia previa. <i>Treatment of american tegumentary leishmaniasis with meglumine in patients with previous immunotherapy.</i> Pedro Navarro, Luis A. Colmenares, Olinda Delgado, María A. De La Parte, Mariana Rivas, Romy Plaza, Ana Graciela Angulo, Nathalie Chacon Fonseca.	57
Clonación, expresión y purificación de una proteína masp de trypanosoma cruzi. <i>Cloning, expression and purification of a masp protein from trypanosoma cruzi.</i> Alí Agudelo, Marielys Laurens, Belkisyolé Alarcón De Noya, Teresa Abate.	64
La planificación de un álbum virtual de parásitos intestinales. <i>The planning of a virtual album of intestinal parasites.</i> Nathalie Chacón, Darling Sánchez.	70
Caracterización de casos atendidos de toxocariasis visceral y ocular en el Instituto de Medicina Tropical, Caracas, Venezuela, 2011-2016. <i>Characterization of cases treated for visceral and ocular toxocariasis of the Tropical Medicine Institute, Caracas, Venezuela, 2011-2016.</i> Olinda Delgado, María Ana Rivas, Virginia Coraspe, Sylvia Silva, María Laura Dos Santos, Yalitz Centeno, Alfonso J. Rodríguez-Morales	77

Histoplasmosis en Venezuela: un enemigo no sospechado. <i>Histoplasmosis in Venezuela: an unsuspected enemy.</i> Sofía Mata-Essayag, María Eugenia Landaeta, Rommie Merino, Liseloth Garrido, David Mota, Jacinto Pineda, María Teresa Colella, Vanessa Pineda, Antonio Serrano, Saúl Quijada, María Elena Savino, Jesús Dawaher, Omar Linares, Elías Kassisse, Sylvia Magaldi, Jessica Martínez.	85
Arbovirus, miocarditis e insuficiencia cardíaca. <i>Arbovirus, myocarditis and heart failure.</i> Ivan Mendoza, Igor Morr, Ivan Mendoza Britto, Yolimar Meza, Nahir Martínez, Jaime Torres, Francesca Misticchio, Vicente Finizola, Juan Marques, Karina Gonzalez Carta.	97
Enfermedad de chagas: un diagnóstico olvidado de serias consecuencias. <i>Chagas disease: a forgotten diagnosis of serious consequences.</i> Belkisyolé Alarcón De Noya, Luciano Mauriello, Arturo Muñoz-Calderón, Zoraida Díaz-Bello, Milagros Aponte, Eyleen Moronta, Paola Fratarolli, Yerly Mendoza, Jefferson Muñoz, Sara Pérez, Laurelys Vasquez, Cecilia Colmenares, Raiza Ruiz-Guevara.	109
Emergencia del virus zika en latinoamérica. Aprendiendo en el camino. <i>Emergence of zika virus in latin america. Learning on the fly.</i> Jaime R Torres R.	124
Alteración histológica y del perfil proteico en la cardiotoxicidad crónica inducida por adriamicina en ratas sprague dawley. <i>Histological and the protein profile alteration in chronic cardiotoxicity induced by adriamycin in rats sprague dawley.</i> Rosa Maita, Mirian Strauss, María De Los Angeles Narváez, Tomás Hermoso.	131
Malaria. Eficacia terapéutica de medicamentos contra plasmodium vivax y plasmodium falciparum. Estado Bolívar, Venezuela 2017. <i>Malaria. Therapeutic efficacy of first-line medicines against plasmodium vivax and plasmodium falciparum. Bolívar State, Venezuela 2017.</i> Rubén A. Vallenilla, José L. Cáceres.	144
Comportamiento frente a insecticidas organosintéticos en anopheles nuñez tovari gabaldon 1940, de una zona malárica minera del Estado Bolívar, Venezuela. <i>Behavior to organosynthetic insecticides in anopheles nuñez tovari gabaldon 1940 of a malarious mining zone from Bolívar State, Venezuela.</i> Darjaniva Molina De Fernández, Luisa Elena Figueroa Acosta, Danny Bastidas, Nieves Molina, Víctor Sánchez, William Anaya, Claudia Domínguez & Jorge Moreno.	158
Muscarinic receptors regulate intracellular cgmp levels at airway smooth muscle. <i>Regulación por los receptores muscarínicos de los niveles intracelulares de gmpc en el músculo liso de las vías aéreas</i> Marcelo J. Alfonzo, Ramona González De Alfonzo, Marcelo Andrés Alfonzo González, Itala Lippo De Bécemberg, Elizabeth Cardillo.	166
Derecho a la salud. Emergencia humanitaria compleja en Venezuela. Reporte nacional septiembre 2018. <i>Right to health. Complex humanitarian emergency in Venezuela. National report, september 2018.</i>	187
Adiós a un Gran Ucevista: Jesús Alberto González Vegas.	201
INSTRUCCIONES A LOS AUTORES	204
INSTRUCCIONES A LOS ARBITROS/PLANILLA	207

DISEÑO Y DIAGRAMACIÓN

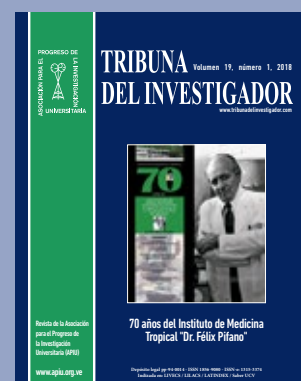
Leonor Rivas B.
Ramón Cartaya

Montaje en la página web

NEXUS RADICAL C.A.
Altemar Pérez

Montaje Repositorio "Saber UCV"

Levi Galindo
Jhon Martínez



PORTADA

Afiche "70 Años Instituto de Medicina Tropical"
IMT / Facultad de Medicina / UCV
y Fotografía del Dr. Félix Pifano

Diseño Afiche

Alberto Monteagudo
Composición Portada: José Francisco

Depósito Legal pp 94-0014
ISSN-E: 1856-9080
ISSN: 1315-3371

Tribuna del Investigador es una Revista semestral, multidisciplinaria, electrónica publicada por la Asociación para el Progreso de la Investigación Universitaria (APIU). Fundada en 1994 por la Dra. Daissy Marcano bajo su gestión como Presidenta de la APIU, en formato impreso en papel (Vol. 1- Nº 1-). Colección digitalizada. Los objetivos fundamentales son:

1. Propiciar la difusión de estudios e investigadores de carácter interdisciplinario relacionados con el quehacer científico y tecnológico nacional e internacional.

2. Estimular el estudio interdisciplinario, promoviendo en forma especial las relaciones entre las humanidades y las ciencias básicas.

3. Contribuir al esclarecimiento de diversos aspectos relacionados con definición e instrumentación de las políticas científicas y tecnológicas nacionales, en sus implicaciones teóricas y prácticas.

4. Ofrecer la oportunidad de confrontar puntos de vista respecto a problemas que afectan a la comunidad de investigadores.

5. Ser un espacio para la divulgación y la confrontación de los hallazgos alcanzados por los miembros de la comunidad científica y tecnológica.

La revista **Tribuna del Investigador** es una publicación financiada con los recursos provenientes de los aportes de los profesores investigadores adscritos a la APIU/UCV, CDCH/UCV y en algunos casos de otras instituciones.

La revista publica artículos originales, así como ensayos y comunicaciones cortas que tengan a bien publicar el personal de la UCV, así como de otras universidades e instituciones públicas y privadas.

Indizada en LILACS (Literatura Latinoamericana en Ciencias de la Salud), LIVECS (Literatura Venezolana en Ciencias de la Salud/SINADIB/UCV), LATIN-DEX y Saber UCV.

Tribuna del investigador abre sus puertas al Instituto de Medicina Tropical, en el año jubilar de la Conmemoración de los 70 años de su fundación.

EDITORIAL

Belkisyolé Alarcón De Noya

Por decreto del Consejo Universitario de la ilustre Universidad Central de Venezuela, el 14 de octubre de 1947, fue creado el Instituto de Medicina Tropical (IMT), siendo el Dr. Félix Pifano Capdevielle (1912-2003), su fundador y primer director. Médico, egresado de la Universidad Central de Venezuela, el Dr. Félix Pifano, se dedicó desde muy joven a tratar las dolencias que afectaban a los pobladores del medio rural venezolano. Desde el IMT, como investigador produjo aportes significativos en la Enfermedad de Chagas, leishmaniasis, parasitosis intestinales y otras dolencias del trópico. Fue un investigador integral pues se paseaba desde las manifestaciones clínicas del paciente, el diagnóstico parasitológico e inmunológico, hasta sus contactos familiares, antecedentes, vivienda, peridomicilio y entorno social y ambiental. Fue Jefe de la Cátedra de Medicina Tropical y como tal, ejercía una intensa actividad docente. Tuvimos el privilegio de ser alumnos de la Cátedra y recibir casi todo el curso de medicina tropical de la voz del Dr. Félix Pifano. La asistencia a sus clases magistrales era numerosa, acudiendo médicos y visitantes de otras dependencias. Tenía una magia única, una dicción perfecta y su relatoría preciosista describiendo, desde las declaraciones del paciente, sus lesiones, los cambios histopatológicos, la fisiopatología, complicaciones y entonces pasaba al entorno y nos hacía entender, de manera sencilla, la epidemiología de las enfermedades tropicales. Ese fue el hombre médico-científico-docente, cuyo nombre lleva nuestro Instituto, "Dr. Félix Pifano", asignado por el Consejo de Facultad de Medicina durante la gestión del Decano Dr. Luis López Grillo. Fue Director por 43 años durante el periodo 1947-1990. Lo sucedimos los Dres. Alexis Rodríguez, Oscar Noya, Jaime Torres y quien suscribe. Cada uno asumió la Dirección con dedicación y responsabilidad, dando lo mejor de sí, en sus empeños por mantener en alto el prestigioso nombre del IMT.

En el Instituto se realiza investigación básica y aplicada en el campo de las enfermedades infecciosas y tropicales, así como exámenes de diagnóstico y consultas especializadas (asistencia clínica) en malaria, Enfermedad de Chagas, bilharzia, micosis, VIH, etc. Es sede de las asignaturas de

pregrado de la Escuela de Medicina “Luis Razetti”, del Postgrado Nacional de Parasitología y se realizan actividades de extensión en comunidades periurbanas, rurales e indígenas del país.

El IMT, al pie de una de las colinas del Jardín Botánico, tiene una bellísima arquitectura con unos techos muy altos, dos escaleras sin columnas de sostén, paredes de bloques alcahuetas de la luz, amplios ventanales en todos sus laboratorios y aulas docentes y un imponente Auditorio. Su abierta edificación ha sido nuestro orgullo, pues ha merecido la visita y fotografías de quienes aprecian esta libertad creativa de Carlos Raúl Villanueva. Sin embargo, esta amplitud y belleza arquitectónica hoy sufre los embates del tiempo y la destrucción por aquellos quiénes, como alimañas, penetran violentamente en sus instalaciones, arrasando todo a su paso como marabunta.

Las Secciones, Cátedras y el Departamento de Microbiología, Parasitología y Medicina Tropical aportan sus artículos a Tribuna del Investigador, órgano divulgativo de la Asociación para el Progreso de la Investigación Universitaria (APIU), en un homenaje a nuestras raíces como docentes e investigadores, para honrar el camino abierto por nuestros maestros, quienes nos sembraron sus enseñanzas para capacitarnos a entregar el relevo con dignidad y excelencia a la próxima generación de tropicalistas. Se suman dos importantes trabajos en el área, presentados por los investigadores Rubén A. Vallenilla y José L. Cáceres con el artículo “Malaria. Eficacia terapéutica de medicamentos contra *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*. Estado Bolívar, Venezuela, 2017” y “Comportamiento frente a insecticidas organosintéticos en *Anopheles nuñez tovari Gabaldon 1940*, de una zona malárica minera del Estado Bolívar, Venezuela” de los investigadores Darjaniva Molina de Fernández, Luisa Elena Figueroa Acosta y otros destacados autores.

Este número de Tribuna del Investigador incluye además como política de la revista un trabajo científico libre, es el valioso aporte del Prof. Marcelo Alfonzo, fallecido recientemente, (+) quien junto con otros importantes autores, elaboran una revisión titulada “*Muscarinic receptors regulate intracellular cgmp levels at airway smooth muscle*” presentando evidencias experimentales. Como Documento se ha incluido un importante informe titulado “*Derecho a la Salud. Emergencia Humanitaria Compleja en Venezuela*”, Reporte Nacional (septiembre 2018), donde participan varias instituciones, se describe a partir de un grupo de trabajo la Emergencia Humanitaria Compleja del país, la cual comprende impactos de gran alcance en el menoscabo y destrucción de las capacidades sanitarias nacionales, documento emitido por un grupo de instituciones y la Academia Nacional de la Ingeniería y el Hábitat, entre los muchos datos de este diagnóstico señala unos 406.000 casos de malaria, lo que generó la epidemia en 2017.

Derechos reservados. Esta publicación no puede ser reproducida sin permiso escrito de los editores.

Copyright: All rights reserved. No part of this publication may be reproduced without written permission from the Publisher.

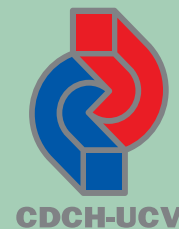
Universidad Central de Venezuela, Los Chaguaramos. Instituto de Medicina Experimental, PB al lado del Auditorio “Augusto Pi Suñer”.

Teléfono: 0580212-605-3307

Apartado Postal 50587, Sabana Grande.

www.apiu.org.ve
www.tribunadelinvestigador.com
apiu@ucv.ve
ucvapiu@gmail.com
ucvapiu@yahoo.es
Twitter: @apiu-ucv

Edición de esta revista ha sido cofinanciada con el apoyo del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH-UCV), MEDITRON, C.A. y Asociación de Egresados y Amigos de la UCV.



Finalmente, pero con un gran sentimiento, nos unimos para expresar nuestras palabras de dolor y darle nuestro adiós y merecido reconocimiento a nuestro gran amigo el Dr. **Jesús Alberto González Vegas** en estas cortas pero sentidas notas **“Adiós a un gran Ucevista”** como lo fue, miembro durante muchos años del Consejo Editorial de Tribuna del Investigador y editor de la prestigiosa revista “Vitae” pero sobre todo, un gran amigo.

Gracias a la APIU, por brindarnos la oportunidad de dejar testimonio, escrito en la conmemoración del aniversario de los **70 años de la fundación del Instituto de Medicina Tropical de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela.**

Caracas, 30 de mayo, 2018

Belkisyolé Alarcón de Noya
Directora del IMT/UCV
Editora Invitada

Nota Comité Editorial:

No queremos cerrar este importante número de Tribuna del Investigador sin dar a nuestros lectores sinceras excusas por los serios problemas que hemos tenido para salir a tiempo este año “como es el deber ser y el compromiso de las revistas”, pero razones inherentes a la grave crisis que atraviesan nuestras universidades y el país han atentado con este vital objetivo.



Aumenta la visibilidad
de sus publicaciones
Ingresa a **saber.ucv.ve**



MEDITRON, C.A. es una empresa de capital 100% venezolano, fundada en el año 1972, encargada principalmente de comercialización de equipos médicos, servicio post venta y diseño, construcción y equipamiento de infraestructuras en el área de la salud.

Además, con su laboratorio de radiofarmacia realiza encapsulamiento de Yodo-131 radiactivo, en dosis individualizadas para el diagnóstico y terapia de diversas patologías tiroideas.

Su misión es proveer a sus clientes soluciones integrales en el ámbito de la salud con productos de alta tecnología, servicio técnico de calidad y constantes proyectos que ponen a disposición de toda la comunidad la mejor tecnología médica para garantizar salud integral y mejor calidad de vida.

Lo que comenzó hace más de cuarenta años ha crecido y seguirá creciendo de la mano de los avances tecnológicos. Es por esto que Venezuela cuenta y contará con una empresa que se preocupa por la salud de sus habitantes, brindando con pasión las nuevas tecnologías médicas que nos darán un nuevo mañana.

El Instituto de Medicina Tropical explora caminos hacia el multidiagnóstico simultáneo de enfermedades infecciosas y parasitarias

Oscar Noya^{1, 2},
María Angelita Lorenzo²,
Sandra Losada²,
Marilyan Toledo^{1, 2},
Adriana Gauna^{2, 3},
Henry Bermúdez²

¹ Escuela de Medicina Luis Razetti,
Facultad de Medicina, Universidad Central de
Venezuela, Caracas, Venezuela.

² Sección de Biohelmintiasis, Instituto de
Medicina Tropical de la Facultad de Medicina,
Universidad Central de Venezuela,
Caracas, Venezuela.

³ Programa de Doctorado en Biotecnología.
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso/
Universidad Técnica Federico Santa María,
Valparaíso, Chile.

noyao0@yahoo.com,
angelita.lorenzo@gmail.com,
salosada@gmail.com,
marilyan@gmail.com,
adrygauna@gmail.com,
henrybermudez2001@yahoo.com

RESUMEN

La Sección de Biohelmintiasis del Instituto de Medicina Tropical de la UCV ha dedicado más de 20 años de investigación en mejorar los métodos de inmunodiagnóstico de enfermedades parasitarias e infecciosas. Se han venido desarrollando y evaluando diferentes estrategias de búsqueda de biomoléculas de origen sintético, específicamente fragmentos de proteínas, sobre todo de parásitos, que puedan funcionar como antígenos y ser reconocidos por los anticuerpos. Dos de estas estrategias se conocen como Pepsican y MABA (*Multiple Antigen Blot Assay*). La primera consiste en sintetizar una biblioteca de péptidos (posibles antígenos) unidos a un soporte para posteriormente ser enfrentados a diversos fluidos fisiológicos (suero, saliva y orina) de pacientes y detectar anticuerpos contra un patógeno en particular. Los péptidos más antigénicos son posteriormente sintetizados en mayor cantidad para luego ser utilizados mediante la técnica de MABA. Esta técnica se basa en la adhesión de hasta 26 diferentes antígenos (péptidos) a una tira de nitrocelulosa la cual permite detectar o descartar simultáneamente hasta 26 patologías. Gracias a estas dos estrategias, en nuestro laboratorio se han podido identificar candidatos antigénicos o biomoléculas para ser empleados en el diagnóstico de la malaria, esquistosomiasis y hepatitis A, entre otras patologías. En las zonas tropicales y sub-tropicales las coinfecciones son comunes en la población, por lo que una práctica médica racional e integral requiere de conocer la historia actual o el contacto anterior de un paciente frente a varios patógenos importantes, de allí la importancia de aprovechar la visita a los servicios de salud para descartar otras enfermedades que no necesariamente fueron el motivo de la consulta y ofrecer un tratamiento oportuno.

Palabra clave: péptidos sintéticos; Pepsican; antígenos; anticuerpos; MABA, biohelmintiasis; Instituto de Medicina Tropical; Inmunodiagnóstico; enfermedades infecciosas y parasitarias.

THE TROPICAL MEDICINE INSTITUTE EXPLORES WAYS TOWARDS THE SIMULTANEOUS MULTIDIAGNOSIS OF INFECTIOUS AND PARASITIC DISEASES

ABSTRACT

The Biohelminthiasis Section of the Institute of Tropical Medicine (UCV) has devoted more than 20 years of research to improving methods of immunodiagnosis of parasitic and infectious diseases. Different strategies for the search of

biomolecules of synthetic origin have been developed and evaluated, specifically fragments of proteins, especially of parasites, that can function as antigens and be recognized by the antibodies. Two of these strategies are known as Pepsan and MABA (*Multiple Antigen Blot Assay*). The first one consists of the synthesis of a library of peptides (possible antigens) attached to a support to subsequently be confronted with various physiological fluids (serum, saliva and urine) from patients and to detect antibodies against a particular pathogen. The more antigenic peptides are synthesized in greater quantity and then used in the MABA technique. This technique is based on the adhesion of up to 26 different antigens (peptides) to a strip of nitrocellulose which can detect out 26 pathologies simultaneously. Thanks to these two strategies, our laboratory has been able to identify antigenic candidates or biomolecules for the diagnosis of malaria, schistosomiasis, and hepatitis A among others. In tropical and subtropical areas, coinfections are common in the population, so a rational and comprehensive medical practice requires knowing the current history or previous contact of a patient with several important pathogens, hence the importance of taking advantage of the visit to the health services to rule out other diseases that were not necessarily the reason for consultation and provide timely treatment.

Keywords: synthetic peptides; Pepsan; antigens; antibodies; MABA

INTRODUCCIÓN

A María la picó un chipo hace un mes y acudió a la consulta del Instituto de Medicina Tropical con una referencia para diagnosticar Mal de Chagas. Se le tomó una muestra de sangre para aplicarle una prueba que puede diagnosticar una batería de 26 enfermedades a la vez. Una semana después se le entregó a María un resultado negativo para Chagas, pero se le sugirió confirmar la infección por toxoplasmosis y HIV, pues dio positivo para estas otras enfermedades. Con un solo pinchazo, con tan solo unos microlitros de su suero, se aprovechó para detectar o descartar 26 patologías simultáneamente.

¿Ficción? ¿Es posible? Si bien el personaje de María es ficticio, no así lo que es capaz de hacer este método de diagnóstico, todavía en fase experimental, conocido como **MABA** (Noya y col. 1998; Noya y col. 2009) y desarrollado en el Instituto de Medicina Tropical de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela.

La metodología diagnóstica capaz de detectar simultáneamente múltiples enfermedades bien sean

ellas de origen infeccioso, autoinmune y alérgico, empleando cantidades muy pequeñas de suero, plasma o saliva se describirá a continuación de forma sucinta, pero sin entrar en excesivos tecnicismos.

Para la identificación de biomoléculas que pudieran ser candidatas en la detección de ciertas enfermedades, se pueden utilizar varias técnicas. Entre ellas, están el **Pepsan** y el **MABA**, ensayos novedosos que usamos de rutina en la Sección de Biohelmintiasis del Instituto de Medicina Tropical de la Facultad de Medicina de la UCV.

¿MABA? ¿Pepsan? Un acrónimo y una palabra que juntas pueden llegar a convertirse en herramientas complementarias y poderosas para la identificación de biomarcadores que pudieran ser posteriormente utilizadas en el diagnóstico de enfermedades infecciosas y también como biomarcadores del grado de patología o de cura.

¿Cómo se realiza el diagnóstico de las diferentes patologías infecciosas o de otra índole? Se trata de la secuencia de procedimientos (clínico, epidemiológico y de laboratorio) que permiten identificar cualquier estado patológico de diferentes orígenes. Un buen diagnóstico es fundamental para suministrar tratamiento oportuno y adecuado a los pacientes. Este puede implicar diversos procedimientos dependiendo de la enfermedad en cuestión.

Dentro de los métodos de diagnóstico de laboratorio destacan las técnicas de **inmunodiagnóstico**, que permiten tanto la detección como la cuantificación de **anticuerpos** contra **antígenos** del patógeno en cuestión, pudiendo encontrarse en distintos fluidos biológicos (plasma, suero, saliva, líquido cefalorraquídeo u orina) (biomarcadores de infección). Otra forma de inmunodiagnóstico involucra la detección de antígenos circulantes que pueden hallarse en los distintos fluidos ya mencionados, por parte de anticuerpos (monoclonales o policlonales mono-específicos). Un antígeno es cualquier biomolécula (usualmente de naturaleza proteica) que tiene la capacidad de ser reconocido por un anticuerpo (inmunoglobulinas) específico o por un receptor celular.

Desde hace más 20 años, nuestra Sección ha venido desarrollando y evaluando diferentes estrategias de búsqueda de biomoléculas de origen sintético, específicamente fragmentos de proteínas, sobre todo de parásitos, que puedan funcionar como antígenos y ser reconocidos por los anticuerpos.

La mayoría de los métodos de inmunodiagnóstico utilizados en la actualidad emplean proteínas recombinantes de organismos parasitarios o infecciosos. Una proteína recombinante es una proteína que ha sido expresada en otro organismo que no es el original y que le sirve de factoría.

Si bien la principal ventaja de utilizar la proteína recombinante es que se dispone de una “copia” de la proteína original, con frecuencia su síntesis resulta compleja, poco reproducible y costosa en insumos para su posterior purificación. En la Figura 1, se muestra de forma sucinta la secuencia de técnicas que se integran en cuatro etapas que son aplicadas en la SBH, con el fin obtener péptidos sintéticos con fines diagnósticos.

A continuación se describen las cuatro etapas:

Muchas veces es innecesario preparar la proteína antigénica completa del parásito, ya que una sola porción de ella es necesaria para el reconocimiento por parte del anticuerpo, por lo que se recurre a la síntesis química de fragmentos de estas proteínas, llamados péptidos, que son moléculas más pequeñas que la proteína completa, casi siempre fáciles de sintetizar, a través de métodos reproducibles y con controles de calidad confiables. La porción del anticuerpo que reconoce el antígeno se conoce como epítipo.

Recientemente, la estrategia que hemos desarrollado y evaluado en nuestra Sección consta de cuatro etapas involucrando cada etapa varios pasos (Figura 1):

Etapas. *Estudio inmunoinformático para la selección de posibles secuencias antigénicas.*

La finalidad del estudio inmunoinformático es identificar posibles antígenos o regiones antigénicas que puedan ser reconocidas por los anticuerpos. Las proteínas seleccionadas deberían cumplir dos requisi-

tos: abundancia y antigenicidad. Para ello se procede así:

1.1. *Identificación de una o más proteínas antigénicas:* revisión de la literatura sobre moléculas ya reconocidas como antígenos o que al menos sus secuencias estén disponibles en las bases de datos del genoma/proteoma de los diferentes agentes causales.

1.2. *Búsqueda en bases de datos información sobre la estructura primaria de los antígenos:* en estas bases de datos se puede encontrar la estructura primaria total o parcial de la proteína, por ejemplo, la base de datos de proteínas del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

1.3. *Comparación de las estructuras primarias de las proteínas antigénicas versus proteínas semejantes de otros organismos:* esto provee información que evite las posibles reacciones cruzadas con otros patógenos. Una reacción cruzada implica que otro patógeno diferente al que está bajo estudio presenta secuencias similares que son reconocidas por los sueros de pacientes con otra patología pudiendo conducir a un diagnóstico errado (“falso positivo”). Estas secuencias compartidas son descartadas mediante un algoritmo bioinformático conocido como herramienta de búsqueda de alineamiento local básico (siglas en inglés, BLAST) (Mount, 2007).

1.4. *Determinación de antigenicidad:* consiste en la selección de regiones antigénicas empleando servidores gratuitos disponibles en la web que utilizan distintos algoritmos de predicción. La antigenicidad es la propiedad del antígeno de ser reconocido, de manera específica, por un anticuerpo o un receptor celular.

Una vez determinadas las regiones antigénicas de la proteína del agente infeccioso, estas son sometidas un proceso de filtrado adicional utilizando los siguientes criterios:

1.4.1. *Identificación de las regiones intrínsecamente desordenadas en la proteína:* se da prioridad a epítopos localizados en regiones intrínsecamente desordenadas (o al azar). Estas regiones carecen de una estructura tridimensional bien definida y tienden a ser más antigénicas.

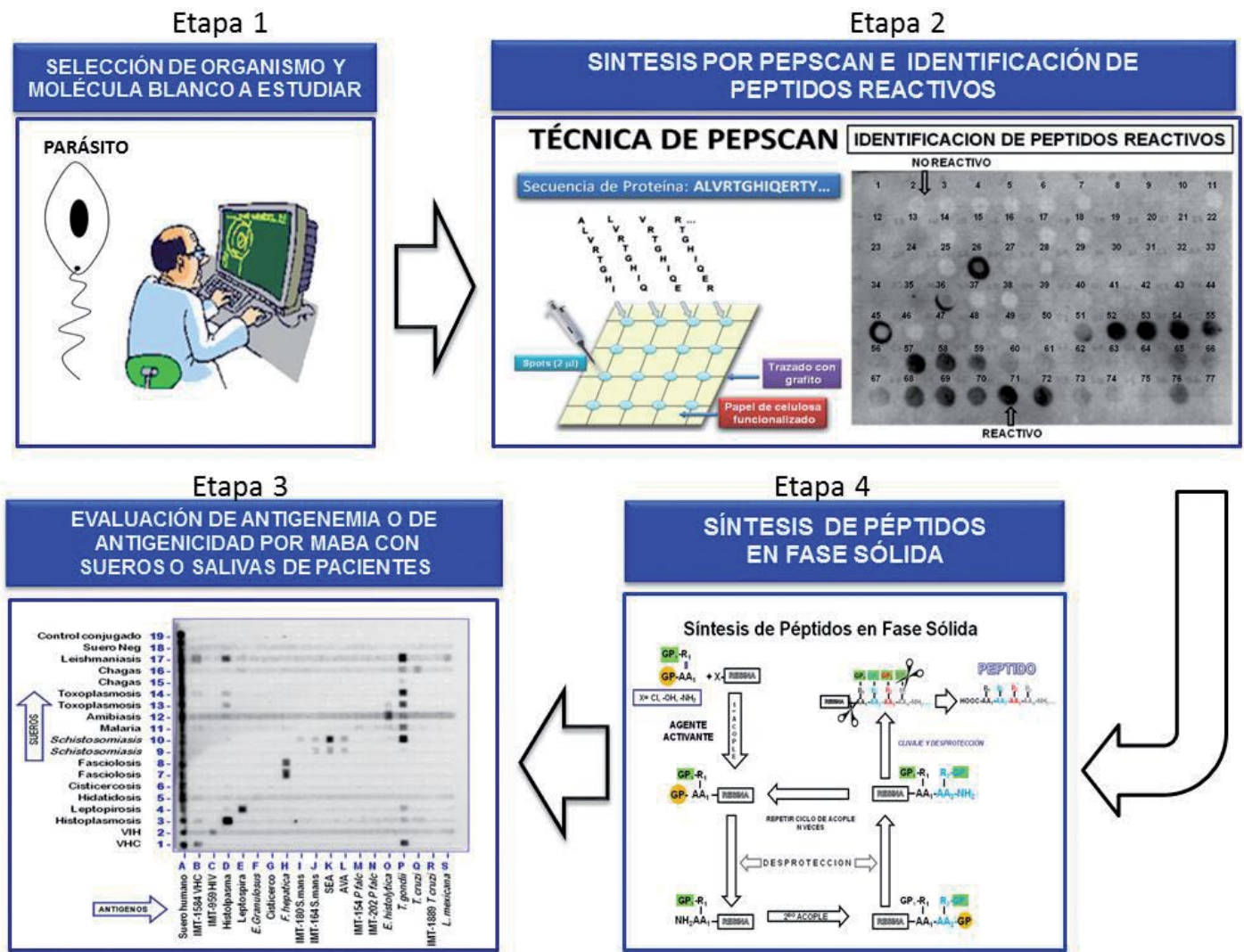


Figura 1. Esquema de una de las estrategias desarrolladas en la Sección de Biohelmintiasis en la búsqueda de antígenos con valor inmunodiagnóstico.

Una vez determinadas las regiones antigénicas de la proteína del agente infeccioso, estas son sometidas a un proceso de filtrado adicional utilizando los siguientes criterios:

1.4.2. *Determinación de secuencias en "tándem"*: la presencia de repeticiones en "tándem" de una misma secuencia es otra de las características que contribuye a la antigenicidad e inmunogenicidad de una proteína. Las repeticiones en tándem son dos o más copias de la misma secuencia de aminoácidos.

1.4.3. *Exclusión de regiones transmembranales y de péptidos señal*: estas regiones corresponden a secuencias no expuestas insertadas dentro de la bicapa lipídica de las membranas y, por tanto, al no ser

habitualmente antigénicas, se excluyen del estudio.

1.4.4. *Estructura tridimensional del antígeno*: si se dispone de información estructural (3D) de la proteína antigénica ésta debe ser considerada al momento del estudio, pues aquellas secuencias del exterior de las proteínas son habitualmente hidrofílicas y tienden a ser más antigénicas.

Llegado a este punto se dispone de un número considerable de secuencias candidatas a ser sintetizadas a fin de continuar con la etapa 2.

Etapa 2. Síntesis y evaluación de una librería de posibles péptidos antigénicos empleando la técnica Pepscan.

Una vez finalizado el estudio inmunoinformático y ya habiendo seleccionado las secuencias candidatas a ser evaluadas, se procede a la síntesis y evaluación de los posibles péptidos antigénicos seleccionados en la etapa 1 mediante la técnica Pepsan. Esta técnica consiste en la síntesis simultánea de varios péptidos sobre un soporte sólido, que no es más que un papel de filtro activado llamado membrana. El principal atractivo de esta técnica es que permite sintetizar más de 100 péptidos simultáneamente en forma de círculos o “spots” con la concentración suficiente de péptido para realizar posteriormente inmunoensayos e identificar a aquellos péptidos reactivos o inmunodominantes.

Técnica Pepsan

La técnica Pepsan (Geysen y col. 1984; Frank, 2002; Hilper y col. 2007) consiste en la síntesis de péptidos en forma de puntos (spots) unidos covalentemente sobre un soporte sólido (papel de filtro) funcionalizado que contiene grupos químicamente reactivos.

2.1. *Preparación del soporte de celulosa:* para hacer que la membrana de celulosa (papel de filtro) adecuada para la síntesis de péptidos es necesario modificar su superficie y cambiar la funcionalización de grupos hidroxilo (-OH) a grupos amino (-NH₂) siendo este último grupo más reactivo que el primero. El aminoácido protegido Fmoc-Gly-OH puede ser utilizado para la funcionalización del papel de filtro.

La modificación de la membrana de celulosa también involucra la inserción de una molécula que sirve de espaciador permitiendo mejorar la accesibilidad de los grupos -NH₂ de la membrana. Este espaciador incrementa la distancia del péptido sintetizado desde la superficie de la membrana mejorando la accesibilidad de los anticuerpos durante los ensayos biológicos. Un ejemplo de espaciador que está siendo utilizado por nosotros es el dipéptido o tripéptido SerGly o GlySerGly respectivamente. Previo a la funcionalización se debe recortar el papel de filtro del tamaño deseado y cuadrangular con un lápiz de grafito. Es en la intersección de las líneas en la cuadrícula el

lugar donde se sintetizará cada spot.

2.2. *Síntesis de los péptidos:* una vez funcionalizada la membrana, se procede a la síntesis de cada péptido sobre la membrana en forma de círculos o spots. Los péptidos son sintetizados sobre la membrana utilizando la estrategia fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc) (Atherton y col. 1978) empleando aminoácidos protegidos en el grupo -NH₂ con el grupo protector Fmoc (protección temporal) y las cadenas laterales de los aminoácidos también protegidas (protección permanente) para evitar reacciones colaterales durante el proceso de elongación de la cadena peptídica.

De forma muy general, el grupo funcional ácido carboxílico del aminoácido protegido es activado químicamente utilizando un agente acoplante para luego realizar una reacción de condensación con los grupos -NH₂ presentes en la membrana, formando el enlace peptídico. Este paso se conoce como acoplamiento. Una vez incorporado el primer aminoácido, se debe eliminar la protección temporal Fmoc de este para poder acoplar un segundo aminoácido. Este paso se denomina desprotección. Una vez realizado esto, se procede a la activación del segundo aminoácido. El proceso se repite hasta sintetizar el péptido con el número de residuos de aminoácido deseado. Por lo general, todos los péptidos sintetizados en el Pepsan tienen el mismo número de residuos de aminoácidos, pero pueden sintetizarse de tamaños variados.

Cada reacción de desprotección y acoplamiento es monitoreada utilizando un indicador ácido-base llamado azul de bromofenol.

Luego del último acople, se procede a la desprotección de los grupos permanentes presentes en el péptido sintetizado, utilizando un ácido fuerte tal como el ácido trifluoroacético y una serie de “scavengers” (“atrapadores”) que permiten atrapar estos grupos protectores liberados, evitando que se unan a la cadena peptídica y alteren la estructura química del péptido.

En este punto, cada péptido permanece anclado a la membrana de celulosa y está lista para ser utilizada en los inmunoensayos.

2.3. *Determinación de antigenicidad de los pépti-*

dos: una vez expuesto el papel con los péptidos a los anticuerpos y revelado, permite identificar los spots reactivos, que serán seleccionados para su posterior síntesis en fase sólida, y su evaluación por MABA o por una técnica de ELISA convencional frente a sueros seleccionados u otros fluidos corporales a estudiar. La exposición secuencial de los péptidos a los anticuerpos presentes en la muestra de los pacientes, seguido por el uso de anticuerpos anti-humanos conjugados a una enzima, que en presencia de un sustrato cromogénico o luminiscente, dará en el caso de aquellos péptidos reactivos una señal de color o luminosa respectivamente en forma de mancha circular o “spots” (Figura 1, etapa 2). Ese mismo papel puede ser reutilizado hasta cuatro veces con diferentes anticuerpos, siempre y cuando los anticuerpos de los sueros anteriores sean removidos con una solución conteniendo urea y SDS (Härkönen y col. 2002; Kovacs-Nolan y col. 2003).

Etapa 3. Síntesis química de los posibles antígenos peptídicos.

Los péptidos que sean reconocidos durante el inmunoensayo del Pepscan por los anticuerpos de los pacientes, son seleccionados para ser sintetizados en mayor cantidad mediante dos posibles metodologías: t-BOC (Houghten y col. 1986) y Fmoc (Atherton y col. 1978), que permiten sintetizar péptidos en fase sólida y el producto resultante tiene el aspecto de polvo cristalino generalmente de color blanco, que podrá ser evaluado por diferentes técnicas inmunológicas, tales como las técnicas de ELISA (Voller, 1978) y de MABA (Noya y Alarcón de Noya, 1998). Una vez sintetizados los péptidos se procede a su control de calidad evaluando el peso molecular de cada péptido mediante espectrometría de masas (EM) y determinando su pureza mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Etapa 4. Evaluación de la antigenicidad utilizando la técnica de MABA.

El mapeo previo mediante la técnica de Pepscan permite seleccionar los péptidos más relevantes y

reducir el número de ellos para luego evaluarlos por MABA. Esta prueba permite estudiar una gran cantidad de sueros de pacientes en un solo experimento y comprobar cómo funcionan los péptidos como candidatos para el inmunodiagnóstico masivo. Su mayor ventaja se basa en la evaluación comparativa rápida, económica y simultánea de varias preparaciones antigénicas frente a muchos sueros, permitiendo el multidiagnóstico simultáneo de una gran variedad de enfermedades infecciosas y parasitarias.

A continuación, se describe de forma muy general, en qué consiste esta técnica.

4.1. *Técnica MABA*: el acrónimo MABA, corresponde a las siglas del inglés *Multiple Antigen Blot Assay*. Es una técnica “hecha en casa” diseñada en nuestro laboratorio (Noya y Noya, 1998, Noya y col. 2009), versátil, confiable, reproducible y económica para el análisis de múltiples compuestos de manera simultánea. Se basa en la adhesión de hasta 26 diferentes antígenos (en este caso péptido) a una tira de nitrocelulosa usando un dispositivo acrílico de origen industrial y comercial (*Miniblotter*®) con canales paralelos.

4.1.1. Utilizando este dispositivo acrílico, se sensibiliza un papel de nitrocelulosa (NC) u otro soporte de similares características con los diferentes péptidos a estudiar a través de canales paralelos.

4.1.2. *Bloqueo de la membrana de NC*: una vez se adhieren los péptidos al papel de NC, se bloquean las áreas sin péptidos con leche descremada para evitar la adhesión inespecífica de los anticuerpos y luego se corta de forma perpendicular a los canales, de manera que todos los compuestos queden alineados como recuadros antigénicos en una sola tira.

4.1.3. *Análisis de antigenicidad de los péptidos por los sueros*: las tiras de NC conteniendo los recuadros de la hilera de diferentes péptidos, se incuban individualmente con sueros (u otros fluidos) de pacientes infectados. Posteriormente se revela si hubo reconocimiento con un anti-anticuerpo humano marcado con una enzima y el conjugado apropiado para comprobar si los anticuerpos de la muestra reaccionan con alguno(s) de los compuestos (antígenos) adsorbidos a la membrana de NC.

4.1.4. *Revelado del reconocimiento anticuerpos-péptidos*: las señales positivas son registradas usando sustratos quimioluminiscentes o colorimétricos precipitables, tal como fuera señalado en el punto 2.3.

Con esta estrategia, es posible determinar el perfil de enfermedades infecciosas (de exposición presente o pasada) mediante la detección de anticuerpos contra una o más enfermedades, lo cual debe ser luego confirmado con pruebas especializadas para cada una. De esta manera, unos pocos microlitros de sangre (60 microlitros) o saliva pueden ser útiles para detectar simultáneamente hasta 26 enfermedades.

El MABA permite la demostración cualitativa simultánea de la **antigenicidad** e **inmunogenicidad** de antígenos obtenidos en forma de péptidos sintéticos, moléculas recombinantes o preparaciones crudas, con alta sensibilidad y especificidad y bajo costo.

Algunas variantes y mejoras, como el **Cross-MABA** permiten hacer una evaluación cuantitativa del grado de reacción de cada suero (Noya y col. 2015). Otra ventaja del MABA es que un único ensayo permite la evaluación de al menos 26 sueros diferentes contra 26 antígenos diferentes, lo cual es equivalente a 8 placas de ELISA convencionales. El costo por evaluación/antígeno/paciente es de 0.006\$ por MABA vs. 0.129 \$ por ELISA.

Experiencias

Cabe destacar que esta es una de las diversas estrategias que pueden llevarse a cabo para identificar péptidos sintéticos de valor como biomarcadores de infección, patología y cura. Su éxito dependerá en primer lugar de cuánta información se disponga del proteoma del patógeno, ya que no todas las proteínas caracterizadas en el proteoma son antigénicas o inmunogénicas.

Recientemente nuestro equipo ha identificado, bajo la estrategia anteriormente expuesta, nuevos antígenos basados en péptidos sintéticos para el diagnóstico de Hepatitis A mediante Pepscan, MABA y ELISA: Un péptido dimerico identificado como IMT-1996, localizado en el extremo C-terminal de la

proteína VP1, resultó antigénico con una frecuencia de reconocimiento de anticuerpos anti-IgG entre el 87–100% y 100% de reconocimiento para anticuerpos anti-IgM (Gauna y col. 2015).

Asimismo, hemos utilizado la técnica del Pepscan para seleccionar epítomos relevantes para el diagnóstico de hepatitis C, esquistosomiasis y

malaria (Zerpa y col. 2006). Luego, mediante el MABA ha sido posible evaluar los epítomos escogidos frente a un gran número de sueros de pacientes, con lo cual hemos obtenido frecuencias de reconocimiento suficientemente altas para algunos de ellos y por lo tanto se han usado en el tamizaje preliminar de poblaciones para luego ser confirmados por pruebas particulares en cada caso. Por ejemplo, péptidos derivados de la proteína Sm31 de *Schistosoma mansoni* fueron reconocidos por 49-89% de pacientes con bilharzia, con 100% de especificidad (Noya y Noya, 1998). También, mediante MABA se identificaron péptidos inmunodominantes de la proteína Sm32 de *Schistosoma mansoni* (Noya y col. 2003).

De esta manera, se detectan anticuerpos en sueros de los pacientes, así como adicionalmente se puede evaluar la inmunogenicidad de estos epítomos en ratones, conejos o gallinas para producir anticuerpos policlonales mono-específicos capaces de reconocer esas moléculas en ensayos de captura de antígenos circulantes en fluidos corporales.

El MABA puede ser implementado y adaptado para poblaciones e instituciones particulares, tales como bancos de sangre y laboratorios clínicos, así como para detectar enfermedades en pacientes pediátricos y en inmunocomprometidos. También ha sido útil en estudios de reactividad cruzada (Losada y col. 2005) y en la evaluación de protocolos de vacunación (Noya y col. 2007, Noya y col. 2010, Chacón y col. 2003, Sulbaran y col. 2013), siendo estas otras de las líneas de investigación importantes de nuestro laboratorio.

En estos momentos ambas técnicas están siendo utilizadas en la búsqueda de biomoléculas que pudieran ser empleadas en el diagnóstico de la malaria usando saliva, con resultados alentadores.

Finalmente, es importante recordar que las

coinfecciones son muy comunes en los países en desarrollo, por lo que una práctica médica racional e integral requiere de conocer la historia actual o el contacto anterior de un paciente frente a varios patógenos importantes, de allí la importancia de aprovechar la visita a los servicios de salud para descartar otras enfermedades que no necesariamente fueron el motivo de consulta y ofrecer un tratamiento oportuno.

REFERENCIAS

- ATHERTON E., FOX H., HARKISS, D., LOGAN CJ SHEPPARD RC, WILLIAMS J. (1978). A mild procedure for solid phase peptide synthesis: use of fluorenylmethoxycarbonylamino-acids. *J Chem Soc Chem Commun*, 537-539.
- CHACÓN N., LOSADA S., BERMÚDEZ H., CESARI IM., HOEBEKE J., NOYA O. (2003). Immunogenicity of polymerizable synthetic peptides derived from a vaccine candidate against schistosomiasis: the asparagynil endopeptidase (Sm32). *Immunol Lett*, 88(3): 199-210.
- FRANK R., (2002). The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports-principles and applications. *J Immunol Methods*, 267(1):13-26.
- GAUNA A., LOSADA S., LORENZO M., BERMÚDEZ H., TOLEDO M., PÉREZ H., CHACÓN E., NOYA O., (2015). Synthetic peptides for the immunodiagnosis of hepatitis A virus infection. *J Immunol Methods*, 427:1-5.
- GEYSEN M., MELOEN R.H., BARTELING S.J. (1984). Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *PNAS*, 81 (13): 3998-4002.
- HÄRKÖNEN T., LANKINEN H., DAVYDOVA B., HOVI T, ROI-VAINEN M. (2002). Enterovirus infection can induce immune responses that cross-react with β -cell autoantigen tyrosine phosphatase IA-2/IAR. *J Med Virol*, 66, 340-350.
- HILPERT K., WINKLER D.F., HANCOCK R.E., (2007). Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. *Nat Protoc*, 2(6):1333-1349.
- HOUGHTEN RA, DEGRAW ST, BRAY MK, HOFFMANN SR, FRIZZELL ND (1986). Simultaneous multiple peptide synthesis: The rapid preparation of large number of discrete peptides for biological, immunological and methodological studies. *BioTechniques*, 4:522-8.
- KOVACS-NOLAN, J., YOO, D. AND MINE, Y. (2003) Fine mapping of sequential neutralization epitopes on the subunit protein VP8 of human rotavirus. *Biochem J*, 376, 269-275.
- LOSADA S., CHACÓN N., COLMENARES C., BERMÚDEZ H., LORENZO A., POINTIER JP., THERON A., ALARCÓN DE NOYA B., NOYA O., (2005). *Schistosoma mansoni*: Cross-reactivity and antigenic community between different species. *Exp Parasitol*, 111:182-190.
- MOUNT D., (2007). Using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). *CSH Protoc*. 1;2007:pdb.top17.
- NOYA O., ALARCÓN DE NOYA B., (1998). The multiple antigen blot assay (MABA): a simple immunoenzymatic technique for simultaneous screening of multiple antigens. *Immunol Lett*, 63(1):53-56.
- NOYA O., ALARCON DE NOYA, B., BALLEND, ZERPA N., COLMENARES C., LOSADA S., BERMÚDEZ H., (1998). Use of synthetic peptides derived from adult worm proteins of *Schistosoma mansoni*, in the diagnosis of schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93 (Suppl 1): 157-158.
- NOYA, O., GUZMÁN C., BERMÚDEZ H., ZERPA N., NODA A., COLMENARES C., LOSADA S. Y ALARCÓN DE NOYA, B., (2003). Péptidos sintéticos para el diagnóstico y vigilancia epidemiológica en esquistosomiasis mansoni. *Bol Mal Sal Amb*. XLIII (1): 39-43.
- NOYA O., LOSADA S., BERMÚDEZ H., LORENZO M.A., TOLEDO M., ALARCÓN DE NOYA B., (2010). Aproximación al desarrollo de una vacuna sintética contra *Schistosoma mansoni* En: *La lucha frente a las enfermedades de la pobreza*. Fundación BBVA.
- NOYA O., LOSADA S., BERMÚDEZ H., LORENZO MA., TOLEDO M., ALARCÓN DE NOYA B., (2007) Vacunas anti-esquistosoma *Salus*, 11 (Supl. 1): 48-51.
- NOYA O., LOSADA S., TOLEDO M., GAUNA A., LORENZO M.A., BERMÚDEZ H. ALARCÓN DE NOYA, B., (2015). Improvements and variants of the Multiple Antigen Blot Assay-MABA, an immunoenzymatic technique for simultaneous antigen and antibody screening. *Methods Mol Biol*, 1312:301-319.
- NOYA O., LOSADA S., TOLEDO M., ALARCÓN DE NOYA B., (2009) The multiple antigen blot assay: simple, versatile and multipurpose immunoenzymatic technique. *Methods Mol Biol*. 536:237-251.
- SULBARÁN G, NOYA O, BRITO B, BALLÉN DE, CESARI IM. 2013. Immunoprotection of mice against *Schistosomiasis mansoni* using solubilized membrane antigens. *PLoS Negl Trop Dis*. 7(6):e2254.
- VOLLER A. (1978). The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (theory, technique and applications). *Ric Clin Lab*, 8(4):289-98.
- ZERPA NC., WIDE A., NODA J., BERMÚDEZ H., PABÓN R., NOYA O., (2006). Immunogenicity of synthetic peptides derived from *Plasmodium falciparum* proteins. *Exp Parasitol*, 113(4):227-34.

Medicina Tropical y su proyección actual: Un breve panorama

**Nathalie Chacón Fonseca¹,
Luis Alfonso Colmenares Suárez²**

¹ Universidad Central de Venezuela.
Facultad de Medicina. Escuela Luís Razetti.
Cátedra de Medicina Tropical y Sección
de Geohelmintiasis.
Instituto de Medicina Tropical.
natychacon2004@gmail.com

² Universidad Central de Venezuela.
Facultad de Medicina. Escuela Luís Razetti.
Cátedra de Medicina Tropical y Sección
de Endemias Rurales.
Instituto de Medicina Tropical.
lacsuarez@yahoo.com

RESUMEN

La rica tradición histórica y los importantes avances científicos de la Medicina Tropical (MT) han contribuido a su inmensa proyección actual. La literatura consultada así lo refleja. Esta investigación documental apuntó a esa misma dirección y buscó enriquecer el acervo bibliográfico al respecto. Mediante la lectura crítica de referencias y el método cualitativo de Huberman y Miles se estructuró una argumentación discursiva referente a la proyección actual de la MT a lo largo de las tres secciones de este trabajo: su origen histórico, su ulterior desarrollo, sus tendencias y perspectivas futuras. El médico escocés Patrick Manson (1844-1922), es considerado como el padre de la disciplina. A su obra se le unieron los aportes de otros investigadores tales como Ross, Bruce, Leishman, Castellani, Yersin y Balfour, en enfermedades tropicales tales como malaria, leishmaniasis y fiebre amarilla. El conjunto de sus contribuciones sirvió de base para ulteriores avances en los siglos XX y XXI. Los nuevos retos para la MT y la posible dirección futura de esta interdisciplina, podrían ser el control de enfermedades desasistidas en medios caracterizados por pocos recursos económicos y humanos, mediante la toma de medidas encaminadas hacia la reducción de la morbi-mortalidad y la carga por enfermedad de las principales enfermedades infecto-contagiosas endémicas, con el diagnóstico y tratamiento precoz; el desarrollo y aplicación de vacunas aprobadas para las principales endemias y la implementación de medidas preventivas basadas en evidencia, culturalmente aceptada por las poblaciones expuestas.

Palabras Clave: Medicina Tropical; historia; avances; proyección; historia de la medicina

A BRIEF OVERVIEW: TROPICAL MEDICINE AND ITS CURRENT PROJECTION

ABSTRACT

Tropical Medicine's great currently projection is due to its rich historic tradition and important scientific advances. The consulted bibliography reflects this. This documented investigation pointed in the same direction and looked forward to enrich the bibliographic literature on this area. Using Huberman and Miles qualitative method, references were critical read and a discursive argumentation has been structured in reference to the actual projection of Tropical Medicine along the three sections of this work: its historical origin, its subsequent development, its tendencies and future perspectives. The Scot-

tish physician Patrick Manson (1844- 1922), is considered the father of this discipline. To his work were added the contributions of other researchers such as Ross, Bruce, Leishman, Castellani, Yersin and Balfour, in tropical diseases such as malaria, leishmaniasis and yellow fever. This set of contributions formed the basis for subsequent advances in the XX and XXI centuries. The new challenges for Tropical Medicine and the possible future direction of this interdisciplinary medical area, could be the control of neglected diseases in areas characterized by few economic and human resources, by taking measures to reduce the morbid-mortality and the burden caused by the main endemic infection diseases, using diagnostic and early treatment; developing and making possible the application of approved vaccines for the main endemic diseases with the implementation of preventive measures based in medical evidence and culturally accepted by the exposed populations.

Keywords: Tropical Medicine; history; advances; projection

INTRODUCCIÓN

El inicio histórico de la Medicina Tropical (MT), como disciplina formal, a finales del siglo XIX, estuvo signado por la polémica. Muchos historiadores han planteado que ésta comenzó como una herramienta apuntaladora del dominio social y político de las potencias europeas en sus colonias de ultramar. No profundizaremos en este particular pero sí podemos sostener que esta disciplina se desmarcaría luego de esta práctica y en la actualidad brilla con luz propia en el firmamento de la medicina actual. Se hace necesario el planteamiento de dos consideraciones preliminares sobre la MT, vistas desde el prisma de la actualidad, antes de retrotraernos a su historia y a sus avances como una manera de abordar su proyección científica. Una consideración se refiere a la MT como “disciplina”; la otra, a su campo de estudio.

La MT, más que una disciplina, es una interdisciplina. Es una interdisciplina porque dialoga y se enriquece con los saberes de otras áreas del conocimiento tales como la biología, la antropología, la sociología, y la geografía, con los fines de abordar de la manera más integral posible su campo de estudio. Así, logra la construcción de un cuerpo de conocimiento teórico-práctico que contribuye a la salud pública de las poblaciones asentadas en las zonas geográficas bajo su estudio.

La MT posee un amplio campo de estudio. La MT estudia la ocurrencia de una variada gama de enfermedades (p.ej malaria, leishmaniasis y helmintiasis intestinales) y condiciones (p.ej. pobreza y desnutrición) que predominan, no sólo en la franja intertropical geográfica del planeta, sino también en aquellas zonas donde se conjugan las condiciones bioclimáticas del ambiente tropical, aunque no se ubiquen estrictamente en dicha franja (Pifano 1964).

La docencia en MT enseña los elementos conceptuales y doctrinarios de esa disciplina aplicados a su campo específico de estudio. La formación de pregrado en esta área resulta vital para el estudiante. Este aspecto es de fundamental importancia en el que hacer global del médico ya graduado. La Universidad Central de Venezuela (UCV) se ha destacado en este punto. A lo largo de los planes de estudio de pregrado ha incorporado el conocimiento de esta disciplina. El camino fue zigzagueante. Va desde el Código de Instrucción Pública decretado 18 de agosto de 1905 y la creación -por primera vez- de un curso específico de Patología Tropical (integrado al de Patología Médica II) en el quinto año de la carrera, hasta la Ley de Instrucción Superior y Especial del 4 de junio 1924, por la cual dicho curso reaparece integrado al de Patología Interna, en el cuarto año. Así se mantendría hasta la fundación de la Cátedra de Medicina Tropical (CMT), en 1926 (González Guerra, 1998). El 1 de enero de 1926, por decreto presidencial y con el refrendado ministerial, se crea la “cátedra especial” de Medicina Tropical y el Instituto de Medicina Tropical. Al día siguiente, se designa a Enrique Tejera Guevara (1889-1980) como Jefe de Cátedra (González Guerra, 1998), destacado médico tropicalista carabobeño, notable investigador sobre la enfermedad de Chagas, leishmaniasis tegumentaria americana, malaria congénita, disentería amibiana, entre otras patologías. Fue Ministro de Salubridad, Agricultura y Cría (1936) y Ministro de Educación de Venezuela (1938-39) durante el gobierno del Presidente Eleazar López Contreras (1883-1972) (Plaza 1996).

Luego de su fundación, la CMT contaría con el notable impulso del médico yaracuyano Félix Pifano

(1912-2003) (Navas 2000; Navarro et al. 2003) y de una pléyade de médicos que consolidaría institucionalmente a la cátedra. Actualmente la cátedra está conformada por los profesores (en orden alfabético): Ana Graciela Angulo, Nathalie Chacón Fonseca, Luis Alfonso Colmenares Suárez, Sandra García, Carmen Teresa Fernández, Carlos Madera y Novella Rojas.

La búsqueda de la excelencia en el que hacer docente, investigativo y asistencial, ha sido su norte desde su fundación hasta el presente, por lo que está preparada para transitar hacia un futuro lleno de retos y oportunidades.

Realizadas las necesarias consideraciones anteriores, retomaremos el tópico de este artículo. En este sentido, no se pretende ofrecer una visión exhaustiva sobre el devenir histórico y los avances de la MT para presentar su proyección actual. Este ensayo sólo pretende ofrecer una visión panorámica del asunto aunque sabemos que aún así, será y se hará una contribución al acervo bibliográfico del tema. El lector que desee mayor información al respecto deberá consultar fuentes adicionales. En cuanto a la metodología, se efectuará la estrategia de la lectura crítica propuesta por Paul y Elder (Paul et al. 2000) de referencias bibliográficas relevantes y sus resultados se analizarán con el método cualitativo propuesto por Huberman y Miles, citado por Salgado Lévano (Salgado-Lévano 2007). Finalmente se escribirá esta investigación con los elementos de la argumentación discursiva.

Este trabajo se desarrollará a lo largo de tres secciones. La primera enfoca el origen histórico de la MT; la segunda, su ulterior desarrollo; la tercera, un esbozo de importantes avances científicos en diversas enfermedades tropicales.

I. EL ORIGEN DE LA MEDICINA TROPICAL. UN ESBOZO

La Medicina Tropical se nutrió de un rico legado histórico antes de su emergencia como especialidad científica. En este particular, entre algunos de los hitos más importantes figuran: a) la invención del

microscopio en 1675 por el holandés Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) y así logra observar por primera vez las bacterias; b) las diversas técnicas para colorearlas: el carmín (Hoffman, 1869), el azul de metileno (Weigert, 1875), la coloración de Gram (Hans Christian Gram, 1884), el perfeccionamiento de la coloración para bacilos tuberculosos (Ziehl y Nielsen, finales del siglo XIX); c) los inmensos avances en la etiología de numerosas enfermedades infecciosas por parte de Louis Pasteur (1822-1895), Robert Koch (1843-1910) y numerosos “cazadores de microbios” a finales del siglo XIX y comienzos del siglo XX que hicieron “época” con sus descubrimientos (Maguiña VC, 2000).

Un antecedente a destacar es el descubrimiento del agente causal del paludismo en noviembre de 1880 por parte Charles Louis Alphonse Lavarán (1845-1922), cuando prestaba servicio militar en Argelia. Lavarán observó al microscopio un preparado de sangre de un paciente palúdico y llamó su atención unos corpúsculos móviles que dibujó y describió con detalle. Dijo entonces que se trataba de “...células pigmentadas, redondas o curvadas en forma de media luna, que se mueven como amebas” (Gógora-Bianchi 1997). Este hecho impulsaría el estudio de esa y otras enfermedades tropicales de la época.

El inicio de la Medicina Tropical como *disciplina formal* (e independiente de la microbiología y la infectología) comenzó a gestarse en el último cuarto del siglo XIX, con los aportes del médico escocés Patrick Manson (1844-1922). Él no fue sólo un pionero; él fue el padre de la MT. Le construyó un nicho en la ciencia de su tiempo al definir y delimitar su campo de estudio y al dotarla de las necesarias herramientas conceptuales y clínicas para su posterior desarrollo. Literatura especializada, con un tradicional peso académico, así lo asevera (Cook et al. 2009; Porter 2003). Nos apresuramos en aclarar que la “paternidad” de la MT es controversial ante la variedad e impacto del quehacer clínico e investigativo de otros pioneros (véase más adelante). Se escapa de los objetivos de este artículo el adentrarnos en los intrínquilos de esta polémica.

Hubo avances científicos notables previos al inicio de la Medicina Tropical como disciplina formal. Es innegable. Sin embargo, “aun así la relación entre clima y enfermedad fue cuestionada con vehemencia. Las explicaciones de las dolencias tropicales habían girado sobre las teorías miasmáticas del ambiente, enraizadas en último extremo en las enseñanzas hipocráticas: el calor produce putrefacción...que a su vez produce una atmósfera perjudicial (miasmas), que provoca fiebres terribles”. Las explicaciones alternativas, que realmente fueron un desafío, surgieron en el último cuarto del siglo y fueron auspiciadas por el escocés Patrick Manson” (Porter 2003)

Regresando a Manson, tenemos que este médico escocés trabajó entre 1866 y 1890 como médico en Asia (Figura 1). En este sentido, atendió las necesidades de la población, estuvo pendiente de los colonizadores europeos y condujo investigaciones novedosas sobre malaria, filariasis y lepra. Por ejemplo, él comenzó a estudiar la elefantiasis, y descubrió que su etiología era parasitaria y la transmitía un vector. Con éste descubrimiento pionero y su labor asistencial comenzó a ganar reputación y fue bien recibido al retornar a Inglaterra en 1890 (Gibson 2009; Porter 2003).

Una vez en Inglaterra su influencia se haría notable. Se desempeñaría como médico en varios hospitales, pero el jalón decisivo sería su designación en 1897 como Médico Consejero de la Secretaría de Estado para las Colonias. Desde aquí, estableció una relación fructífera con Joseph Chamberlain, el Secretario Colonial, para impulsar una disciplina, que luego se conocería como la Medicina Tropical (Gibson AD). De hecho, en 1898, escribe la primera edición del libro fundacional de la disciplina: *Tropical Diseases: a Manual of the Diseases of Warm Climates* (Cook et al. 2009) publicado en 1898 (y que alcanzaría 23 ediciones hasta el presente). A través de sus gestiones, Manson también logró la fundación en 1899 de la London School of Tropical Medicine (Maguiñas, 2000).

Su perseverancia también sería pasmosa. Este médico escocés no desmayaría a pesar de la tragedia y las dificultades de la Primera Guerra Mundial

(1914-1918). Él enviaría a los alumnos de la “London School” a los frentes de guerra para atender a los afectados por dolencias tropicales. Ello puso de relieve la importancia “estratégica” de la disciplina y reafirmó el “prestigio” académico de la disciplina (Gibson 2009).



Figura 1.

Sir Patrick Manson. (3 de octubre de 1844 – 9 abril de 1922), médico de Escocia, graduado en la Universidad de Aberdeen, ejerciendo como parasitólogo y fundador de la medicina tropical, en Taiwan, China, Hong Kong y Londres. Fundador de instituciones educativas como Hong Kong College of Medicine for Chinese y London School of Hygiene & Tropical Medicine. Foto tomada de Wellcome Images. Wellcome Trust, United Kingdom.

II. EL DESARROLLO HISTÓRICO. UNA VISIÓN PANORÁMICA

Al aporte de Manson a la MT se le unirían las contribuciones de una pléyade de otros pioneros (Figura 1).

Así, comenzando por el descubrimiento de Laveran ya referido, pasando por la identificación del agente etiológico de la leishmaniasis visceral por Leishman y Donovan y culminando con el aporte intelectual al norte preventivo de la MT efectuado por Balfour, se va estructurando el cuerpo de conocimientos que le imprimirían a la MT un perfil particular y un poderoso alcance (Cook et al. 2009) (Tabla 1).

Tabla 1. Principales aportes a la Medicina Tropical

Investigador	Aporte Científico
Patrick Manson (1844-1922)	El mosquito <i>Culex fatigans</i> , (<i>Culex quinquefasciatus</i>) es el hospedador intermediario de la filaria <i>Wuchereria bancrofti</i> . Describe especie <i>Schistosoma mansoni</i> y la <i>sparganosis</i> . Teoría del mosquito transmisor de la malaria (British Medical Journal (1900) pp 949-951).
Alphonse Laveran (1845-1922)	El descubridor del agente causal de la malaria en 1880.
Ronald Ross (1857-1932) y malariólogos italianos	La verificación científica de la transmisión vectorial de la malaria (The Lancet (1898) pp. 488-489).
Carlos Finlay (1833-1915)	Investigaciones sobre la transmisión vectorial de la fiebre amarilla.
James Cantlie (1851-1926)	Cirujano tropical y fundador de la Real Sociedad de Medicina Tropical e Higiene (RSMTH).
David Bruce (1855-1931)	Trabajos sobre la brucelosis y la tripanosomiasis africana
Theodor Bilharz (1825-62) Robert Leiper (1881-1969) e investigadores japoneses	Descubrimiento de la esquistosomiasis y sus diversas formas clínicas y distintas especies de <i>Schistosoma</i> .
Joseph Everett Dutton (1874-1905)	Su estudio de la tripanosomiasis africana y la borreliosis
William Leishman (1865-1926) Charles Donovan (1863-1951)	El descubrimiento del agente causal de la leishmaniasis visceral
Leonard Rogers (1868-1962)	Sus trabajos sobre diversas enfermedades tropicales en la India y como fundador de la Escuela de Medicina Tropical de Calcutta Investigador y uno de los fundadores del Ross Institute and Hospital for Tropical Diseases

Neil Hamilton Fairley (1891-1966):	Pensador sobre la proyección futura de la medicina tropical, describió el esprue tropical en la India, trabajo sobre la disentería bacilar y el ciclo del <i>Plasmodium vivax</i> y la importancia de los componentes alternativos de la quinina.
Alexandre Yersin (1863-1943) y otros investigadores	Por sus aportes en el conocimiento de la peste bubónica
Andrew Balfour (1873-1931)	Como un pionero de la medicina preventiva en los trópicos y como primer director de la <i>London School of Hygiene and Tropical Medicine</i> .

En este punto, debemos acotar que nuestro país tuvo una participación de importancia universal en esta historia a través del médico francés, Louis Daniel Beauperthuy (1807-1871) quien se radicó en Venezuela por 29 años. Él propuso la hipótesis de la transmisión vectorial de la fiebre amarilla, a través del mosquito conocido como *Aedes aegypti*. Incluso propuso medidas preventivas tales como la eliminación de los depósitos de agua y el uso de mosquiteros (Oliveira 2002). Su propuesta la publicó en la Gaceta Oficial de Cumaná en 1854 aunque no tuvo la aceptación que él esperaba porque contradecía la teoría de los “miasmas”. No obstante, él se adelantó 27 años a los experimentos de Finlay y casi medio siglo, a los de la famosa Comisión Americana, quienes confirmaron definitivamente la transmisión vectorial de la fiebre amarilla (Oliveira 2002).

En síntesis los pioneros de la MT lograron articular un conjunto de novedosas aproximaciones a muchas enfermedades tropicales. Ellos contribuyeron de manera muy relevante a una nueva comprensión sobre la participación de diversos factores climáticos, epidemiológicos e incluso sociales, en la transmisión de esas enfermedades. De manera progresiva, el proyecto de Manson se va cristalizando.

Otro punto a resaltar es la fundación de varios institutos claves que primero posicionarían y luego consolidarían la disciplina. Siguiendo a Maguiñas

(Maguiñas, 2000) entre éstos figuran: la Liverpool School of Tropical Medicine (Gran Bretaña, 1899); el Instituto de Higiene Marítima y Tropical de Hamburgo (Alemania, 1900), dirigido por el Dr. Bernhard Nocht y un Hospital para enfermedades tropicales; el Instituto de Medicina Tropical de Amsterdam (Países bajos, 1912); así como el Instituto de Medicina Tropical de Tulane (EUA, 1913) y el Instituto de Medicina Tropical de Harvard (EUA, 1914). Estos centros, junto con numerosos institutos subsiguientes dedicados a la asistencia, docencia e investigación en MT en todo el mundo y en concordancia con el rico legado histórico de los pioneros, contribuirían de manera decisiva a su proyección en la medicina actual.

III. SU ESTADO ACTUAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Los inicios coloniales de la MT surgieron de la necesidad de resolver problemas derivados de enfermedades parasitarias de climas tropicales, como por ejemplo, las geohelmintiasis. En muchos países desarrollados ha sido desplazada esta especialidad de los centros de salud, posiblemente será retomada nuevamente por la globalización de las enfermedades tropicales por causa de la migración, especialmente hacia Europa, por causa de las guerras del mundo árabe y en el medio oriente. En los países subdesarrollados la MT, no perderá vigencia, ya que las enfermedades tropicales se comportaran como enfermedades desasistidas ligadas a la pobreza, influenciadas por conflictos civiles, determinadas por políticas públicas en salud no adecuada y de difícil manejo por conflictos armados entre poblaciones, presencia de poblaciones nativas o la presencia de susceptibilidad inmunológicas del paciente enfermo.

Se espera la nueva era de la MT, como una especialidad para tratar enfermedades infecciosas que incluya no solo las enfermedades parasitarias, la medicina del viajero, incluyendo las enfermedades de transmisión sexual, sino también los eventos o accidentes con animales productores de toxinas.

Los nuevos retos para la MT serán el control de

enfermedades desasistidas en medios caracterizados por pocos recursos económicos y humanos, mediante la toma de medidas encaminadas hacia:

a.- Reducción de la morbi-mortalidad y la carga por enfermedad de las principales enfermedades infecto-contagiosas endémicas, con el diagnóstico y tratamiento precoz:

Las herramientas utilizadas en el diagnóstico de las enfermedades tropicales requieren ser precisas pero también apropiadas para su uso en ambientes de pocos recursos. En el caso de las *flaviviriosis*, específicamente, para el virus del Zika, se desarrolló un diagnóstico rápido, sensible, específico y menos costoso, basado en el ensayo de amplificación isotérmica mediada por bucle (Loop mediated isothermal amplification, LAMP en inglés). El LAMP permitió diferenciar los virus de Zika asiáticos de los africanos, con primers específicos. También permite la detección directa del ARN del virus Zika, en cultivos celulares, mosquitos, en sangre, plasma, saliva, orina, semen, sin la necesidad de transcripción reversa o aislamiento previo del ARN (Chotiwan N et al. 2017).

La enfermedad de Chagas, es una enfermedad debilitante que puede acompañar al paciente toda la vida, de significativa importancia en Latinoamérica y como amenaza emergente en la salud pública global. Es un ejemplo completo de modelo de enfermedad desasistida, prevalece en ambientes de pobreza extrema y carece de inversiones en el desarrollo científico de tratamientos y vacunas. Una de las prioridades es la identificación de un biomarcador que trascienda los límites de los métodos utilizados en la actualidad para Chagas, dependientes de factores de reproducibilidad, exactitud sin interferencia genética, especie infectante, estadio de la enfermedad, tipos clínicos según poblaciones. Otras necesidades prioritarias es la detección temprana del Chagas congénito, rápida evaluación de la eficacia del tratamiento o la falla del mismo, indicación o predicción de la progresión de la enfermedad y tipificación directa de las muestras clínicas (Balouz et al. 2017). Nuevas herramientas en

desarrollo y por desarrollar darán respuestas a los esquemas de intervención y manejo clínico de los pacientes con Chagas, agudo y crónico.

Como indicamos antes, las respuestas de la ciencia básica proyectada hacia el desarrollo de un ensayo más sensible en la detección de Chagas congénito es una necesidad urgente, en toda Latinoamérica. El elevado número de casos tratados exitosamente durante la infancia debe ser el incentivo para resolver este problema de diagnóstico en salud pública. Más de un 50% de los recién nacidos infectados no son detectados y pocos son detectados a los 9 meses de seguimiento post-natal. La comparación de diferentes métodos empleados usando sangre del cordón umbilical, mostró para el qPCR, TESA-blot y microscópico sensibilidades/especificidades de 68.6%/99.1%, 58.3%/99.1% and 16.7%/100%, respectivamente (Messenger et al. 2017). Posiblemente, los métodos moleculares podrían facilitar el diagnóstico temprano y de seguimiento post-natal, pero la logística y los costos-prohibitivos para una rutina de pesquisa en ambientes de pocos recursos determinarán el empleo de alternativas en el diagnóstico de Chagas congénito.

En los casos de detección precoz de casos de Chagas en campo se han desarrollado pruebas rápidas, Chagas Stat-Pak (ChemBio Inc.) and Chagas Detect Plus (InBIOS Inc.) que mostraron sensibilidad/especificidad de 100%/99.3% cuando se compararon con pruebas convencionales. La idea es de útil aplicación en comunidades retiradas, aunque requiere de confirmación serológica, mejorará el inicio temprano de la terapéutica antiparasitaria (Agüez et al. 2017).

b.- Desarrollo y aplicación de vacunas aprobadas para las principales endemias:

Una de los avances más prometedores en el desarrollo de vacunas anti-helmínticas, lo constituye la vacuna contra el *Necator americanus*, usando como antígeno la *Glutation-S-transferasa-1* (Na-GST-1) (Diemert et al. 2017). Dicha enzima participa en la digestión de la hemoglobina por parte del ancilostomideo adulto, constituyéndose en un blanco

antigénico para el desarrollo de vacunas. Los estudios ya fueron probados en su fase I en voluntarios en Brazil y Estados Unidos, logrando demostrar buena tolerancia, pocos efectos adversos y niveles de anticuerpos específicos aceptables caracterizados por IgG1 y menos cantidad de IgG3. Los estudios continuaran con ensayos pre-clínicos en niños.

Una de las problemáticas que enfrenta esta medida preventiva es la aplicación de las vacunas en un porcentaje suficientemente amplio que permita mantener la cobertura requerida y lograr el control de la enfermedad respectiva. Los países africanos y muchos países latinoamericanos se les hacen difícil el cumplimiento de las metas en vacunación, por distintas razones. Las diarreas continúan siendo una de las principales causas de morbi-mortalidad en menores de 5 años y la diarrea causada por Rotavirus es prevenible con vacuna anti-viral. Sin embargo, se ha reportado en Kenia poca cobertura con la vacuna debido a problemas relacionados con la accesibilidad y distribución de la vacuna en el país (Wandera et al. 2017).

Los novedosos estudios en la búsqueda de una vacuna para el control de la malaria han conducido a los investigadores a probar antígenos hemáticos, como el gametocito (GMZ2) y evaluar el efecto de la infección por helmintos intestinales en el desarrollo de inmunidad hacia los gametocitos de *Plasmodium falciparum* en niños y adultos expuestos en la Republica Gabonesa, país situado en la costa oeste de África Central (Gebru et al. 2017). Los adultos mostraron una mayor respuesta de anticuerpos que los niños, pero los niños infectados con helmintos mostraron mayores títulos de anticuerpos que los niños no infectados. Esta data sugiere que los antígenos expuestos por el gametocito infectado son reconocidos por anticuerpos de sueros de niños expuestos a malaria y adultos semi-inmunes. Esta respuesta inmunitaria podría estar influenciada por exposición natural y por la vacunación.

La modulación de la respuesta inmunitaria a los antígenos candidatos a vacunas mediante la infección de parásitos deberá ser investigada con mayores detalles a futuro y podría tener impacto sobre el

desarrollo de vacunas contra la malaria o contra otros agentes infecciosos, como estrategia de control en países caracterizados por la poliparasitosis y la co-existencia de otras enfermedades infecciosas endémicas (Kofer et al 2017, Gebru et al. 2017).

c.- Implementación de medidas preventivas basadas en evidencia, culturalmente aceptada por las poblaciones expuestas:

En un futuro cercano, las medidas preventivas para las enfermedades tropicales deberán adaptarse a la idiosincrasia y la cultura de las diferentes poblaciones. Un ejemplo muy curioso, es el caso de una población indígena, Batwa (Uganda), que presenta el doble de las probabilidades de ser seropositivos para dos antígenos específicos de *Plasmodium falciparum*, el antígeno apical de superficie y la proteína-1 de la superficie del merozoito, cuando se compara con una población no indígena, Bakiga. (Cociente de verosimilitud = 2.08, 95% intervalo de confianza = 1.51–2.88) (Kulkarni y cols., 2017). En dicha población múltiples factores están asociados a una mayor exposición a la malaria y a un nivel elevado de anticuerpos cuando se compara con la población vecina. Las medidas preventivas para la reducción de la exposición a la malaria deberán implementarse y encaminarse con adaptaciones culturales particulares de la población indígena.

CONCLUSIONES

La Medicina Tropical emerge en el último cuarto del siglo XIX de la mano del médico escocés Patrick Manson y de varias figuras pioneras, tales como Ross, Bruce, Leishman, Castellani, Yersin y Balfour, entre otros. Su rico devenir histórico ha brindado a la práctica médica una gran variedad de recursos para la comprensión y abordaje de varias enfermedades tropicales tales como la malaria, la fiebre amarilla, la leishmaniasis, entre otras.

La MT ha contribuido y se ha nutrido del inmenso desarrollo científico y tecnológico del siglo XX y XXI. El conocimiento bioquímico, inmunológico,

epidemiológico, microbiológico, y parasitológico, entre otros, han sido fundamentales para considerables logros en el diseño de pruebas para el diagnóstico y tratamiento precoz, investigaciones sobre vacunas y medidas preventivas, de diversas enfermedades tropicales.

Dichos logros -cuyas raíces se alimentan y se retrotraen de las realizaciones de Manson y a los pioneros de la MT- benefician grandes segmentos de la población, muchos de ellos en situación vulnerable: niños, embarazadas, pobres, inmigrantes, víctimas de desastres naturales, entre otros.

Así, coincidimos con otros autores en que la considerable proyección científica actual de la Medicina Tropical, por una parte, se relaciona con su rica historia; por la otra, con la pertinencia social de muchos de sus avances científicos de primer orden. Tradición y vanguardia describen con precisión a esta interdisciplina.

REFERENCIAS

- BALOUZ V, AGÜERO F, BUSCAGLIA CA (2017) *Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps. Adv Parasitol. 97:1-45.*
- BASHFORD A (2000). *Is white Australia possible? Race, colonialism and tropical medicine. Ethnic and Racial Studies. 23(3): 248-271.*
- BEAUMIER CM, GOMEZ-RUBIO AM, HOTEZ PJ, WEINA PJ (2013). *United States Military Tropical Medicine: Extraordinary Legacy, Uncertain Future. 7 (Issue 12): e2448.*
- BOTERO D. (2004) *Que es la medicina tropical? Revista CES Medicina 18(1): 21-23.*
- CHOTIWAN N, BREWSTER-CD, MAGALHAES T, WEGER-LUCARELLI J, DUGGAL NK, RÜCKERT C, NGUYEN C, et al. (2017) *Rapid and specific detection of Asian- and African-lineage Zika viruses. Sci Transl Med. May 3; 9(388). pii: ea ag0538. doi: 10.1126/scitranslmed.aag0538. [Epub ahead of print]*
- COOK G y ZUMLA A. *Manson´s Tropical Diseases (2009) 22 edición. Editorial Elsevier.*
- COOK GC. (1990) *Early history of clinical tropical medicine in London. Journal of the Royal Society of Medicine. 83:38-42.*
- DIEMERT DJ, FREIRE J, VALENTE V, FRAGA CG, TALLES F, GRAHEK S, et al. (2017) *Safety and immunogenicity of the Na-GST-1 hookworm vaccine in Brazilian and American adults. PLoS Negl Trop Dis. May 2;11(5):e0005574. [Epub ahead of print].*
- EGÜEZ KE, ALONSO-PADILLA J, TERÁN C, CHIPANA Z, GARCÍA W, TORRICO F, et al. (2017) *Rapid diagnostic*

- tests duo as alternative to conventional serological assays for conclusive Chagas disease diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis.* Apr 3;11(4):e0005501. doi: 10.1371/journal.pntd.0005501. eCollection [Epub ahead of print].
- ESTRADA JH. La época del imperialismo y sus implicaciones en la salud pública. *Rev Fac Nac Salud Pública* 2008; 26(2): 215-222.
- FLEISCHER B (2000). A century of research in tropical medicine in Hamburg: the early history and present state of the Bernhard Nocht Institute. *Tropical Medicine and International Health.* 5(10): 747-751.
- GEBRU T, AJUA A, THEISEN M, ESEN M, NGOA UA, ISSIFOU S, et al. (2017) Recognition of *Plasmodium falciparum* mature gametocyte-infected erythrocytes by antibodies of semi-immune adults and malaria-exposed children from Gabon. *Malar J.* Apr 26;16(1):176. [Epub ahead of print]
- GIBSON AD (2009). *Miasma Revisited - The Intellectual History of Tropical Medicine.* *Aust Fam Physician* 38 (1-2), 57-59.
- GÓNGORA-BIANCHI RA (1997) Apuntaciones históricas en referencia a la medicina tropical. *Rev Biomed* 8:49-52.
- GONZÁLEZ GUERRA M (1998) Los Estudios Médicos en la Universidad Central de Venezuela a partir de 1891. Ediciones del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- JACKSONA Y y STEPHENSONA N. (2014). Neglected tropical disease and emerging infectious disease: An analysis of the history, promise and constraints of two worldviews. *Global Public Health,* 9(9): 995-1007.
- JOHNSON R. (2010) *The West African Medical Staff and the Administration of Imperial Tropical Medicine, 1902-14.* *The Journal of Imperial and Commonwealth History.* 38(3): 419-439.
- KOFER J, HOFER H, HARTMANN S. (2017) Next-Generation Parasitologists: Structured Training Programs Meet Educational Challenges. *Trends Parasitol.* Apr 21. [Epub ahead of print] doi: 10.1016/j.pt.2017.03.008.
- KULKARNI MA, GARROD G, BERRANG-FORD L, SSEWANYANA I, HARPER SL, BARAHEBERWA N, DONNELLY B, PATTERSON K, NAMANYA DB, LWASA S, DRAKELEY C. (2017) Examination of Antibody Responses as a Measure of Exposure to Malaria in the Indigenous Batwa and Their Non-Indigenous Neighbors in Southwestern Uganda. *Am J Trop Med Hyg.* 96(2):330-334.
- MAGUIÑA VC (2000). *Historia de la infectología y la medicina tropical y su importancia en Latinoamérica.* Diagnóstico. Perú [Internet]. Sep Oct 38(5). [citado 2017 Abr 29] Disponible en: <http://www.fihu-diagnostico.org.pe/revista/numeros/2000/setoct00/270-278.html>.
- MESSENGER LA, GILMAN RH, VERASTEGUI M, GALDOS-CARDENAS G, SANCHEZ G, VALENCIA E, et al. (2017) Working Group on Chagas disease in Bolivia and Peru. Towards improving early diagnosis of congenital Chagas disease in an endemic setting. *Clin Infect Dis.* Mar 25. doi: 10.1093/cid/cix277. [Epub ahead of print]
- NAVARRO P SAFAR ML. Félix Pifano: la historia viviente de medicina tropical. *Gac Méd Caracas* [Internet]. 2003 Abr [citado 2017 Abr 29] 111(2): 171-172. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0367-476220300200014&lng=es.
- NAVAS G. (2000). *Personaje Félix Pifano. Vitae.* Caracas [Internet] [citado 2017 Abr 29] Disponible en: <http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeDos/Personajes/Pifano/pifano1.htm>.
- NIEVES JE, STACK SM (2015) Colonel B.K. Ashford A Brief Military Medicine Historical Review. *Military Medicine* 180, 9:934-937.
- OLIVEIRA C. Louis Daniel Beuperthuy (2002). *Visionario de la medicina venezolana.* Disponible en: <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=83&n=3690>.
- PAUL R Y ELDER L. (2000) *Lectura crítica.* Eduteka. Fundación Pensamiento Crítico. [citado el 14 de mayo de 2017]. Disponible en: <http://www.eduteka.org/pdfdir/LecturaCritica.pdf>
- PIFANO F (1964). *Aspectos de Medicina Tropical: Temas de Cátedra.* Caracas, Organización de Bienestar Estudiantil. UCV.
- PLAZA IZQUIERDO F. (1996) *Doctores venezolanos de la Academia Nacional de Medicina: (datos biográficos)* Fundación Ed. Univ. p 303.
- QUAIL G. (2015) The debt Tropical Medicine owes to the Military. *Journal of Military and Veteran's Health.* 23(3):18-22.
- PORTER R (2003) *Breve historia de la medicina. De la antigüedad hasta nuestros días,* Editorial Taurus Madrid, España.
- SALGADO-LEVANO AC. (2007) *Investigación cualitativa: diseños, evaluación del rigor metodológico y retos.* *Libera-bit.* [citado el 14 de mayo de 2017]. *Revista de Psicología* 1371-1378. Disponible en: <http://4www.redalyc.org/articulo.oa?id=68601309>
- SUTTER P. (2000) "Arráncale los dientes al trópico": ambiente, enfermedad y el programa sanitario de Estados Unidos en Panamá, 1904-1914. *Papeles de Población.* 6(24): 60-93.
- WANDERA EA, MOHAMMAD S, OUKO JO, YATITCH J, TANIGUCHI K, ICHINOSE Y. (2017) Variation in rotavirus vaccine coverage by sub-counties in Kenya. *Trop Med Health.* 2017 Apr 24;45:9. doi: 10.1186/s41182-017-0051-z. eCollection. [Epub ahead of print].
- WELLCOME IMAGES. Wellcome Trust, United Kindom. Refer to Welcome blog post (archive). Disponible en: http://wellcomeimages.org/indexplus/obf_images/84/bd/47f4bdb34e342e0db9a5636acd23.jpg

La Cátedra de Microbiología en sus 125 años

María Eugenia Landaeta¹,
Zobeida Uzcategui²,
Sofía Mata Essayag³

¹ Universidad Central de Venezuela,
Facultad de Medicina, Escuela de Medicina
Luis Razetti, Cátedra de Microbiología
mariaeugencialandaeta1@gmail.com

² Universidad Central de Venezuela,
Facultad de Medicina, Escuela de Medicina
Luis Razetti, Cátedra de Microbiología
zobelop@yahoo.com

³ Universidad Central de Venezuela,
Facultad de Medicina, Escuela de Medicina
Luis Razetti, Cátedra de Microbiología
soma50@hotmail.com

RESUMEN

Se narra la historia de la Cátedra de Microbiología de la Escuela de Medicina Luis Razetti, desde su fundación en 1891 por el Dr. José Gregorio Hernández, hasta la actualidad. Incluye las semblanzas de los jefes que han tenido a su cargo la conducción de la Cátedra, algunos hitos importantes y personajes destacados que han formado parte de ella.

Palabras Clave: Cátedra de Microbiología; José Gregorio Hernández; Jefes de Cátedra; historia de la medicina; historia de la Universidad, historia de la microbiología

THE CHAIR OF MICROBIOLOGY IN ITS 125 YEARS

ABSTRACT

The history of the Microbiology Department at the Luis Razetti Medical School is narrated, since its foundation in 1891 by Dr. José Gregorio Hernández, until today. It includes the semblances of the Chiefs who have been in charge of the Chair, some important milestones and outstanding persons that have been part of it.

Keywords: Chair of Microbiology; José Gregorio Hernández; Chiefs of the Chair; history of medicine; history of the University

En 2016 la Cátedra de Microbiología de la Escuela de Medicina Luis Razetti de la Universidad Central de Venezuela cumplió 125 años de su fundación, por el Dr. José Gregorio Hernández.

El 16 de agosto de 1888, el Dr. Juan Pablo Rojas Paúl, Presidente de la República, dictó una resolución para la formación académica del Dr. Hernández y la posterior creación de los estudios en Venezuela.

El joven médico José Gregorio Hernández, con 25 años de edad y un año de graduado de médico, permaneció en París entre 1889 y 1891. Allí estudió Bacteriología con el Profesor Isidore Strauss, discípulo de Luis Pasteur. Además, estudió fisiología experimental, histología y embriología, hasta su regreso, en noviembre de 1891.

El 5 de noviembre de 1891 fue designado como catedrático para dictar estas asignaturas y el 6 del mismo mes se crea la Cátedra. Originalmente fue creada como Cátedra de Histología normal y patológica, Fisiología Experimental y Bacteriología, cuyo primer Jefe fue el Dr. José Gregorio Hernández, en sustitución de la Cátedra de Fisiología e Higiene, regentada por el Prof. David Lobo. Esto sucedió en el edificio que actualmente se denomina Palacio de las Academias, en la esquina de San Francisco, donde se encontraba la antigua Universidad Central de Venezuela. Esta Cátedra fue la primera de su clase en América.

Las lecciones orales se dictaban los días lunes y viernes, los martes y sábados las lecciones experimentales y los miércoles, las lecciones prácticas. En 1910 publica el texto *Lecciones de Bacteriología*, muy útil en los estudios de la asignatura. En 1912 el Ministerio de Instrucción Pública incorpora a la Cátedra la enseñanza de la parasitología.

El Dr. José Gregorio Hernández permaneció como Jefe de la Cátedra hasta el año de su muerte, en 1919. Cumplió 28 años de docencia. En 1972 la Sociedad Venezolana de Microbiología escoge el día 6 de noviembre como día del Microbiólogo, en homenaje a la fundación de la Cátedra de Bacteriología por el Dr. José Gregorio Hernández.

A partir de 1919 queda como jefe de la Cátedra, ahora llamada Bacteriología y Parasitología, el Dr. Jesús Rafael Rísquez, destacado médico microbiólogo, parasitólogo y anatomopatólogo, además de escritor. Graduado en 1904 de bachiller en filosofía, ingresa en la Universidad Central de Venezuela, donde obtuvo el título de Doctor en Ciencias Médicas en 1911. Ejerció su profesión en La Victoria (1912-1914), luego vino a Caracas, donde trabajó entre 1919 y 1920, hasta que se fue a París a cursar estudios de bacteriología, parasitología y anatomía patológica, materias a las que se dedicó por el resto de su vida.

Rísquez fue profesor de bacteriología y parasitología durante más de 30 años (1914-1947) en la Universidad Central de Venezuela. En la antigua Escuela de Medicina (durante la clausura del alma máter caraqueña), fue profesor de química biológica

(1915-1916) y de anatomía patológica (1916-1923) y al reabrirse la universidad, continuó regentando esta última cátedra desde 1925 hasta 1936.

Fue además Secretario de la Facultad de Medicina, Jefe del Laboratorio del Hospital Vargas (1922-1934), y director honorario en el Ministerio de Salubridad, Agricultura y Cría. Durante este tiempo fue también Senador de la República (1934), Secretario de la Sociedad Médica de Caracas (1916-1917) y Director fundador de los Archivos de Patología Tropical.

Escribió numerosos trabajos, tanto científicos como históricos, filosóficos y literarios, en periódicos y revistas. Fue iniciador o continuador de importantes trabajos de investigación, sobre todo con relación a la bilharziosis en su aspecto anatomopatológico, que complementaron los realizados por el doctor Víctor Raúl Soto, descubridor del huevo del parásito (*Schistosoma mansoni*) y precedieron a los de los doctores José Gregorio Hernández, Juan Iturbe y Eudoro González. Destacan también sus trabajos relativos a la espiroquetosis bronquial, la distomatosis humana, la meningitis cerebro-espinal (1935), cuyo germen productor no fue el meningococo clásico (de Weichselbaum), sino otro diplococo al que la Oficina Sanitaria Panamericana dio el nombre de *Neisseria venezuelensis* Del Corral-Rísquez, en su honor y en el de su colega Pedro del Corral. Sus *Lecciones de Bacteriología y Conferencias de Parasitología*, editadas, respectivamente, en 1932 y 1934, recogieron las notas de clase tomadas por sus alumnos. Ejerció la jefatura de la Cátedra, durante 24 años, hasta 1943.

Fue Individuo de Número de la Academia Nacional de Medicina y ocupó el Sillón XXIX de la misma (1925). También fue Individuo de Número de la Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales en donde ocupó el Sillón XIX (1933).

En 1947, al fallecer el Dr. Rísquez, se encarga de la Cátedra de Bacteriología y Parasitología el Dr. José Barnola, hasta 1958, momento en el cual se separa la Cátedra de Parasitología de la de Bacteriología. Queda como jefe de la Cátedra de Parasitología, y en la ahora Cátedra de Microbiología, el Dr. Leopoldo Briceño Iragorry.

El Dr. Barnola se gradúa de Bachiller en Filosofía y Letras en el Colegio San Ignacio de Caracas de los Padres Jesuitas, junto con Klindt, Caldera, Guzmán, Bruzual, Michelangeli, Camejo, Samkow, Perazo y Ruiz. Presenta ante la Universidad Central su tesis de grado titulada Transformismo.

Ingresa en la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela y a la par de sus estudios se desempeña como técnico de laboratorio bajo la tutela de Jesús Rafael Rísquez, Pedro del Corral y Elías Benarroch. Se gradúa de Doctor en Ciencias Médicas en 1938, para lo cual presenta la tesis titulada: La reacción de Takata Ara en la bilharziosis.

Durante sus estudios, en 1936, fue nombrado instructor por concurso en la Cátedra de Bacteriología y Parasitología del Profesor Rísquez en la Universidad Central y en 1937 se inscribió en el primer curso de Malariología, en donde sus profesores fueron Alberto J. Ferrer, Arnoldo Gabaldón, Pablo Anduze y Pablo Cova García; en esa época es técnico fundador del laboratorio del Hospital Carlos J. Bello de la Cruz Roja Venezolana. En 1938 se une al personal médico del Ejército Venezolano con el grado de Capitán y es nombrado Jefe del Laboratorio del Hospital Militar y Naval Antonio José de Sucre en Caracas, cargo que ocupó hasta la desaparición del Hospital en aras del progreso de la ciudad y se fundó el Hospital Militar Dr. Carlos Arvelo, en donde ocupó el mismo cargo hasta cumplir sus 30 años de servicio en las Fuerzas Armadas.

En 1947, por el fallecimiento del Dr. Jesús Rafael Rísquez, se encarga de la Cátedra de Bacteriología y Parasitología de la Universidad Central. En 1958 se hace Profesor Titular y regenta la Cátedra de Parasitología, cuando se separan las dos disciplinas, hasta el año de su jubilación, 1970.

Fue encargado del Decanato en varias oportunidades y miembro del Consejo de Facultad por elección del Claustro Universitario y su colaboración en cursos universitarios de posgrado en pediatría, hematología, microbiología y medicina tropical fueron de gran interés.

José Barnola fue Miembro Correspondiente Nacional de la Academia de Medicina desde 1954, Jefe

del laboratorio de la Maternidad Concepción Palacios y del laboratorio del Hospital de Niños J.M. de los Ríos.

Leopoldo Briceño Iragorry. Inició sus estudios de medicina en la UCV, entre 1925 y 1928, continuándolos en la Universidad de París, donde obtuvo el título de Médico Colonial y Médico Malariólogo, en 1931, y Doctor en Medicina en 1932. Por reválida, obtiene el título de Doctor en Ciencias Médicas en la UCV en 1932. Realizó cursos de postgrado en Parasitología y Malariología, así como en Bacteriología en el Instituto Pasteur de París.

Desde ese entonces, en 1953 se le nombró Jefe de Trabajos Prácticos de Bacteriología, en la Cátedra de Bacteriología y Parasitología de la Facultad de Medicina. Desde 1958 hasta 1977 sucedió a su maestro, Jesús Rafael Rísquez como Profesor Titular y Jefe de la Cátedra. También se desempeñó como jefe del Departamento de Microbiología, Parasitología y Medicina Tropical.

En 1933 comenzó su práctica profesional en el Servicio de Clínica Médica del Hospital Vargas pasando después, en 1935, al Servicio de Dermatología y Sifilografía de este mismo instituto, hasta 1943. Así mismo, se desempeñó como dermatólogo en la Cruz Roja Venezolana y en la Casa Municipal de Beneficencia. Entre 1930 y 1949 ejerció privadamente la profesión en los campos de la dermatología y el laboratorio.

En el Ministerio de Sanidad y Asistencia Social trabajó como médico epidemiólogo de 1936 a 1939 y luego pasó a los Laboratorios de Bacteriología y Parasitología del Instituto Nacional de Higiene, hasta 1946. Este último año fue nombrado Jefe de la División de Laboratorios del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social cargo en el cual permaneció hasta 1972.

Su vida científica fue muy fructífera, en la cual se cuentan 56 trabajos de bacteriología, 12 de micología, 35 de parasitología, 15 de medicina general y más de 50 discursos, conferencias, artículos y libros de texto. Fue Individuo de Número de la Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales, habiéndosele asignado el Sillón XIX.

El Dr. Alberto Pardi, se gradúa de Médico Cirujano en la ciudad de Pisa, Italia, presentando como tesis de

grado el trabajo "Tratamiento del chancro blando con sulfamídicos". Ingresa en el Instituto de Higiene de la Universidad de Florencia, y allí permanece cinco años y publica 24 trabajos sobre Microbiología Aplicada a la Salud Pública, entre los cuales resaltan los que se refieren al aislamiento, por primera vez en Italia, del virus de la influenza y un extenso trabajo sobre la sensibilidad a las sulfas de los anaerobios de la gangrena gaseosa. Al mismo tiempo se especializa en Salud Pública en la Universidad de Bolonia.

Regresa a Venezuela en 1946 y revalida su título. En 1947 inicia su carrera de docente en la Cátedra de Microbiología y Parasitología de la Universidad Central de Venezuela. A la vez ingresa en la División de Laboratorios del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, en la cual funda la Sección de "Bacteriología de Agua, Leche y Alimentos" y la de "Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis".

Luego de ascender a Profesor Asociado y después a Titular en 1977, es nombrado Jefe de la Cátedra de Microbiología, sucediendo al Dr. Leopoldo Briceño Iragorry, hasta el año de su jubilación, 1983. Como profesor, las lecciones sobre los temas de su preferencia: corinebacterias, enterobacterias, bruce-
las, micobacterias y rabia fueron guía, tanto para estudiantes de pregrado como de postgrado. En 1973 es designado Médico Jefe del Departamento de Laboratorios del Ministerio de Sanidad. Aún cuando la labor administrativa lo absorbe, nunca se aleja de su gran pasión, la microbiología.

El Dr. Pardi fue miembro fundador de la Sociedad Venezolana de Microbiología y, como baluarte de la misma, fue condecorado con la Orden "Andrés Bello" en su segunda clase, durante la realización del IV Congreso Venezolano de Microbiología.

A partir de 1983 y hasta 1991, la Cátedra fue dirigida por la Dra. María Josefina Núñez Cortés. La Dra. Núñez se graduó de Médico Cirujano en 1959. Entre 1961 y 1963, realizó el postgrado de Medicina Interna en el Servicio de Medicina III del Hospital Universitario de Caracas, dirigido por el Dr. Augusto León. Se trasladó a los Estados Unidos para realizar el Postgrado de Enfermedades Infecciosas en el New

England Medical Center, Universidad de Tufts, entre 1968 y 1970. Fue alumna del Dr. Louis Weinstein, padre de la Infectología mundial. Durante estos tres años hizo un curso de Microbiología en el Departamento de Microbiología del Instituto Tecnológico de Massachusetts, con el profesor y Premio Nobel Salvador Luria. También realizó pasantía en el Laboratorio de Micobacterias del Hospital Hammersmith de Londres, con el profesor Mitchitson.

De 1971 a 1976 fue coordinadora docente del Postgrado de Medicina Interna del Hospital Universitario de Caracas (UCV). Desde 1981, y durante tres períodos consecutivos, se desempeñó como Jefe por concurso del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Adulto y Directora del Postgrado de Infectología del Hospital Universitario de Caracas.

De 1983 a 1991 fue Jefe de la Cátedra de Microbiología de la Escuela de Medicina Luis Razetti, a la cual ya pertenecía desde 1975.

María Josefina Núñez es el primer infectólogo con formación de postgrado que aparece en el escenario médico venezolano. En 1985, en el Hospital Universitario de Caracas, transformó la residencia programada de Infectología que existía desde 1976, en el primer curso de posgrado universitario de la especialidad. Fue también la fundadora del Curso de Microbiología General y del Laboratorio correspondiente de la Universidad Simón Bolívar, a los que se dedicó durante tres años consecutivos.

En 1991 se conmemoró el Centenario de la creación de la primera Cátedra de Microbiología en Venezuela, por el Dr. José Gregorio Hernández, momento en el que la Dra. Núñez ejercía la jefatura de la misma. A tal efecto, coordinó una comisión de trabajo que culminó con la realización de diversos eventos científicos y académicos y la publicación del libro "**Microbiología Médica**", en dos tomos, producto de la colaboración de varios profesores e investigadores y editado por ella, al lado de María Josefina Gómez y Oswaldo Carmona. Esta obra cristaliza gracias al apoyo obtenido por el Rectorado de la Universidad Central de Venezuela.

Durante este tiempo, le corresponde a la Cátedra asumir el cambio de régimen semestral a anual en la

Facultad de Medicina, que había comenzado en 1989. Para el inicio de este régimen de colisión semestral/anual, fueron contratadas las Dras. Zobeida Uzcátegui y María Eugenia Taibo, quienes iniciaron funciones el 1 de octubre de 1990, bajo la jefatura de la Dra. Núñez. En las mañanas se dictaba el régimen anual y en las tardes, el semestral.

El siguiente año ingresa la Biol. Sofía Toro, ya bajo el mando de la Dra. Argelia Medina de Atilano, quien se encarga personalmente de los estudiantes del régimen semestral. La Dra. Atilano realizó sus estudios de Microbiología en la División de Laboratorios del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, culminando en 1967. Ingresó a la Cátedra en 1968, y luego al Instituto de Medicina Tropical en 1969, encargándose de la Sección de Medios de Cultivo y Esterilización y posteriormente de la Sección de Microbiología, en donde comienza a prestar servicio asistencial. En este año renunció al Laboratorio de Aguas del Instituto Nacional de Obras Sanitarias (INOS), en el cual se desempeñó como Microbiólogo II. Entre 1983 y 1985 solicitó una excedencia activa con el fin de ejercer el cargo de Jefe de la División de Diagnóstico e Investigación del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Es designada jefe de la Cátedra en septiembre de 1991, permaneciendo en este cargo hasta septiembre de 1993.

De 1993 a 1999, la Dra. Tibaire Montes asumió la jefatura de la Cátedra. Realizó sus estudios de medicina desde 1960, cuando ingresa a la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes y se gradúa de Médico Cirujano el 26 de noviembre de 1966. En mayo de 1973 se muda a Caracas. En enero de 1974 ingresa a la División de Laboratorios del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, cuyo Director, el Dr. Henry Fossaert, había implementado un programa de entrenamiento en técnicas de diagnóstico bacteriológico para médicos; allí permanece hasta septiembre de 1975 cuando ingresa al postgrado de Microbiología Médica, coordinado por el insigne Maestro Rafael Darricarrere en el Instituto Nacional de Dermatología, actualmente Instituto de Biomedicina de la UCV. Durante la pasantía de virología realizada en el Instituto Venezolano de Inves-

tigaciones Científicas (IVIC) y dirigida por el doctor José Esparza, siente gran atracción por los virus. Finaliza el postgrado en agosto de 1977 y en septiembre ingresa a la Cátedra de Microbiología de la Escuela de Medicina "Luis Razetti" de la UCV.

En 1988 conoce a la doctora Berta Viera de Torres, médica viróloga, profesora de virología de la Escuela de Bioanálisis, quien la entusiasma a realizar un entrenamiento en técnicas de aislamiento y diagnóstico viral en el Instituto Nacional de Higiene; la doctora Rosalba Salas, Jefe de la Sección de Aislamiento Viral, le sugiere realizar un trabajo sobre virus respiratorios; allí permanece por espacio de dos años.

En septiembre de 1991 viaja al Instituto "Pedro Kourí" de La Habana, Cuba, donde realiza un entrenamiento de diagnóstico de *arbovirus*. Entre septiembre de 1999 y octubre de 2000, luego de dejar la jefatura de la Cátedra, realiza una Maestría en Virología en este mismo Instituto. Tibaire Montes fue Jefe de la Cátedra de Microbiología durante tres períodos y posteriormente fue Jefe del Departamento de Microbiología, Parasitología y Medicina Tropical. Escribió tres capítulos sobre generalidades de virus, virus respiratorios y diagnóstico viral en el libro "Microbiología Médica", editado por los doctores María Josefina Núñez, María Josefina Gómez y Oswaldo Carmona con motivo de cumplir cien años de fundada la Cátedra de Microbiología.

Ingresa a la Sociedad Venezolana de Microbiología en el año de 1978 como miembro asociado y asciende a miembro titular en 1988. Se desempeñó como Presidenta, Vice-presidenta, Secretaria General y Secretaria de Actas de la Junta Directiva del Capítulo Metropolitano. Fue Presidenta, Secretaria General y Secretaria de Actas de la Junta Directiva Nacional.

En el año 1997 el doctor Alejandro Divo le solicita al doctor Oswaldo Carmona la revisión y actualización de la quinta edición de su libro "Microbiología Médica"; el doctor Carmona le encomienda a Tibaire Montes la revisión y actualización de la parte correspondiente a los virus.

Durante la jefatura de Cátedra de la profesora Tibiare Montes, le correspondió a la profesora Zobeida

Uzcátegui, para entonces coordinadora docente, realizar cambios en el programa de la asignatura Microbiología. La profesora Uzcátegui, implementó la introducción de casos clínicos hipotéticos tanto en las clases teóricas como las actividades prácticas y en algunos temas se comienzan a discutir en forma de síndromes, por ejemplo, en el tema de diarreas, enfermedades de transmisión sexual; es decir, se actualizó el diseño instruccional de la asignatura, con una serie de estrategias instruccionales adaptadas al cambio curricular acorde al movimiento mundial. Este diseño instruccional actualmente continúa vigente.

A partir del año 1999, la Dra. Sofía Mata Essayag asume la jefatura de la Cátedra. Es médico cirujano, egresada de la Escuela José María Vargas de la UCV en 1975, habiendo realizado, aparte de su formación académica, pasantías en el Laboratorio Central del Hospital Vargas de Caracas y en el Instituto de Medicina Tropical, así como preparaduría en la Cátedra de Parasitología de la Escuela Vargas. En 1978 ingresa al Instituto de Medicina Tropical de la Facultad de Medicina, donde el Dr. Félix Pifano le organiza un programa de 3 años, que culmina con una pasantía de un año, en 1980, en el Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, Brasil. A su regreso, ingresa a la Cátedra de Microbiología de la Escuela Luis Razetti, se adscribe a la Sección de Micología Médica del Instituto; en ambos realiza labores de docencia, asistencia e investigación. En 1991 viaja a Manchester, Reino Unido, donde realiza estudios de maestría y doctorado en Micología Médica. Regresa en 1996, a continuar con sus labores académicas. En 1999, asume temporalmente la jefatura de la Cátedra, hasta 2001. Posteriormente permanece como jefe de la Sección de Micología Médica, hasta 2003, cuando nuevamente asume la jefatura de la Cátedra. Desempeña ambas funciones durante 5 años. A partir de 2008 deja de ser jefe de la Cátedra y se queda como jefe de la Sección de Micología, hasta la actualidad. La Prof. Sofía Mata Essayag cuenta con más de 100 publicaciones en revistas de prestigio a nivel nacional e internacional, en el área de la Micología Médica, principalmente en el campo de la epidemiología, clínica,

diagnóstico y tratamiento de las micosis profundas endémicas en Venezuela. Así mismo, es autora de varios capítulos de libros de texto a nivel nacional e internacional. Fue miembro fundador de la Sociedad Venezolana de Infectología, en 1985.

Durante el período 2001 a 2003, ejerció funciones de jefe de la Cátedra la Prof. María Josefina Gómez, quien obtuvo su título de Licenciada en Biología en la Facultad de Ciencias de la UCV en 1970. Fue preparadora (1970-71) y luego Biólogo investigador (1972-1973) de la Facultad de Ingeniería de la UCV, Microbiólogo del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” (INHRR) (1973-1987), profesora de Biología del Liceo Fermín Toro (1973), y jefe encargado del Departamento de Bacteriología del INHRR (1975, 1977).

María Gómez realizó múltiples cursos en Venezuela y en los Estados Unidos para perfeccionar sus conocimientos de Microbiología. Mención especial merecen los estudios realizados en el Centro de Control de Enfermedades (CDC) en Atlanta, Georgia, EEUU, donde se entrenó en la identificación de bacterias anaeróbicas y clamidias. Así mismo, se entrenó en técnicas de diagnóstico bacteriológico en el Hospital Emory de Atlanta.

En 1981 ingresó como instructor por concurso a la Cátedra de Microbiología de la Escuela de Medicina “Luis Razetti” de la Facultad de Medicina de la UCV. También se desempeñó como jefe de la Sección de Bacteriología del Instituto de Medicina Tropical de la UCV, cargo que ocupó desde 1992 hasta 2007. María Gómez realizó muchas publicaciones, en revistas de reconocido prestigio, relacionadas con la identificación de micobacterias, bacilos gramnegativos, corinebacterias, enterococos, neumococos y otros estreptococos. En el año 2001 ganó por concurso la jefatura de dicha Cátedra, la cual ejerció hasta 2003. Se jubiló de la UCV en el año 2005.

Ha ejercido varios cargos en la Junta Directiva de la SVM. Desde 1986 ha hecho posible el crecimiento de la calidad científica de la Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Ha formado parte de la comisión editorial durante muchos años y sigue aportando su entusiasmo y conocimiento en la

edición de la revista hasta la presente fecha.

Después del segundo período de la Prof. Sofía Mata Essayag, queda a cargo de la Cátedra María Eugenia Landaeta, desde 2008 hasta la actualidad. Graduada de Médico Cirujano en 1988 y de Infectólogo en 1993 en la UCV, realizó Maestría en Microbiología Médica en la Universidad de Liverpool, Reino Unido, entre 2001 y 2002. Ingresó a la Cátedra de Microbiología en 1994 y al Servicio de Infectología del Hospital Universitario de Caracas en 1996, actualmente ejerciendo la jefatura del mismo y la Dirección del Postgrado. Ha ocupado diferentes cargos en la Sociedad Venezolana de Infectología, entre ellos Presidente, Secretaria General, Tesorera, Secretaria de Actas, Coordinadora y luego Asesora de la Comisión Científica. Le ha correspondido organizar, con la colaboración de los demás miembros, los aniversarios 120 y 125 de la Cátedra, con realización de la Santa Misa, Acto Académico y brindis. También ha sido coordinadora de la edición de la nueva versión del libro *Microbiología Médica*, en 2010, iniciado en la jefatura de la Dra. Sofía Mata Essayag, fruto del trabajo de los profesores de la Cátedra y algunos invitados expertos en los diferentes temas, así como la publicación de las diferentes ediciones de la Guía de Trabajos Prácticos de Microbiología.

Otras personas que han sido miembros destacados de la Cátedra

En 1953, Mildred Feo se integra al Instituto de Medicina Tropical. Viene formada de la Western Reserve University, Cleveland, en donde adquiere el título de Medical Technologist. En 1951 inicia su labor de investigación en hongos patógenos del hombre en el hospital J.M. de los Ríos, bajo la dirección del Dr. Leandro Potenza, entre los trabajos que realiza el más notable es el que identifica por primera vez en Venezuela *Cryptococcus neoformans*. Entre sus aportes más importantes se encuentra la creación del medio de cultivo Bilis Agar Feo, para la identificación de clamidoconidias en levaduras del género *Cándida*. Se encarga de la Sección de Micología Médica del IMT hasta la llegada del Dr. Borelli.

Dante Borelli, dermatólogo y micólogo nacido en Parma, Italia en 1920 y naturalizado venezolano en 1951, tiene el mérito de haber fundado la Sección de Micología Médica del IMT en 1961, y de ser el investigador que ha descrito el mayor número de hongos patógenos en la historia de la Micología Médica. Fue un gran investigador en este campo y pionero en la formación de micólogos en el país.

Carmen Marcano, destacada micóloga, quien se desempeñó como jefe de la Sección de Micología hasta su jubilación, desde 1981 hasta 2001. Los doctores Domingo López Parra y Fanny Pérez de Rodríguez, esta última es la docente a quien debemos la organización de los aspectos curriculares de la Cátedra, también se desempeñó como Coordinadora de Curriculum de la Escuela Luis Razetti. Los licenciados Jóvita Urbáez, Cristina Ugueto, Lourdes Rondón y Gonzalo Castro, así como posteriormente Flor Muñoz, Cohinta Hernández y Felipe Zamora, quienes han sido los bioanalistas que se han encargado de la preparación de los trabajos prácticos de los estudiantes, todos ellos excelentes docentes y con una gran mística de trabajo. Los doctores Ana María Cáceres, Libia Henao, Celina Pérez, Ernesto Alayo y Orlando Jiménez, médicos infectólogos quienes ejercieron funciones docentes, entre otros personajes que escapan a nuestra memoria. Entre los auxiliares de laboratorio se destacan Morelys Villarroel y Gladis Aguilera. Todos ellos dieron grandes aportes a la Cátedra durante el tiempo que permanecieron en ella. Nuestro eterno agradecimiento.

En la actualidad, trabajan en la Cátedra la Dra. Zobeida Uzcátegui, quien ejerce el rol de Jefe del Departamento de Microbiología, Parasitología y Medicina Tropical, Luzalba Nweihed, actual Coordinadora Docente, los profesores Etna Velásquez, Eduardo Bastidas, Martín Carballo y Jocays Caldera y las licenciadas Giorgina Mendoza, Iraní Pérez y Andreina Duarte. Todos ellos, siguiendo el ejemplo de sus predecesores, realizan una invaluable labor en la formación del médico venezolano. Otros personajes que han colaborado en la docencia, por ser adscritos a la Cátedra, fueron Edgar Jaimes, virólogo y Susana González, actual Jefe de la

Sección de Bacteriología del IMT.

No menos importante es mencionar el personal administrativo que labora en esta Cátedra, quienes cumplen un papel preponderante en el cabal funcionamiento cotidiano, como son la Sra. Yolanda García, el Sr. Pablo Rodríguez y el Sr. Samuel Rangel. Son ellos quienes, tras bastidores, realizan un trabajo

invaluable.

Durante el tiempo en que ha funcionado la Cátedra, se ha mantenido intacto el nivel académico en la enseñanza de la Microbiología, el cual ha pasado de generación en generación sin mermar la calidad y mística que han tenido todos los personajes que nos han precedido.



Figura 1

Jefes de la Cátedra de Microbiología: José Gregorio Hernández, Jesús Rafael Rísquez, Leopoldo Briceño Iragorry, Alberto Pardi, María Josefina Núñez, Tibaire Montes, María Gómez, Sofía Mata Essayag, María Eugenia Landaeta



Figura 2

La Cátedra de Microbiología en 1972: Sentados: Mildred de Feo, Alberto Pardi, Leopoldo Briceño Iragorry, Dante Borelli, Carmen Marcano. De pie: Lourdes Rondón, Argelia de Atilano, Margot Miani, Gonzalo Castro, Fanny Pérez de Rodríguez, Anagela Gallurralde, Domingo López Parra, Cristina Ugueto, Jóvita de Urbáez



Figura 3

La Cátedra de Microbiología en la actualidad: Jocays Caldera, Martin Carballo, Giorgina Mendoza, Luzalba Nweihed, Sofía Mata Essayag, Yolanda García, María Eugenia Landaeta, Andreína Duarte, Morelys Villarroel, Zobeida Uzcategui, Eduardo Bastidas, Pablo Rodríguez, Orlando Jiménez, Etna Velásquez



Figura 4

La Cátedra de Microbiología en la celebración de sus 120 años (2011): Carmen Marciano, Felipe Zamora, Giorgina Mendoza, Etna Velásquez, Luzalba Nweihed, María Gómez, Jocays Caldera, Argelia Atilano, Zobeida Uzcategui, Tibaire Montes, Sofía Mata, Libia Henao, María J. Núñez, Domingo López Parra, Flor Muñoz, Martin Carballo, María Eugenia Landaeta

REFERENCIAS CONSULTADAS

Archivos de la Cátedra de Microbiología. Escuela de Medicina Luis Razetti, Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

CARMONA O, NOVOA D. (2005). "Cazadores de microbios en Venezuela" 1ª Edición. Editorial AFF, CA. Caracas

FRANCISCO J, RAMOS C. "Ciencia, renovación y docencia: De Vargas a Razetti 1853 – 1911" En: "PAPA R, GODOY R. (2007). "Facultad Médica de Caracas (1827 – 2007). Caminos de Historia". 1ª Edición. Producciones Prevea CA. Caracas

NAVAS BLANCO A. (2002). "Reseña histórica de las sedes de la Universidad Central de Venezuela 1721 – 2001". Universidad Central de Venezuela – Vicerrectorado Académico

Páginas web: Venezuela tuya

Testimonios de miembros antiguos y actuales de la Cátedra de Microbiología

Recuento histórico del Departamento de Microbiología, Parasitología y Medicina Tropical.

Zobeida Uzcátegui¹
Sofía Mata Essayag²

¹ Departamento de Microbiología,
Parasitología y Medicina Tropical.
Escuela de Medicina "Luis Razetti".
Facultad de Medicina, UCV.
zobelop@yahoo.com

² Sección de Micología.
Instituto de Medicina Tropical "Félix Pifano".
Facultad de Medicina, UCV.
soma50@hotmail.com

RESUMEN

El Departamento de Microbiología, Parasitología y Medicina Tropical (DMPMT) se creó en el año de 1958, estando siempre su sede en el Instituto de Medicina Tropical (IMT) e integrado por tres cátedras: Cátedra de Microbiología, Cátedra de Parasitología y Cátedra de Medicina Tropical. Le correspondió al Dr. Félix Pifano, ser el primer jefe del Departamento, quien permaneció en su conducción durante 10 años. Seguido luego, en orden cronológico, por los doctores Leopoldo Briceño Iragorry, Jesús Romero, Teudis Cardozo, Alejandro Mondolfi y consecutivamente, por las doctoras Belkisyolé Alarcón de Noya, Olinda Delgado, Tibaire Montes, Salha Abdul-Hadi, Nathalie Chacón y actualmente por la doctora Zobeida Uzcátegui. De cada uno de ellos, se hace una pequeña semblanza durante la trayectoria de su jefatura y un resumen de sus logros académicos y administrativos. El nombre del Departamento ha variado a través del tiempo. Entre sus funciones destacan coordinar las actividades docentes, asistenciales, de extensión e investigación del personal docente y administrativo adscrito, velar por el funcionamiento administrativo del mismo e impulsar el desarrollo de cada una de sus cátedras.

Palabras Clave: Departamento; DMPMT; Cátedra; Microbiología; Parasitología; Medicina Tropical; IMT; Pifano; Medicina tropical UCV; Departamento de Microbiología

HISTORICAL RECORD OF THE DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY, PARASITOLOGY AND TROPICAL MEDICINE

ABSTRACT

The Department of Microbiology, Parasitology and Tropical Medicine (DMPMT) was created in the year 1958, always being based in the Institute of Tropical Medicine (IMT) and composed of three chairs: Microbiology, Parasitology and Tropical Medicine. The first head of the Department was Dr. Felix Pifano, who remained in his leadership for 10 years. Then followed, in chronological order, by doctors Leopoldo Briceño Iragorry, Jesus Romero, Teudis Cardozo, Alejandro Mondolfi and consecutively, by the doctors Belkisyolé Alarcón de Noya, Olinda Delgado, Tibaire Montes, Salha Abdul-Hadi, Nathalie Chacon and currently by Dr. Zobeida Uzcátegui. From each of them, a small semblance is made during the trajectory of their leadership and a summary of their academic and administrative achievements. The name of the Department has varied over

time. Among its functions, it is important to coordinate the teaching, assistance, extension and research activities of the assigned teaching and administrative staff, to ensure the administrative functioning and to promote the development of each of its chairs.

Keywords: Department; DMPMT; Chair; Microbiology; Parasitology; Tropical Medicine; IMT; Pifano.

INTRODUCCIÓN

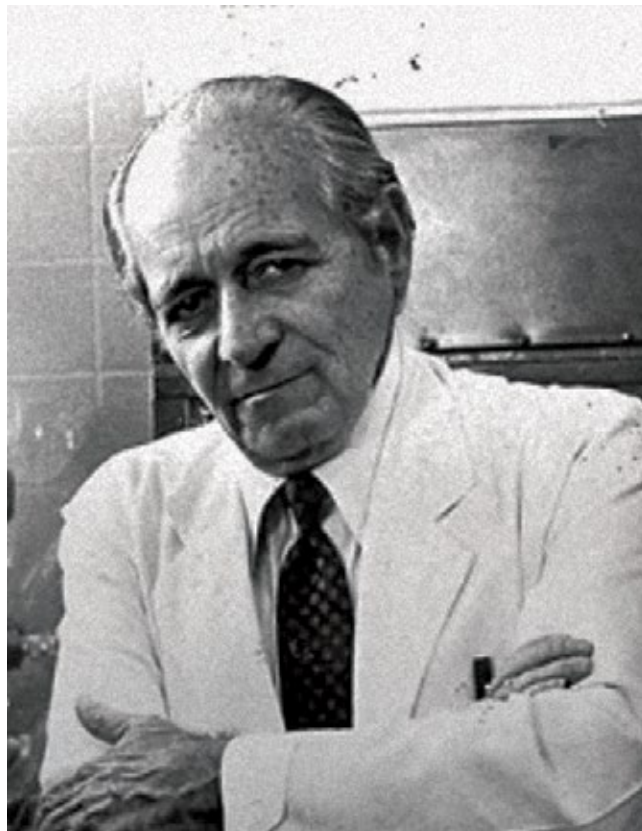
En 1941 el Dr. Félix Pifano Capdevielle, concursó a la Cátedra de Medicina Tropical de la Escuela de Medicina de la Universidad Central de Venezuela (UCV); en ese momento, el Dr. Pifano ya tiene la idea de fundar un instituto dedicado al estudio de enfermedades tropicales en Venezuela.

Desafortunadamente, las actividades de investigación no tenían prioridad en la universidad y no existía la estructura física ni los recursos humanos para realizar investigación, ni docencia. En 1942 bajo la presidencia de Isaías Medina Angarita, comenzaron los estudios del proyecto de construcción de la UCV en los terrenos de la Hacienda Ibarra, que sería el sitio ideal para conectar al nuevo centro geográfico de la ciudad alrededor de la Plaza Venezuela. Es así, que en octubre de 1943, se decreta la creación del Instituto Autónomo de la Ciudad Universitaria, el cual tendría la finalidad de llevar a cabo las obras que integrarían el nuevo campus universitario. Le asignan la tarea al Maestro Carlos Raúl Villanueva.

El Dr. Pifano, después de múltiples intentos para la creación del Instituto de Medicina Tropical (IMT), logra en 1945 que la Junta Revolucionaria de Gobierno, decretara la creación de dicho Instituto de acuerdo a lo reglamentado por la Ley de Educación de 1940, la cual propone que la Escuela de Medicina, debía de estar integrada por dos agrupaciones y tres institutos, uno de los cuales sería el Instituto de Medicina Tropical, llamado para ese entonces Instituto de Medicina Tropical, Microbiología e Higiene.

Es así como, el 14 de octubre de 1947 fue creado por decreto del Consejo Universitario, presidido por el Rector Dr. Santiago E. Vera, el Instituto de Medicina Tropical designándose al Dr. Félix Pifano, como director del mismo. El IMT no tenía local propio y comenzó a funcionar en un pequeño espacio del Ministerio de

Educación en Palo Grande, antigua sede del Liceo Andrés Bello, que compartía con el Instituto de Medicina Experimental.



Profesor Felix Pifano Capdevielle
(1912-2003)

El siguiente paso consistió, en la construcción del edificio del Instituto dentro de la Ciudad Universitaria, la cual se inauguró parcialmente el 2 de marzo de 1954 durante el régimen del General Marcos Pérez Jiménez y es considerada una de las grandes creaciones de la arquitectura mundial del siglo XX. En el año 2000 fue nombrada Patrimonio de la Humanidad por la Unesco, convirtiéndose en el primer campus universitario en América Latina en recibir este honor. Una vez terminada la infraestructura del Instituto de Medicina Tropical en el año de 1956, este abrió sus puertas como un centro de investigación y enseñanza sobre bioclimatología, fisiografía, microbiología clínica, diagnóstico, profilaxis y tratamiento de las enfermedades tropicales. El Dr. Félix Pifano, se encarga en la conducción del Instituto como director.

Con relación a la enseñanza, se creó en el año de 1958 el Departamento de Microbiología, Parasitología

y Medicina Tropical, integrado por las tres cátedras existentes para el momento: Cátedra de Microbiología, Cátedra de Parasitología y Cátedra de Medicina Tropical. Cuya función era coordinar las actividades docentes y de investigación e impulsar el desarrollo de cada una de las disciplinas antes mencionadas.

Le incumbió al **Dr. Félix Pifano Capdevielle**, ser el primer jefe del Departamento, en el cual permaneció en un lapso comprendido entre 1958 y 1968. Actividad que compartió con la jefatura de la Cátedra de Medicina Tropical y la dirección del IMT. Fue un ilustre venezolano yaracuyano, de brillante trayectoria en la investigación científica y en la docencia de las enfermedades tropicales endémicas del país; con la habilidad excepcional de tocar al piano los viejos vales venezolanos. Sus investigaciones se inclinaron hacia el análisis ecológico, epidemiológico y clínico de las patologías tropicales dando innumerables aportes a la Medicina Tropical, con más de 200 trabajos científicos publicados acerca de estas enfermedades. Trabajó con el Dr. Arnoldo Gabaldón en malaria. Siempre compaginó sus actividades docentes con la de investigación sobre enfermedad de Chagas, leishmaniasis, esquistosomiasis, oncocercosis, micosis sistémicas, animales ponzoñosos, entre otras. Como docente formó más de 16.500 estudiantes, siendo epónimo de muchas promociones. Fue Decano de la Facultad de Medicina entre 1944 y 1946. Perteneció como Miembro, a varias Sociedades Médicas nacionales e internacionales y fue Individuo de Número en varias Academias nacionales. Digno merecedor de un sin fin de reconocimientos nacionales e internacionales. Dirigió el IMT, desde 1947 hasta 1990. Todos los logros antes mencionados lo acreditan para homenajearlo, colocando su nombre al Instituto de Medicina Tropical.

Al revisar la documentación presente en los archivos del Departamento encontramos, que el nombre del mismo ha variado a través del tiempo. En 1958, se denomina Departamento de Tropical, posteriormente cambia a Departamento de Medicina Tropical, después a Departamento de Tropical, Parasitología y Microbiología y por último Departamento de Parasi-

tología, Microbiología y Medicina Tropical. Desde el año 1990, comienza a ser posicionado como “Departamento de Microbiología, Parasitología y Medicina Tropical” (DMPMT). Consolidándose este nombre con la creación de un logo, durante la jefatura de la Profesora Nathalie Chacón, en el período 2008-2010.



Dr. José Barnola Duxans

A partir de 1960, la Facultad de Medicina crea una nueva escuela de medicina denominada “José María Vargas”, que funcionaría en las inmediaciones del Hospital Vargas en San José. A partir de este momento, existen dos escuelas de medicina, la anteriormente mencionada y la escuela de medicina “Luis Razetti”. Siendo el Dr. Pifano el jefe del Departamento y de la Cátedra de Medicina Tropical, acompañado por los doctores **Leopoldo Briceño Iragorry** y **José Barnola Duxans**, como jefes de las cátedras de Microbiología y Parasitología respectivamente de la escuela de medicina “Luis Razetti”. Sin embargo, el Dr. Pifano se encargó por muchos años, de impartir las clases de medicina tropical para ambas escuelas.

Después que el Dr. Pifano finaliza su periodo como jefe del Departamento el 06 de noviembre de 1968, le corresponde el comprometido quehacer al Dr. Leopoldo Briceño Iragorry. A partir de mayo de 1969, se

nombran anualmente a los jefes de cátedras y departamentos, de acuerdo a la atribución 5ª del artículo 25 de la Ley de Universidades y Facultades; y que le confiere el artículo 24 del Reglamento de Cátedras y Departamentos.



El **Dr. Leopoldo Briceño Iragorry** ejerce conjuntamente su función de jefe del Departamento con la jefatura de la Cátedra de Microbiología. Realizó sus estudios de medicina en Caracas (1925-1928) en la Universidad Central de Venezuela, pero al cerrarse esta, por revueltas estudiantiles, se trasladó a Europa terminando su carrera en la Universidad de París en 1930. Realizó estudios de post-grado en París (1930-1932) en donde recibe los títulos de “Médico Colonial” “Médico Malariólogo” y doctor en Medicina de la Universidad de París. Prestó sus servicios en el Instituto Pasteur en el campo de la bacteriología y trabajó en el laboratorio de parasitología del profesor Brumpt. Revalidó su Título en la Universidad Central de Venezuela en 1932. Este insigne profesor trujillano fue microbiólogo, dermatólogo, sanitarista e investigador. Cumplió a cabalidad todas sus responsabilidades como lo demuestran los múltiples trabajos realizados en el campo de la microbiología sobre salmonelas, shigelas y otros agentes de gastroenteritis, sobre

brucelosis y tifus exantemático murino, sus estudios sobre esporotricosis y blastomicosis y, en el campo de la Parasitología, sus publicaciones sobre flebotomos, simúlidos y culicoides, con descripción de nuevas especies. En su labor académica siempre fue admirado por el profundo conocimiento de la microbiología debido al constante anhelo de mantenerse actualizado, la facilidad de exposición de una manera clara, amena y fascinante; además, por su estricto cumplimiento de sus deberes en la Cátedra de Microbiología y en el DMPMT. Muchas promociones médicas disfrutaron de su enseñanza, a tal punto que lo hacen merecedor del nombre de la Promoción de Médicos del año 1958.

Fue Individuo de Número y directivo de la Academia de Nacional de Medicina y de la Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales y perteneció a numerosas sociedades científicas nacionales e internacionales. Además, fue miembro fundador de la Sociedad Venezolana de Microbiología, siendo presidente de la misma para 1957. Así como, asesor de la Organización Mundial de la Salud. Mantuvo siempre el contacto con el Instituto Pasteur de París, el CDC de Atlanta y otras Instituciones extranjeras. Su obra en el campo de la investigación científica fue muy vasta en las áreas de la microbiología, parasitología, medicina tropical, micología y dermatología. Discípulos lo recuerdan por la solidez de su preparación, la claridad de la expresión, su magnífica condición humana, que dejó huella imponente como uno de los profesores más destacados en el área de la Microbiología en el país.

El Dr. Briceño Iragorry solicita su jubilación el 08 de febrero de 1977 y se le confiere la misma a partir del 01 de marzo de ese mismo año; sin embargo, continúa firmando como jefe del DMPMT hasta el mes de mayo de 1977; cuando queda encargado del Departamento el Dr. Jesús Romero Morell.

El Dr. Jesús Romero Morell durante el período en que el Dr. Briceño Iragorry se desempeñó como jefe del Departamento, fue nombrado jefe encargado del mismo en varias ocasiones. Una vez concedida la jubilación al Dr. Briceño Iragorry, se le designa como jefe del DMPMT. Para ese momento el Dr. Romero era el

jefe de la Cátedra de Parasitología, cargo que venía ejerciendo desde agosto de 1970; en consecuencia, el **Dr. Luis Alberto Rincón** asume la jefatura de esa cátedra; quedando además conformado el Departamento, por el Dr. Alberto Pardi jefe de la Cátedra de Microbiología y el Dr. Félix Pifano jefe de la Cátedra de Medicina Tropical.



El **Dr. Jesús Romero-Morrel** realizó su educación media, primero en la Escuela Federal de Pueblo Nuevo y luego en el Colegio Luis Espelozín de Coro. En 1943, el Liceo Cecilio Acosta de Coro, le otorga el título de Bachiller en Filosofía, título que en ese tiempo era expedido por la Universidad Central de Venezuela. Sus estudios universitarios los realizó en la Universidad Central de Venezuela (UCV), obteniendo el título de Médico Cirujano en 1949, promoción "Dr. José Izquierdo" y el de Doctor en Ciencias Médicas, en 1963. Realizó los cursos de postgrado en Médico Tropicalista en el Instituto de Medicina Tropical de la Universidad de Sao Paulo, Brasil (1960) y el de Médico Venereólogo en el Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (MSAS) y UCV (1944-1950).

El Dr. Jesús Romero Morell, falconiano, médico tropicalista, condujo el DMPMT durante 4 años. A pesar de que ingresó como Instructor por concurso en la Cátedra de Medicina Tropical en 1950, pasa a ser

docente de la Cátedra de Parasitología hasta alcanzar su jefatura, responsabilidad que cumple hasta 1977. En varias ocasiones, le correspondió compartir su deber con la dirección del IMT como director (encargado) y sub-director del mismo desde 1960 hasta 1980.

Recibió merecidas distinciones y condecoraciones, tales como: Premio "Martín Vegas" 1957 de la Sociedad de Dermatología, Venereología y Leprología de Venezuela; Premio "Medalla de Medicina Tropical" (1960) del Instituto de Medicina Tropical Sao Paulo, Brasil; "*Pirenochaeta romeroi*, Nva. sp". Dante Borelli, Dermatología Venezolana; Orden "27 de junio" 1ra Clase, Medalla de Oro; Orden "José María Vargas" 1ra Clase Corbata UCV; Orden "Josefa Camejo" Consejo Municipal del Municipio Autónomo Falcón, Pueblo Nuevo, estado Falcón y Orden "Dr. Calle Sierra", Consejo Municipal del Municipio Autónomo Miranda, Coro, estado Falcón.

Sus trabajos científicos e investigación siempre estuvieron relacionados con leishmaniasis visceral, (Kala-Azar) en Venezuela, la *Bionphalaria glabrata* de Venezuela a la infección con dos diferentes cepas de *Schistosoma mansoni*; estudio sobre leishmaniasis tegumentaria en Venezuela, "*Leishmania pifanoi* n. sp", entre otras investigaciones.

Formó parte de diversas de sociedades científicas y profesionales: Federación Médica Venezolana, Colegio de Médicos del Distrito Federal, Royal Society of Tropical Medicine and Higiene (Londres), Sociedad Internacional de Dermatología Tropical, y Sociedad Parasitología Venezolana. En junio de 1981, se le confiere el beneficio de la jubilación y regresa a Falcón su estado natal, con el fin de crear las cátedras de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Siendo elegido como Vicerrector Académico de esa casa de estudios.

Para junio de 1981, asume como jefe encargado del DMPMT, el **Dr. Teudis Cardozo Soto**, quien también se desempeñaba como jefe de la Cátedra de Parasitología y jefe de la Sección de Geohelminthiasis. Caraqueño, apasionado por la historia de la

medicina, laico comprometido. Se graduó de médico cirujano y luego Doctor en Ciencias Médicas en la UCV. Realizó cursos de postgrado en Patología Tropical, en Hamburgo, en la Universidad de Kassel, Ba Kissingen, en Alemania y en Roma. Se desempeñó como: Adjunto al Servicio del Laboratorio Clínico y Medicina Interna en la Maternidad Concepción Palacios, Médico Consultor de Enfermedades Parasitarias y Transmisibles en el Hospital de Niños "JM de los Ríos". Fue instructor por concurso de parasitología en la escuela de Bioanálisis y llegó a Profesor Titular en 1988 en la Cátedra de Parasitología de la escuela de medicina "Luis Razetti". Entre sus trabajos científicos, relató el primer caso de larva visceral migratoria en Venezuela, en 1968; trabajó en helmintología y la enseñanza parasitaria médica con criterios interdisciplinarios. Participó y representó a nuestro país en varios congresos en el exterior. Fue invitado especial por El Vaticano, en el primer Congreso sobre promoción de la salud y farmacoterapia en el mundo en desarrollo, en 1986.

Durante el período en que el doctor Cardozo se desempeña como jefe del Departamento, siendo el doctor Carlos Moros Ghersi, rector de la UCV, en 1982 se actualiza el Reglamento de Cátedras y Departamentos, el cual está aún vigente. Entre sus atribuciones se deben resaltar:

- Presidir la Comisión Departamental y las reuniones del Departamento.
- Participar con voz y voto en las sesiones del Consejo de Escuela.
- Representar al Departamento correspondiente ante los funcionarios y organismos universitarios.
- Supervisar el funcionamiento de las cátedras y formular las recomendaciones del caso.
- Velar por el cumplimiento de las disposiciones legales y reglamentarias en el seno del respectivo Departamento, formulando las recomendaciones a los casos de los Jefes de cátedras, y ejecutar las decisiones y resoluciones de las reuniones departamentales.
- Dar cuenta periódicamente al Director de la Escuela sobre el funcionamiento del Departamento.
- Otras atribuciones que le sean asignadas por el

reglamento de la Facultad y Autoridades Universitarias.

En ese Reglamento, el Departamento es una unidad docente y de investigación integrada por cátedras afines o paralelas de una Escuela y tiene por objeto lograr la coordinación de sus actividades docentes y de investigación e impulsar el desarrollo de la respectiva disciplina. Cada Departamento tendrá una Comisión Departamental constituida por los Jefes de Cátedras y el Jefe del Departamento, quien la presidirá. Las Comisiones Departamentales tendrán las siguientes funciones:

- Coordinar, dentro de los planes de la respectiva Escuela, los horarios y programas de estudio de las cátedras incorporadas, así como los métodos de estudio o enseñanza.
- Resolver las cuestiones de funcionamiento interno de las cátedras que éstas planteen.
- Hacer a los organismos superiores las sugerencias que se consideren de interés para propiciar el desarrollo y progreso de las cátedras.
- Servir de organismo consultivo de los Directores de Escuela, Decanos, Consejo de Facultad y Consejo Universitario en los asuntos relacionados con la enseñanza, la investigación y extensión de las correspondientes disciplinas.
- Conocer las comunicaciones provenientes de las cátedras y tramitarlas a los organismos superiores, sin perjuicio de lo establecido en el artículo 5º de este reglamento.
- Participar en el proceso de evaluación profesoral.
- Otras que le sean encomendadas por el Decano, el Director de la Escuela, el Consejo de la Escuela o el de la Facultad.

A partir de ese momento los Jefes de Cátedras y los de Departamentos durarán dos años en el ejercicio de sus funciones y podrán ser nombrados nuevamente por periodos sucesivos cumpliéndose en todo caso con el procedimiento previsto en el presente reglamento. Vencido el lapso y mientras no se haya hecho una nueva designación, quienes venían ejerciendo la jefatura de cátedra o de departamento continuarán en su desempeño con el carácter de Jefe - Encargado.

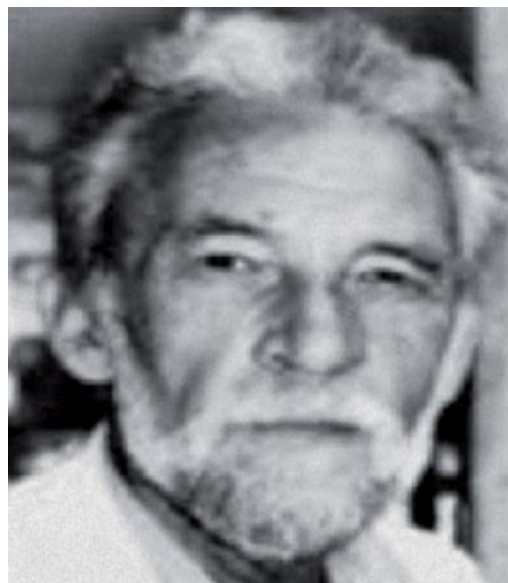
En ese lapso acompañaron al Dr. Cardozo, en

el Departamento hasta septiembre de 1983, el Dr. **Alberto Pardi** en Microbiología, el **Dr. Luis Rincón Salas** en Parasitología y el **Dr. Edgar Belfort** en Medicina Tropical. El doctor Cardozo fue convidado para dictar el curso de postgrado en enfermedades tropicales e infecciosas en la Universidad de Roma, en calidad de profesor Invitado; por tal motivo, solicitó un permiso de un año para ausentarse y quedó encargado del Departamento el Dr. Rincón y en ocasiones el Dr. Edgar Belfort. Las doctoras María Josefina Núñez y Olinda Delgado ganan el concurso para las jefaturas de las cátedras de Microbiología y Parasitología respectivamente, conformando de esta manera las autoridades del Departamento.

El Dr. Cardozo recibió varias distinciones entre ellas la Orden "Hipólito Unanue" en el grado de Oficial por la Presidencia de Perú en 1970, condecorado con la Orden de Caballero de la República Italiana, 1985. Fue representante de la Facultad de Medicina en la Comisión de Estudios Interdisciplinarios de la UCV desde febrero 1983 a diciembre 1987. Nombrado Individuo de Número, Sillón XXXV de la Sociedad Venezolana de Historia de la Medicina en 1992 y también en ese año, fue designado Presidente-Coordinador del Consejo asesor de la Fundación Hospital Universitario de Caracas y miembro del Consejo Asesor Nacional de Salud.

El Dr. Cardozo, retoma la jefatura en enero de 1985 y permanece en ella hasta septiembre de 1988, cuando es nombrado el Dr. Mondolfi, jefe encargado del Departamento.

El **Dr. Alejandro Mondolfi Galavis**, es nombrado jefe del DMPMT a partir de mayo de 1989 y permaneciendo hasta septiembre de 1993. Estudioso caraqueño, cursó la primaria y el primer ciclo de secundaria en el Colegio América y se graduó de Bachiller en Ciencias Biológicas de la Universidad Católica Andrés Bello en 1955. En la Universidad Central de Venezuela (UCV) obtiene su título de Médico-Cirujano en 1961. Se va a Brasil y se forma como médico-tropicalista en el Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, en 1962. Posteriormente en el Instituto Butantan de Sao Paulo se



Dr. Alejandro Mondolfi Galavis

entrena, en el diagnóstico y tratamiento de emponzoñamientos por serpientes, escorpiones y arañas; en el Hospital de Isolamento "Emilio Ribas" adquiere experiencia en enfermedades infecciosas y parasitarias. Su tutor en la Universidad de Sao Paulo fue el Dr. Carlos Da Silva Lacaz.

A su regreso a Venezuela ingresa a la Cátedra de Medicina Tropical como Instructor (dedicación exclusiva). Su formación como docente la hace bajo la tutela de su Maestro, el Dr. Félix Pifano y el personal de la cátedra para ese entonces, los doctores Jesús Romero, Rafael Medina, Luis Manuel Peñalver, Joel Salazar, Lorenzo Fígallo, Luis José González Herrera y Edgar Belfort. La docencia de Medicina Tropical la complementa con investigación. Llega a ser jefe de la Sección de Animales Ponzosos del IMT y Adjunto al Servicio Enfermedades Transmisibles del Adulto del HUC. En 1975 hace el Curso Medio de Epidemiología en la Escuela de Salud Pública (UCV). En 1977 viaja a EEUU como fellow de la OMS para estudio de Epidemiología y Control de Infecciones Nosocomiales, haciendo pasantías en el CDC (Atlanta, Georgia) y otras universidades de Estados Unidos de América. A su regreso es nombrado Epidemiólogo del Hospital Universitario de Caracas adscrito al Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (MSAS), cargo en el que permanece durante 4 años, fundando el Servicio de Epidemiología de este hospital. En 1982 realiza un curso de Epidemiología

en la Universidad de Minnesota, donde estudia Epidemiología de Enfermedades Infecciosas, Epidemiología de Infecciones Nosocomiales y Epidemiología de Alcoholismo.

Llegó a ser jefe de la Cátedra de Medicina Tropical y del DMPMT durante 2 períodos. Además de la docencia regular fue docente en los postgrados de Medicina Interna, Enfermedades Infecciosas, Pediatría y Neurología en el HUC, en la Escuela de Salud Pública (UCV) y en la Escuela de Malariología (MSAS).

Dos campos que ocuparon su interés entre otros, fueron la Malaria y la Hepatitis D. Formó parte de un grupo que estudió durante algo más de 2 años un brote de hepatitis D entre los indígenas Yupca en la Sierra de Perijá (estado Zulia) en los años de 1981 a 82. Estudió durante más de 10 años la evolución de un brote de hepatitis D en comunidades indígenas (Yanomami) del Alto Orinoco. Estos dos estudios son posiblemente los más importantes que se han publicado sobre seroepidemiología de esta enfermedad en comunidades abiertas.

Representó al IMT, en infinidad de comisiones. Miembro fundador de la Sociedad Venezolana de Infectología y presidente de la misma. En 1983, fue el padrino de la promoción de médicos egresados de la escuela de medicina "Luis Razetti". Se jubiló en el año 2000, culminando una larga carrera docente de 39 años.

Es acompañado durante su período por la **Dra. María Josefina Núñez** en la Cátedra de Microbiología, la **Dra. Olinda Delgado** en la Cátedra de Parasitología y la **Dra. Salha Abdul-Hadi** en la Cátedra de Medicina Tropical.

En octubre de 1993 la **Dra. Belkisyolé Coromoto Alarcón de Noya** asume la jefatura del Departamento, en donde permaneció durante tres períodos, habiendo sido la primera mujer en asumir el cargo. Nace en Guanta, Anzoátegui y realiza sus estudios en Caracas, egresando como médico de la escuela de medicina "Luis Razetti" en 1975; posteriormente ingresa a la Universidad de Tulane, Nueva Orleans en el estado de Luisiana, donde obtiene el título de PhD

en Parasitología Médica en el año 1979.



Dra. Belkisyolé C. Alarcón de Noya

La **Dra. Alarcón de Noya**, le ha correspondido la responsabilidad de transitar por numerosas cargos y actividades académicas, asistenciales, administrativas, de extensión e investigación. En la actividad académica administrativo comenzó por el cargo de preparadora por concurso en 1973 a 1975, posteriormente ingresa como docente de la Cátedra de Parasitología en 1980 hasta alcanzar la categoría de Titular en 1998, jefe de la Cátedra de Parasitología, durante dos lapsos consecutivos de 1989 a 1993 y, por último, jefe del Departamento de Microbiología, Parasitología y Medicina Tropical durante 3 períodos consecutivos 1993-1995, 1995-1997 y 1997-1999.

Ha participado como docente regular de pregrado y de postgrado en cursos de helmintología, malacología, protozoología, esquistosomiasis, neurosistecercosis, biología celular de parásitos, entre otros; tanto en universidades nacionales como en el exterior. Tutora y jurado de más de 40 trabajos de investigación de tesis doctorales, maestrías, licenciaturas.

En lo administrativo, fue jefe de la Sección de Biohelmintiasis del IMT (1980-2002) y luego jefe de la Sección de Inmunología desde 2002 hasta los actuales momentos. En diciembre de 2015, es elegida Directora del IMT, siendo la primera mujer electa en alcanzar esta posición. Para su cuarto período, como jefe del Departamento, fue comisionada Coordinadora General de la Facultad (2000-2002), donde

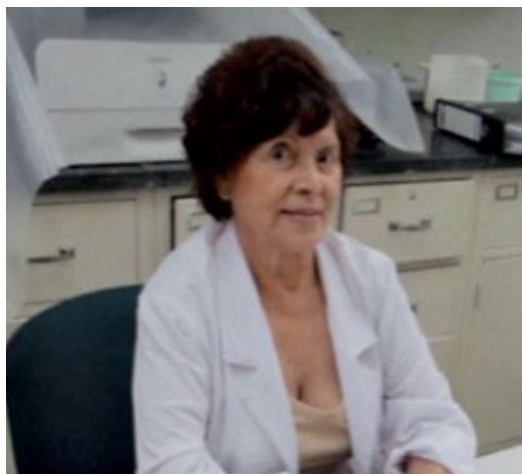
desarrollo iniciativas académicas de integración en el proceso enseñanza-aprendizaje; durante ese lapso la Dra. Olinda Delgado fue encargada del Departamento. También se desempeñó como Decana encargada en 2001. Es importante resaltar que, durante su segundo período como jefe del Departamento en 1996, se consolidó la creación del Postgrado Nacional de Parasitología, asumiendo la dirección del mismo, hasta junio 2000 cuando paso a ser la Coordinadora hasta el año 2011.

Con respecto a las actividades de investigación, ha publicado un sin fin de trabajos más de 300 tanto en revistas internacionales como nacionales y autora de varias monografías en fasciolosis, paragonomiasis, esquistosomiasis, cisticercosis, toxoplasmosis y dedicada en los últimos tiempos, sobre enfermedad de Chagas de transmisión oral. Investigador del PEI nivel C. Pertenece a una serie de sociedades, asociaciones y grupos científicos; entre ellos, el grupo Iberoamericano Nuevas Herramientas para el control del Chagas (NHEPACHA). Ha sido merecedora de múltiples premios y condecoraciones. Entre ellos: Premio “Dr. Luis Razetti” en su VI Edición 2000 a la Investigación Aplicada, Premio “Dr. Luis Razetti” de la Facultad de Medicina de la UCV a la Investigación Aplicada del año 2013, Mención Honorífica del Premio “Dr. José María Vargas” de la Facultad de Medicina de la UCV a

dos por la microepidemia de Enfermedad de Chagas. Diciembre 2015., Premio Bienal Dr. “Edmundo Vallecalle” a la Trayectoria Académica Universitaria en su VII Edición, Año 2016.

Ha pertenecido y pertenece a varias sociedades médicas y científicas: Asociación para el Progreso de la Investigación Universitaria (APIU), “American Society of Tropical Medicine and Hygiene”, Sociedad Venezolana de Infectología, Sociedad Parasitológica Venezolana, siendo su presidenta en el lapso de 1997 a 1999.

Para el inicio del nuevo milenio año 2000, la **doctora Olinda María Delgado Silva** continúa, a la doctora Noya, en esta responsable labor de la jefatura del Departamento, cuando adquiere la titularidad del cargo, a pesar de haber sido en múltiples ocasiones encargada del mismo. Esta meritoria y admirable bióloga de la Facultad de Ciencias de la UCV, realiza un Master en Ciencias y Doctorado en Ciencias Biológicas; además, cuenta con una maestría en Inmunología en la Universidad de Cincinnati, en Ohio, EUA. Barquisimetana de nacimiento, pero caraqueña de corazón, profesora Titular, ha sido jefa de Cátedra de Parasitología por concurso durante varios períodos; su primer período fue de 1983 al 1985, seguido por otro de 1985 a 1987 y luego jefe encargada de la cátedra en varias oportunidades.



Dra. Olinda María Delgado Silva



Dra. Tibaire A. Montes Marcano

la investigación básica del año 2013, Banda con Botón y Reconocimiento escrito por decisión del Municipio Chacao a la labor cumplida con los ciudadanos afecta-

Entre sus actividades docentes cabe mencionar: profesor invitado en el Postgrado de Infectología en el HUC y directora y coordinadora docente del Postgra-

do Nacional de Parasitología, entre otras actividades. Sus líneas de investigación han sido en el área de la enfermedad de Chagas, leishmaniasis cutánea y visceral y toxocariasis; siendo su primer trabajo para optar al título de licenciada en Biología: “Correlación histoquímica e histopatológica de la miocarditis chagásica experimental”.

Entre sus actividades administrativas se destaca: jefa de la sección de Patología Celular que posteriormente, cambia de nombre a sección de Inmunoparasitología, siendo el director del Instituto para ese momento el Dr. Oscar Noya González. Miembro de consejo técnico del IMT y directora encargada del mismo en varias oportunidades.

Pertenece a la Asociación para el Avance de la Ciencia (ASOVAC), al Colegio de Egresados de la Facultad de Ciencias, miembro de la Asociación para el progreso de la Investigación Universitaria (APIU). Perteneció a la junta directiva de la Sociedad Parasitológica Venezolana. Investigador del PEI nivel C.

En su honor se creó el Premio “Olinda Delgado”, para los estudiantes de pregrado que hayan cursado la asignatura de Parasitología de la escuela de medicina “Luis Razetti”, con notas sobresalientes.

La Dra. Delgado, continuó desde el Departamento, con la proyección e impulso del Postgrado Nacional de Parasitología.

En octubre de 2001 ocupa la jefatura del Departamento la **doctora Tibaire Auxiliadora Montes Marcano**. Esta disciplinada trujillana nació en Valera, estudia medicina en la Universidad de Los Andes.

En enero de 1974 ingresa a la División de Laboratorios del Ministerio de Sanidad, cuyo Director el Dr. Henry Fossaert, había implementado un programa de entrenamiento en técnicas de diagnóstico bacteriológico para médicos; allí permanece hasta septiembre de 1975 cuando ingresa al postgrado de Microbiología Médica coordinado por el insigne Maestro Rafael Darricarrere en el Instituto de Nacional de Dermatología y ahora Instituto Nacional de Biomedicina. Durante la pasantía de virología, realizada en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y dirigido por el doctor José Esparza, siente gran

atracción por los virus; finaliza el postgrado en agosto de 1977.

En septiembre ingresa a la Cátedra de Microbiología de la escuela de medicina “Luis Razetti” de la Universidad Central de Venezuela (UCV). Trabaja con la doctora Berta Viera de Torres, médica viróloga, quien la entusiasma a realizar un entrenamiento en técnicas de aislamiento y diagnóstico viral en el Instituto Nacional de Higiene con la doctora Rosalba Salas, Jefe de la Sección de Aislamiento Viral, allí permanece por espacio de dos años.

En septiembre de 1991 viaja al Instituto “Pedro Kourí” de La Habana, Cuba, donde realiza un entrenamiento de diagnóstico de *arbovirus*. Entre septiembre de 1999 y octubre de 2000 realiza una Maestría en Virología en este mismo Instituto.

Fue jefe de la Cátedra de Microbiología durante tres períodos.

Asume la jefatura del Departamento en el 2001, por dos períodos consecutivos hasta el 2004. Tuvo el mérito de estructurar al DMPMT, mediante la organización del mismo e implementando reuniones periódicas del consejo departamental.

Fue Presidenta de la Sociedad Venezolana de Microbiología 1996-2000. Recibió el Premio a la Excelencia 2005 otorgado por la Red de Sociedades Científicas Médicas Venezolanas (RSCMV). La doctora Montes participó en numerosos eventos científicos nacionales e internacionales, como conferencista integrante de comisiones de trabajo. Formó parte de la Comisión editorial de la Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Sus numerosas publicaciones en revistas científicas le han dado la reputación que actualmente tiene como viróloga.

Le sigue en esta responsabilidad la **doctora Salha Abdul-Hadi Saleh**, cuando es designada jefe por concurso a partir de octubre de 2004, lo cual cumple por dos períodos consecutivos hasta 2008.

Dedicada hematóloga nació en Caracas, de padres palestinos nacionalizados, estudió medicina, en la escuela de medicina “Luis Razetti”, en la UCV, donde egresó con el título de Médico Cirujano en el año de 1974.



Dra. Salha Abdul-Hadi Saleh

Realizó el Magíster Scientiarum, mención Hematología en el Hospital Universitario de Caracas.

En 1979 ingresó como Instructor por Concurso en de la Cátedra de Medicina Tropical en la escuela de medicina "Luis Razetti" hasta llegar a ser Titular. Su principal mentor científico fue el Doctor Félix Pifano. En 1981, realiza curso de especialización de Medicina Tropical en el Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sao Paulo (Brasil), bajo la dirección del profesor Dr. Carlos Da Silva Lacaz y una pasantía clínica en el Hospital de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias "Emilio Ribas" de la Escuela Paulista de Medicina y en 1990, tomó el curso de perfeccionamiento en Medicina Tropical de la Facultad de Medicina del Triángulo Mineiro en Uberaba, Minas Gerais (Brasil), bajo la dirección del Dr. Aluizio Prata.

Además de su labor docente de pregrado en la Cátedra de Medicina Tropical, Salha Abdul-Hadi, realizó docencia de postgrado a los residentes de Enfermedades Infecciosas de los Hospitales Universitario de Caracas (HUC), hospital de niños "JM de los Ríos", Hospital Militar "Carlos Arvelo" y hospital "José María Vargas" de Caracas, Servicio de Pediatría del HUC, en el Instituto de Anatomía Patológica de la UCV y del Postgrado Nacional de Parasitología.

Asimismo, creó una consulta externa especializada de pacientes con eosinofilia y enfermedades tropicales.

En el aspecto administrativo, se desempeñó como

jefe de la Sección de Hematología del Instituto de Medicina Tropical "Dr. Félix Pifano" desde el mes de marzo de 1978 hasta 2014, actividad que compartió con la jefatura de la Cátedra de Medicina Tropical durante varios períodos y con el DMPMT entre los años 2004 a 2008.

Asistió y participó como conferencista en numerosos eventos científicos en el país, tanto en el campo de la Medicina Tropical como en el de la Hematología, coordinando en varias ocasiones diversos eventos científicos nacionales e internacionales. Sus principales líneas de investigación fueron las referidas a los síndromes eosinofílicos, las hepatoesplenomegalias febriles (especialmente la leishmaniasis visceral), la malaria y las micosis sistémicas en niños. Publicó varios trabajos en diferentes revistas nacionales e internacionales.

Continúa la **doctora Nathalie de Jesús Chacón Fonseca**, maracucha, nacida como dice su Currículo: "en plena feria de la Chinita". Médico cirujano, egresada de la Universidad del Zulia en 1993. Realiza el postgrado en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) de 1994 al 2000, obteniendo el título de PhD mención Biología-Inmunología. Ingresó como profesor Asistente a la Cátedra de Parasitología de la escuela de medicina "Luis Razetti" de la UCV,



Dra. Nathalie Chacón Fonseca

hasta 2005 y luego pasa a ser docente de la Cátedra de Medicina Tropical en la misma escuela de medici-

na, en donde llega a ser jefa en 2017.

Participa y dicta clases en el curso anual de Infectología del Adulto del HUC, desde 2010 hasta la actualidad, con los temas de manejo de muestras biológicas, diagnóstico coproparasitológico, el paciente con eosinofilia y malaria. En el curso anual de Infectología del Adulto del Hospital Militar de Caracas, fue la encargada de efectuar las actividades correspondientes al diagnóstico coproparasitológico, en la Sección de Geohelminthiasis, entre los años 2005-2014. Además, fue docente en el curso bianual del Postgrado Nacional de Parasitología 1999-2005 en donde le correspondieron los temas de Helmintos, Hidatidosis, Esquistosomosis, búsqueda de información en internet y en librería públicas.

Durante su jefatura en el Departamento por el periodo de 2008 al 2010, la Dra. Chacón, diligente y organizada, creó el logo del DMPMT, el cual fue aprobado por las autoridades decanales. Se le atribuye ser el artífice del enlace e intercambio de estudiantes para realizar pasantías en el área de Medicina Tropical en el hospital católico de Würzburg, dirigido por el Dr. August Stich, en la ciudad de Würzburg en Alemania. Fue representante profesoral y Secretaria del Consejo de Escuela de medicina "Luis Razetti" desde mayo 2015 hasta julio 2016. Jefe de la Sección de Geohelminthiasis de IMT desde 2005. Posee varias publicaciones en capítulos de libros y manuscritos. Pertenecer a la ASOVAC y Sociedad Venezolana de Infectología.

Ha sido condecorada con la Orden José María Vargas en Tercera Clase y ganadora de los premios "ORINOQUIA" 1999-2000 por Investigación aplicada y es PPI y PEI I. Entre sus líneas de Investigación se encuentran las parasitosis intestinales (Blastocystosis y Coccidias intestinales), Leishmaniasis tegumentaria y docencia en Medicina Tropical.

En diciembre de 2010, es nombrada la **doctora Zobeida Lina Uzcátegui Rivas de López** después de optar al concurso de la jefatura del Departamento. Guanareña de nacimiento, pero de residencia y formación valenciana desde los 6 meses de edad. Se forma como médico en la Universidad de Carabobo,



Dra. Zobeida Uzcátegui de López

alumna de los doctores Alejandro Divo y José Witremundo Torrealba en las cátedras de Microbiología y Parasitología respectivamente; quizás desde allí comenzó su inclinación en esta área. Realiza el postgrado de Microbiología Médica en la UCV, en el Instituto de Biomedicina, siendo el coordinador del postgrado el Dr. Rafael Darricarrere y director el Dr. Jacinto Convit. Egresó en 1985 con mención: *Summa Cum Laude*. Inmediatamente, ingresa a la Universidad de Duke en Carolina del Norte, EUA, donde realiza pasantías en el Laboratorio de Microbiología y en el Servicio de Enfermedades Infecciosas hasta 1988. En 1990, se incorpora como Profesor Contratado en la Cátedra de Microbiología de la Escuela de Medicina "Luis Razetti" de la Facultad de Medicina de la UCV. En 1995, gana el Concurso de Oposición para el cargo de Instructor a medio tiempo. Obtiene la beca para realizar el Curso Internacional sobre Enfermedades Tropicales en Universidad Federal de Pernambuco en Recife, Brasil, en 1998. Crece su pasión por la docencia y tiene la oportunidad de asistir al curso intensivo "Roles of the Teacher" dictado en el Centro de Educación Médica, en la Universidad de Dundee en Escocia, Reino Unido, en septiembre de 2001.

Entre sus actividades administrativas caben destacar: Coordinadora docente de la escuela de medicina "Luis Razetti", jefa encargada de la Cátedra de Medicina Tropical en dos ocasiones 2014-2015

y 2016-2017, jefa encargada de la Cátedra de Parasitología 2016, coincidiendo las dos jefaturas de cátedras con la del Departamento. En cuanto a sus actividades en la jefatura del DMPMT, su gestión ha abarcado cuatro períodos, desde 2010 hasta el próximo 2018; durante su primera gestión (2010-2012) continuó con el proyecto de preparación de estudiantes de pregrado para que realizaran pasantías en Alemania, en el área de Medicina Tropical en el hospital católico de Würzburg.

Con tiempos difíciles tanto para la UCV como para el país, se preocupa por el deterioro progresivo de las instalaciones y escasez de recursos del departamento, discute con estudiantes y profesores las posibilidades de mejorar las condiciones de trabajo con el esfuerzo de todos ellos. Para lograr esto, impulsa jornadas de limpieza, pintura y reparación de paredes, mesones y bancos de los laboratorios 105 y 108 de la Cátedra de Microbiología, con la colaboración de los estudiantes cursantes de las asignaturas del departamento. Con el fin de recaudar fondos para el funcionamiento operativo del DMPMT, realiza simposios de actualización, mesas redondas y actividades musicales con la organización y participación de los estudiantes. El ingreso recolectado sirvió para las compras de equipos e insumos necesarios para la docencia.

Ha pertenecido a varias sociedades médicas científicas, tales como la Sociedad Venezolana de Microbiología, donde llegó a ocupar su presidencia durante dos periodos, desde 2000 al 2004; fue Tesorera de la Asociación Latinoamericana de Microbiología (ALAM), miembro de la Sociedad Americana de Microbiología (ASM), miembro de la junta directiva de la Red de Sociedades Científicas Médicas Venezolanas (RSCMV) y miembro de la Asociación Médica para la Educación Europea (AMEE). De la misma manera, ha pertenecido a varias comisiones: Comisión de Currículo, por más de 20 años, Comisión de Equivalencias, Traslados y Reválidas y Comisión de Jubilados y Pensionados. Además, es miembro fundador del Centro de Investigación de Educación Médica (CIDEM), desde el año 2000.

Ha sido galardonada con los premios de "Profe-

sor Meritorio Nivel III" (1998), "Investigador Activo" (1999-2000, PEI). Recibió el Premio a la Excelencia 2015 otorgado por la RSCMV y fue honrada con el privilegio de ser la "madrina" de la Promoción de Médicos 2012, distinción compartida con la Dra. Raíza Ruiz.

Zobeida Uzcátegui es una profesional responsable, dedicada, con gran sentido de pertenencia a la Universidad y comprometida con la actividad de la enseñanza médica. Su investigación ha estado centrada en el área de bacteriología (enterobacterias y micobacterias) y en educación médica, su gran pasión.

Jefes y períodos del Dmpmt

Dr. Felix Pifano (1958-1968).

Dr. Leopoldo Briceño Iragorry (1968-1977).

Dr. Jesus Romero Morell (1977-1981).

Dr. Teudis Cardozo Soto (1981-1988)

Dr. Alejandro Mondolfi (1988-1993).

Dra. Belkísyole Alarcón de Noya (1993-1999)

Dra. Olinda Delgado (2000-2001).

Dra. Tibaire Montes (2001-2004).

Dra. Salha Abdul Hadi (2004-2008).

Dra. Nathalie Chacón (2008-2010).

Dra. Zobeida Uzcátegui (2010-2018).

REFERENCIAS

- Archivos del Instituto de Medicina Tropical. Informe Anual. Desde 1960*
- Archivos de la escuela de medicina "Luis Razetti". Correspondencias.*
- Archivos del Departamento de Microbiología, Parasitología y Medicina Tropical. Oficinas*
- CANELON AROCHA J.L., (1993) Juicio crítico del trabajo: "Consideraciones históricas sobre la Helmintología médica", presentado por el Dr. Teudis Cardozo Soto, para su incorporación, como Individuo de Número a la Sociedad Venezolana de Historia de la Medicina. *Revista de la Sociedad venezolana de Historia de Medicina* 42(63):41-45.
- CARMONA O., NOVOA MONTERO D., (2005). "Cazadores de Microbios en Venezuela". Pfizer de Venezuela, S.A.
- NAVARRO P., SAFAR M.L., (2003). "Félix Pifano: La historia viviente de Medicina Tropical". *Gaceta Médica de Caracas* 111(2).
- NAVAS BLANCO A. J., (2002) "Reseña Histórica de las sedes de la Universidad Central de Venezuela 1721- 2001". Edición conmemorativa de los 280 años de la UCV. Universidad Central de Venezuela. Patrimonio Mundial. Vice-Rectorado Académico.
- Políticas Académicas de la UCV. (2002). Universidad Central de Venezuela. Patrimonio Mundial. Vice-Rectorado Académico.*
- Reglamento de Cátedras y Departamentos (1982). Gaceta de la Universidad Central de Venezuela. Resolución N° 100. Consejo Universitario. UCV.*
- Testimonios orales del personal docente, administrativo y obrero de las cátedras del Departamento y del Instituto de Medicina Tropical.*
- VITAE: Academia Biomédica Digital. Personajes. Instituto de Medicina Tropical

El problema de la tuberculosis multiresistente (tb-mdr) y extremadamente resistente (tb-xdr) a fármacos: implicaciones epidemiológicas y técnicas rápidas para el diagnóstico

Ana Antonietta Guspini*,
Iraní Pérez*,
Giorgina Mendoza*,
Andreina Duarte*,
Y Susana González Rico*

*Sección de Bacteriología,
Instituto de Medicina Tropical, Facultad de
Medicina, UCV.
susana_gonzalez_rico@hotmail.com

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una grave enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*. Las cepas de *M. tuberculosis* se han hecho cada vez más resistentes a drogas, especialmente a los dos medicamentos antituberculosos de primera línea, isoniazida y rifampicina. En el 2015, fueron reportados unos 480.000 casos de TB multiresistente (TB-MDR) a nivel mundial, pasando a requerir tratamiento especial, el cual es más costoso y presenta mayores efectos secundarios. La situación se agrava por el incremento en el número de casos de TB extremadamente resistentes (TB-XDR), causada por bacilos resistentes a todos los medicamentos antituberculosos. El diagnóstico rápido y la identificación de las cepas TB-MDR y TB-XDR, permite la aplicación oportuna del tratamiento, por lo que es esencial para el éxito de las estrategias de control de la TB a nivel mundial. Es indispensable el desarrollo de herramientas de mayor sensibilidad y rapidez para la detección de *M. tuberculosis* y su resistencia a las drogas. En particular las pruebas de amplificación de los ácidos nucleicos presentan una buena especificidad, simplicidad técnica y rapidez en la obtención de resultados, por lo que han sido certificadas por la OMS. Estas son las pruebas de Xpert MTB/RIF y Genotype MTBDR/plus. Sin embargo su alto costo limita su implementación en ciertos ambientes, por lo que nuevas tecnologías están siendo evaluadas. El objetivo de éste trabajo es realizar una revisión bibliográfica de la problemática de la TB-MDR y TB-XDR, y comparar las ventajas y desventajas de las técnicas rápidas para su diagnóstico.

Palabras clave: Tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*; TB; Resistencia; Diagnóstico; TB-MDR/TB-XDR; Xpert MTB/RIF; Genotype MTBDRplus; MODS.

THE PROBLEM OF MULTIDRUG-RESISTANT (TB-MDR) AND EXTENSIVELY DRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS (TB-XDR): EPIDEMIOLOGICAL IMPLICATIONS AND RAPID TECHNIQUES FOR DIAGNOSIS

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a serious infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. The strains of *M. tuberculosis* have become increasingly resistant to drugs, especially the two first-line anti-tuberculosis drugs, isoniazid and rifampicin. In 2015, some 480,000 cases of multidrug-resistant TB (MDR-TB) were reported worldwide, requiring special treatment which is more expensive and has more side effects. The situation is aggravated by the increase in

the number of extremely resistant TB cases (XDR-TB), caused by bacilli resistant to all antituberculosis drugs. Rapid diagnosis and identification of TB-MDR and TB-XDR strains allows the timely implementation of treatment, making it essential for the success of TB control strategies worldwide. It is essential to develop tools of greater sensitivity and speed for the detection of *M. tuberculosis* and its resistance to drugs. In particular, nucleic acid amplification tests have good specificity, technical simplicity and rapid results, and have therefore been certified by the WHO. These are the Xpert MTB/RIF and Genotype MTBDR /plus test. However, its high cost limits its implementation in certain environments, so new technologies are being evaluated. The aim of this work is to carry out a literature review of the problem of MDR-TB and XDR-TB, and to compare the advantages and disadvantages of the rapid techniques for its diagnosis.

Keywords: Tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*; TB; Resistance; Diagnosis; TB-MDR/TB-XDR; Xpert MTB/RIF; Genotype MTBDRplus; MODS.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad pulmonar causada por la infección con el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y representa un grave problema de salud pública a nivel mundial. Cada año se producen 1,5 millones de muertes relacionadas con esta enfermedad, considerada una de las 10 principales causas de mortalidad en el mundo. Se estima que una tercera parte de la población mundial está infectada por MTB en estado latente, que aún no han enfermado ni pueden transmitir la infección, pero que podrían convertirse en pacientes con TB activa (Rondón, L., 2010). El MTB también puede infectar otros órganos causando la llamada TB extrapulmonar. La TB extrapulmonar supone el 10-20% del total de TB que padecen los enfermos inmunocompetentes, aunque ésta frecuencia de presentación se incrementa notablemente en las personas portadoras de algún grado de inmunodeficiencia, llegando a representar un 60% de los casos en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Fanlo y col., 2007).

La TB asociada a la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y la TB multirresistente TB-MDR representan una importante amenaza para el desarrollo y la seguridad sanitaria mundial. Las personas con VIH tienen entre 20 y 30 veces más probabilidades de desarrollar TB activa que las VIH-

negativas. La combinación de la infección por el VIH con la TB es letal ya que una acelera la evolución de la otra. En el año 2015, fallecieron unos 0,4 millones de personas por TB asociada al VIH. En el caso de Latinoamérica, en 2014 en Perú, las autoridades sanitarias notificaron un total de 30.008 casos de TB. De estos, 91% corresponden a casos nuevos y 9% representan recaídas (Fanlo y col., 2007).

Debido a los esfuerzos de los programas de control de la TB a nivel mundial, la incidencia de la TB ha disminuido en un 1,5% anual desde 2000. Se estima que entre 2000 y 2015 las mejoras de los servicios de diagnóstico y tratamiento, permitieron salvar la vida de 49 millones de personas. Sin embargo, el surgimiento de cepas resistentes al tratamiento representa una constante amenaza a los programas de control de la TB. En el 2015, fueron reportados unos 480.000 casos de TB-MDR a nivel mundial. Estas graves infecciones son causadas por cepas que no responden al tratamiento con isoniazida y rifampicina, los dos medicamentos antituberculosos de primera línea. Los expertos calculan que alrededor de 100.000 casos desarrollaron resistencia a la rifampicina en el 2015, pasando a requerir de tratamiento contra la forma multirresistente de la enfermedad, el cual es más costoso y presenta mayores efectos secundarios. La situación se agrava con el incremento en el número de casos de TB extremadamente resistentes (TB-XDR), causada por bacilos resistentes a todos los medicamentos antituberculosos en uso actualmente, y cuyos pacientes carecen de opciones de tratamiento. En el 2015, cerca del 9,5% de los casos clasificados como TB-MDR presentaban tuberculosis TB-XDR.

El diagnóstico de la TB-MDR y la TB-XDR así como el de la TB asociada al VIH, puede ser complejo y costoso, particularmente en los niños. Los métodos de diagnóstico tradicional como la observación microscópica, también llamada baciloscopía (BK), y el uso de medios de cultivo para el aislamiento y la caracterización bioquímica de infecciones por MTB, requieren de largos períodos de tiempo y suelen tener baja sensibilidad y reproducibilidad. En el caso de la BK, se sabe que esta técnica solo detecta la mitad de

los casos de TB, y además es incapaz de determinar si hay farmacoresistencia. Esto contribuye al retraso o ineficiencia en la activación de programas epidemiológicos para bloquear la cadena de transmisión de MTB. Por ello se requiere la implementación de técnicas más rápidas y sensibles para la detección e identificación de MTB en muestras clínicas y la detección de cepas patógenas capaces de causar TB-MDR y TB-XDR.

En base a esta problemática, se establece como objetivo realizar una revisión bibliográfica referente a la resistencia del MTB, la importancia epidemiológica y las dificultades en el diagnóstico, evaluando las alternativas rápidas de diagnóstico desarrolladas por laboratorios de referencia y reportadas por los organismos de salud competentes como la Organización Mundial de la Salud.

EL GÉNERO MYCOBACTERIUM: CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS, PROCESOS DE INFECCIÓN Y TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

La TB es una infección causada por organismos del complejo tuberculosis dentro del cual se encuentran el *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium bovis*, de crecimiento lento que se caracterizan por poseer una pared celular más gruesa que la de muchas otras bacterias, hidrofóbica, cerosa y rica en ácidos micólicos/micolatos. Las micobacterias son clasificadas taxonómicamente dentro del orden *Actinomycetales*, pertenecientes a la familia *Mycobacteriaceae* y al género *Mycobacterium*. Las especies del género *Mycobacterium* son bacilos aeróbicos, inmóviles, no esporulados, rectos o ligeramente curvos, cuyo genoma posee un alto contenido de guanina y citosina. Su principal característica es su compleja pared celular, constituida por ácidos grasos y ácidos micólicos unidos entre sí por enlaces covalentes (Araujo y col., 2008), que conforman una estructura rígida, resistente, hidrofóbica e impermeable a los agentes antimicrobianos. que explica su característica resistencia a la decoloración por alcohol ácido al 3% en la tinción

Ziehl-Neelsen o BK, por lo que se les conoce como Bacilos Acido Alcohol Resistentes o BAR (Rondón, L., 2010). Además, esta pared celular contribuye a su resistencia a daños oxidativos producto de la acción de células fagocíticas.

El sistema de clasificación usado en micobacterias es la clasificación de Runyon, la cual agrupa a las especies en función a la velocidad de crecimiento y presencia de pigmentación. Las especies patógenas del género *Mycobacterium*, *M. leprae* y *M. tuberculosis* exhiben un crecimiento lento con un tiempo generacional de 18-26 horas y forman colonias visibles en medio de cultivo sólido luego de 15-28 días de incubación (Salazar, 2010; Cortes, 2009). Dentro del género *Mycobacterium* se incluyen más de cien especies entre las que destaca el complejo tuberculosis, el complejo *Mycobacterium avium*, la lepra y otras especies denominadas “no tuberculosas”. El complejo tuberculosis incluye las especies MTB, *M. bovis* (incluido el bacilo de Calmette-Guerin o BCG) *M. africanum* y *M. microti*. Las micobacterias pertenecientes al complejo tuberculosis son los agentes etiológicos de la TB pulmonar, una enfermedad infecciosa crónica que afecta principalmente al sistema respiratorio. Pero estas especies también pueden afectar a otras partes del organismo, como los nódulos linfáticos, huesos, articulaciones y riñones, en cuyo caso se clasifica clínicamente como TB extrapulmonar.

La TB pulmonar se transmite por vía aérea a través de las pequeñas gotas que expulsan los pacientes infectados al expectorar. Se estima que la dosis infecciosa se halla entre 5 y 200 bacilos. Algunos bacilos quedan retenidos en las vías respiratorias superiores y son barridos por las microvellosidades (cilios) de las células de la mucosa, mientras que otros invaden los alvéolos pulmonares donde son fagocitados por los macrófagos. Allí se multiplican y originan un proceso inflamatorio. Parte de los macrófagos pueden alcanzar las vías linfáticas y diseminarse por vía hematogena, hacia el resto del organismo (WHO, 2008).

Una vez que se produce la infección del macrófago y dependiendo de las condiciones inmunológicas del paciente, se pueden presentar las

siguientes situaciones:

- El sistema inmunológico logra combatir exitosamente la infección, eliminando el bacilo.
- El sistema inmunológico falla y se desarrolla una TB activa en pocas semanas.
- El sistema inmune logra contener pero no eliminar la infección, por lo que se establece una infección asintomática o infección latente, que puede mantenerse en el tiempo o que puede reactivarse en condiciones inmunológicas deficientes.

La TB es un proceso infeccioso dinámico desde la fase infectiva hasta el desarrollo de la enfermedad, los pacientes son caracterizados por simplicidad según si presentan la infección latente por TB (LTBI) o TB activa. Los pacientes pueden revertir o avanzar en su condición clínica dependiendo de los cambios en la inmunidad del hospedador y la comorbilidad. La exposición a MTB puede desencadenar una respuesta del sistema inmunológico innato o adaptativo (linfocitos T) eliminando el patógeno. En aquellos casos en los cuales el patógeno no es eliminado por el sistema inmune, el mismo puede ser “contenido”, lo cual significa que el bacilo puede sobrevivir en una fase de latencia (LTBI) que puede extenderse por muchos años. Además pueden aparecer pacientes con TB subclínica, que no manifiestan síntomas pero las muestras aisladas y cultivadas resultan positivas (a pesar que suelen ser reportados como cultivo negativo por su baja carga bacilar). Los pacientes con TB activa manifiestan la sintomatología característica y pueden contagiar a otras personas, siendo más sencillo su diagnóstico (Pai y col, 2016).

El tratamiento farmacológico varía dependiendo de la localización y actividad de la infección. Los bacilos presentes en las cavidades pulmonares se multiplican de forma activa en un ambiente aeróbico y los bacilos presentes en el interior de los macrófagos se multiplican en un ambiente microaerofílico que induce al estado de latencia. En los tejidos, la penetración de los fármacos es fácil y el efecto de los antimicrobianos sobre poblaciones con crecimiento activo es relativamente rápido. Pero en el caso de los bacilos que se encuentran en cavidades pulmonares, por

material caseoso o en el interior de los macrófagos, la actividad de los fármacos se ve reducida por la difícil penetración o el bajo pH del microambiente. Si además tomamos en consideración la resistencia natural de las micobacterias debido a la impermeabilidad de su pared celular y su lenta tasa de replicación, el régimen de tratamiento de la TB suele ser largo y se realiza con antibióticos específicos de actividad antituberculosa (Rondón, L., 2010). La tabla 1 describe los tipos de fármacos antituberculosis (Ticona y col., 2008).

Tabla 1
Clasificación de drogas antituberculosis propuesta por la OMS.

Grupo	Droga
Grupo I Agentes de primera línea orales	Isoniacida, Rifampicina, Pirazinamida, Etambutol.
Grupo II Agentes inyectables	Estreptomina, Kanamicina, Amikacina, Capreomicina.
Grupo III Fluoroquinolonas	Moxifloxacino, Gatifloxacino, Levofloxacino.
Grupo IV Agentes de segunda línea orales y bacteriostáticos	Protionamida, Etionamida, Cicloserina, Ácido-p-amino-salicílico.
Grupo V Agentes con un rol no claro en el tratamiento de TB MDR (no recomendado por la OMS para uso rutinario en pacientes con TB resistente)	Clofamicina, Linezolid, Claritromicina, Tiazetazona, Amoxicilina-Clavulánico.

El tratamiento de la TB inicial se lleva a cabo mediante protocolos terapéuticos controlados y se considera efectivo cuando cura a más del 95% de los pacientes y ocasiona menos del 5% de intolerancias graves que obliguen a la modificación del tratamiento. El mejor esquema terapéutico es aquel prescrito para 6 meses de duración: 2 meses con rifampicina, isoniacida, pirazinamida y etambutol, seguidos de 4 meses con rifampicina e isoniacida. En el caso de que el aislado resulte sensible a estos fármacos se podrá retirar el etambutol. Los niños suelen tener una buena tolerancia a los fármacos y el tratamiento debe

ser igual al aplicado en adultos ajustando la dosis al peso (Rondón, L., 2010).

LA RESISTENCIA DE MTB A FÁRMACOS: TIPOS DE RESISTENCIA Y TRATAMIENTOS ANTITURBECULOSO ALTERNATIVOS

Si bien los antibióticos llevan décadas aplicándose con éxito como terapia anti TB, conforme han avanzado los estudios epidemiológicos, y dado el número creciente de casos de resistencia a fármacos, los investigadores intentan buscar tratamientos más efectivos para combatir la TB.

En años recientes se han definido los siguientes conceptos para clasificar la resistencia de una cepa determinada:

Se define la TB multidrogoresistente (TB-MDR) como aquella infección que es resistente a los dos fármacos de primera línea utilizados de tratamiento de TB pulmonar (isoniazida y rifampicina). Mientras que la TB altamente resistente a los fármacos (TB-XDR) es definida por la OMS como una MDR-TB con una resistencia adicional a cualquier fluoroquinolona y a al menos uno de los tres fármacos inyectables de segunda línea usados en el tratamiento (capreomicina, kanamicina o amikacina).

Desde el punto de vista epidemiológico, en todos los países estudiados se ha comprobado la existencia de cepas del bacilo que presentan resistencia al menos un medicamento antituberculoso. La farmacoresistencia surge debido a una mala utilización de los medicamentos antituberculosos, ya sea a través de su prescripción incorrecta o por la mala calidad de los mismos o, más frecuentemente por la interrupción prematura del tratamiento. Si bien en algún momento se pensó que las mutaciones involucradas en la resistencia podían disminuir la patogenicidad de las bacterias, dicha hipótesis fue refutada por la ocurrencia de transmisión primaria de TB-MDR durante los años noventa como la epidemia intrahospitalaria en New York (Frieden y col., 1993) y por el reporte de la transmisión y letalidad de cepas de TB-XDR en poblaciones inmunocomprometidas por

el VIH en Sudáfrica (Gandhi y col., 2006).

Los mecanismos de resistencia a antimicrobianos en MTB tienen su origen en mutaciones cromosómicas aleatorias (Tabla 2) y pueden ser de varios tipos (Ticona y col., 2008):

La resistencia primaria o natural que se puede presentar en cepas aisladas de pacientes que nunca han recibido tratamiento antituberculoso (cepas silvestres que no han estado en contacto con fármacos).

La resistencia secundaria o resistencia adquirida, resultante de la supervivencia de cepas mutantes resistentes, luego de una quimioterapia incorrecta, bien sea por la aplicación de un esquema terapéutico inicial erróneo o por incumplimiento del tratamiento (Seung y col., 2004 citado por Rondón, L., 2010).

La resistencia transmitida/amplificada o la transmisión de cepas resistentes a personas susceptibles produciendo nuevos casos de TB resistente. La transmisión de cepas resistentes depende del grado de patogenicidad del bacilo, si bien puede reducir su potencial reproductivo puede también inducir a mutaciones que restablezcan su capacidad de virulencia (Gillespie, S. H., 2002).

Tabla 2

Mutaciones responsables de la resistencia a drogas antituberculosas (Tricona y col., 2008).

Farmaco	Gen	Mecanismo	Frecuencia
Isoniazida	katG	Codifica para la enzima catalasa-peroxidasa, encargada de transformar la isoniazida en el principio activo, inhibiendo la síntesis del ácido micólico	50-68%
	inhA	Codifica la síntesis de la proteína enoil ACP reductasa, implicada en la producción de ácidos grasos de la micobacteria	21-34%

Rifampicina	rpoB	Codifica para la subunidad β de la RNA polimerasa, a la cual se une la rifampicina, interfiriendo en la síntesis del ácido nucleico en el proceso de replicación bacteriana	96–98%
Pirazinamida	pncA	Codifica para la enzima pirazinaminidasa, la cual transforma la pirazinamida en ácido piracinoico, resultando un pH ácido que parece ser el causante del efecto contra M. Tuberculosis	72–97%
Estreptomycin	rpsL	Codifica para la unidad ribosomal S12, al cual se une la estreptomycin para inhibir la síntesis proteica	64–67%
	rrS	Codifica para el ARNr 16S, al cual se une la estreptomycin para inhibir la síntesis proteica	8–21%
Etambutol	embB	Codifica la síntesis de la enzima arabinosil-transferasa, relacionada con la síntesis de polímeros de arabinosa y galactosa de la pared celular, lo cual incrementa la permeabilidad y la entrada en mayor cantidad de los otros medicamentos	47–65%

El tratamiento alternativo de los casos de TB-MDR puede prolongarse hasta dos años, suponiendo una carga adicional para los pacientes y los sistemas sanitarios. Aquellos casos diagnosticados como TB-MDR deben ser tratados con atención de alta calidad, según lo establecen las Normas Internacionales de Atención de la Tuberculosis (WHO, 2008). En el año 2011 se publicó una actualización de la Guía para el manejo de la TB-MDR, cuya primera edición se efectuó el año 2006. La nueva guía se basa en el trabajo de expertos de la 62a Asamblea Mundial de la Salud (WHA) del año 2009. En el tratamiento de los pacientes

con TB-MDR debe usarse una fluoroquinolona de última generación. Así mismo, se recomienda el uso de la etionamida (o protionamida), y de cuatro drogas antituberculosas de segunda línea para aumentar la eficacia de los esquemas (incluyendo un agente inyectable), así como la pirazinamida que debería ser incluida en la fase intensiva.

Algunos estudios recientes, han generado expectativas en cuanto a nuevos tratamientos para los casos de TB-XDR, que sean más simples y seguros y que permitan controlar la enfermedad. Una de estas alternativas denominada Nix-TB incluye tres antibióticos que no se han combinado antes para tratar la TB: bedaquiline, pretomanida y linezolid. La pretomanida está diseñada para la TB pero aún en fase experimental, la linezolid se usa principalmente para infecciones de la piel y la neumonía. Dicho tratamiento fue ensayado en 34 pacientes con TB-XDR de Sudáfrica. Luego de 6 meses no se logró aislar el bacilo a partir de las muestras cultivadas de esputo, según informó Francesca Conradie durante la Conferencia sobre Retrovirus e Infecciones Oportunistas en Washington en 2017. Las autoridades reguladoras siguen discutiendo para evaluar la aprobación del tratamiento Nix-TB.

EL DIAGNÓSTICO DE LA TB RESISTENTE A FÁRMACOS

La aparición y diseminación de cepas resistentes de MTB representa un riesgo potencial para el control mundial de la TB. La aplicación temprana de un tratamiento eficaz para la TB-MDR y TB-XDR sólo es posible cuando la detección de la resistencia se realiza rápidamente. Los métodos bacteriológicos tradicionales se basan en el aislamiento e identificación de cepas de MTB en medios de cultivo y en casos de riesgo de TB-MDR, las pruebas de sensibilidad a fármacos tales como el método de las proporciones. Este método es considerado el “gold standard” ya que permite detectar una baja carga micobacteriana. Sin embargo, debido al lento crecimiento del bacilo, éstas técnicas requieren una gran cantidad de tiempo para realizar los procedimientos secuenciales establecidos y obtener los resultados. Durante ese tiempo,

el tratamiento aplicado al paciente podría resultar inapropiado, contribuyendo a que aquellas cepas resistentes puedan proliferar, induciendo así la ampli-ficación de la resistencia (WHO, 2016).

El diagnóstico de la TB-MDR y TB-XDR así como el de la TB asociada al VIH, puede ser complejo y costoso. Por eso desde el inicio de los años 90 los expertos han diseñado nuevas técnicas para el diagnóstico de resistencia a fármacos antituberculosos avalados por WHO, que proporcionan resultados rápidos comparados con los métodos antes mencionados. Dichas técnicas incluyen los medios de cultivo líquidos, sistemas automatizados (BACTEC 460, MGIT 960 y VersaTREK), la prueba de susceptibilidad a drogas por observación microscópica (MODS, del inglés, Microscopic Observation Drug Susceptibility) desarrollada en Perú, métodos basados en la amplificación de de los ácidos nucleicos (NAATs, del inglés, Nucleic Acid Amplification Tests), hibridización de ADN y detección de mutaciones (Terán y col., 2015)

Los métodos moleculares basados en la amplifi-cación del ácidos nucleicos mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) resultan más rápidos (24-48 h comparados con el tiempo de detección por métodos convencionales de 1 a 2 meses), y especí-ficos para el diagnóstico de TB-MDR y han sido recomendados desde el año 2008 por la OMS. Estos ensayos consisten en la amplificación de secuencias génicas específicas que incluyen mutaciones asocia-das a resistencia, a partir de muestras positivas o cultivos de MTB seguidas de una prueba de hibridi-zación para detectar si la secuencia amplificada contiene la mutación relacionada con la resistencia. La técnica consiste en el marcaje de los amplicones o productos de la PCR e hibridización con sondas de oligonucleótidos inmovilizados en tiras de nitrocelu-losa. La mutación es detectada por ausencia de unión entre el amplicón y la sonda (baja complementariedad de pares de nucleótidos) (Terán y col., 2015). Entre las pruebas moleculares automatizadas incluyen el ensayo Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, United States) y el ensayo de sondas de línea (LPAs, INNO- LiPA1-Rif.TB assay, Innogenetics Ghent,

Belgium) como es el caso de Genotype MTBDRplus (Hain Lifescience, Nehren, Germany), WHO, 2016.

El uso de la prueba rápida Xpert MTB/RIF® se ha extendido considerablemente desde 2010, cuando la OMS recomendó su empleo por primera vez. La prueba detecta de forma simultánea la TB y la resistencia a la rifampicina, que constituye el fármaco más impor-tante contra esta enfermedad. Este método permite obtener un diagnóstico en el termino de dos horas y está recomendado por la OMS como prueba de diag-nóstico inicial en todas las personas con signos y síntomas de la TB. Más de 100 países han empezado a utilizarlo y se han adquirido a nivel mundial un total de 6,2 millones de cartuchos en el 2015.

Varios hallazgos evidencian la efectividad de la prueba Xpert MTB/RIF. Vallejo y col., 2015, usaron la técnica molecular para detectar MTB en muestras respiratorias y líquido cefalorraquídeo. De los 17 enfermos, cuyas muestras resultaron negativas por BK, pero positivas por cultivo, 15 fueron detectados por Xpert MTB/RIF. De los 351 pacientes con cultivos negativos de las muestras respiratorias, 17 resultaron positivas por Xpert MTB/RIF. Las muestras no respira-torias de 10 pacientes con cultivos positivos, fueron detectadas todas por Xpert MTB/RIF mostrando una alta sensibilidad.

La técnica Xpert MTB/RIF también ha sido usada para para determinar TB en muestras pulmonares de pacientes co-infectados con VIH. En tal sentido, Bansal y col., 2016 analizaron 604 muestras de pacientes VIH positivo, de los cuales 85 fueron identificadas como positivas con Xpert MTB/RIF, resultando sensibles para rifampicina y 6 muestras fueron identificadas como resistentes a rifampicina. Los resultados fueron obtenidos en menos de 2 horas. Los autores resaltan la importancia de estas técnicas rápidas para el diagnós-tico temprano en pacientes infectados con bacilos TB drogo-resistentes, disminuyendo así la diseminación de la enfermedad.

La técnica también ha mostrado utilidad en el diagnóstico de muestras de TB extrapulmonar. Rufai y col., 2017 evaluaron la efectividad de Xpert MTB/RIF para detectar TB en muestras de fluidos ascítico

en pacientes con TB abdominal. Del total de 67 muestras, 17 con cultivos positivos fueron detectados positivos por Xpert MTB/RIF y resultaron sensibles para rifampicina. En los niños es particularmente difícil diagnosticar esta enfermedad y la prueba Xpert MTB/RIF es por ahora el único método generalmente disponible para el diagnóstico de la TB pediátrica.

Otra prueba molecular de interés es la prueba rápida Genotype MTBDRplus (Hain Lifescience, Nehren, Germany), la cual detecta MTB y sus resistencia a rifampicina e isoniacida a partir de muestras de esputo de pacientes con BK positiva, obteniendo resultados en 3 a 5 días. El uso de esta técnica fue aprobada por la OMS para el diagnóstico de TB-MDR, validada e implementada en Perú por el Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias (LRNM) en el año 2010. Además fue incluida en la Norma Técnica Nacional de TB en Perú en el año 2013 como un procedimiento de tamizaje para la detección de TB-MDR, permitiendo cubrir cada vez más la demanda del diagnóstico de TB-MDR del 5 al 60% en 2011 y 2015; respectivamente (Guerra, Z.M., 2016).

El trabajo realizado por Ascencios y col., 2012 evidencia la efectividad de la técnica Genotype MTBDRplus. En este estudio se evaluaron 95 cultivos y 100 muestras de esputos con perfiles de resistencia previamente determinados por el método de proporciones agar en placa (APP). La prueba molecular a partir de cultivos mostró una sensibilidad de 100%; 97,5% y 96,9% para RIF, INH y multidrogoresistente (MDR) respectivamente; mientras que para esputo la sensibilidad fue de 95,7%; 96,8% y 95,2% para RIF, INH y MDR respectivamente. Los autores concluyeron que Genotype MTBDRplus es una herramienta útil para la detección rápida de la resistencia simultánea a INH y RIF (MDR) en un máximo de 72 h a partir de esputo o de cultivo. Así mismo, los autores señalaron que la prueba molecular tiene elevada concordancia frente al método de referencia, además de una gran rapidez (48 h desde la llegada de la muestra al laboratorio) para la detección la resistencia a INH, RIF y a ambas drogas simultáneamente (TB-MDR) a partir de una muestra de esputo BK positiva. Angulo y col., 2014 evaluaron

la técnica de Genotype MTBDRplus en el diagnóstico de TB y de la resistencia a la rifampicina en muestras extrapulmonares (Líquido cefalorraquídeo) con una sensibilidad del 73,2% y especificidad del 100%. Trabajos más recientes fueron llevados a cabo por Llerena y Medina, 2017 quienes mediante la técnica Genotype MTBDRplus detectaron varias mutaciones en el gen *rpoB* de MTB, las cuales confieren resistencia a rifampicina e isoniacida. De los 689 resultados positivos, el 84,3% fueron bacilos sensibles, 8,4% bacilos resistentes y 7,2% bacilos multirresistentes.

Sin embargo, una limitación de los métodos moleculares es la disponibilidad de laboratorios con infraestructura adecuada y personal entrenado para su realización. Se necesita una alta inversión para establecer estas pruebas en un laboratorio aunque el beneficio que se da a la población es valioso. Es por ellos que en Perú se ha desarrollado una prueba fenotípica rápida que diagnostica en 7 días TB en muestras de esputo y simultáneamente detecta la susceptibilidad a rifampicina e isoniacida. La técnica llamada Susceptibilidad a Fármacos mediante Observación Microscópica (Microscopic Observation Drug Susceptibility o MODS) y se emplea para diagnóstico a partir de un cultivo directo de muestras de esputo de pacientes con TB pulmonar que aun no hayan iniciado tratamiento antituberculosis, pacientes nunca tratados, recaídas o abandonos recuperados con frotis positivo o negativo (numero exacto de bacilos ácido alcohol resistente, +, ++ o +++ (Solis y col., 2011). Sus mayores ventajas son la simplicidad de la técnica, la gran sensibilidad del medio y el crecimiento característico de MTB, la evaluación de la susceptibilidad frente a drogas en un corto tiempo y el bajo costo de los reactivos. Un ejemplo de su efectividad es evidenciado con el trabajo de Moore y col. (citado por Ticona y col., 2008), los cuales evaluaron el rendimiento de la técnica MODS para detectar la susceptibilidad de MTB a INH y RMP en muestras de esputo en establecimientos de salud de Lima-Perú. En 334 muestras de esputo con cultivo positivo, la técnica mostró una sensibilidad y especificidad para INH de 84,6% y 99,6 %; respectivamente. Con respecto a la droga

rifampicina, la sensibilidad y especificidad fue del 100%.

La estrategia *Alto a la Tuberculosis* de la OMS, adoptada por la Asamblea Mundial de la Salud en mayo de 2014 ofrece a los países un modelo para poner fin a la epidemia de TB, reduciendo la mortalidad y la incidencia de esta enfermedad y eliminando los costos catastróficos conexos. Este instrumento incluye una serie de metas de impacto a nivel mundial que prevén reducir las muertes por TB en un 90% y los nuevos casos en un 80% entre 2015 y 2030 y evitar los costos debidos a esta enfermedad. Por tal motivo, la OMS desempeña 6 funciones esenciales en la lucha contra la TB (Ticona y col.,2008).

- Asumir el liderazgo mundial en asuntos de importancia decisiva con relación a la TB.
- Elaborar políticas, estrategias y patrones con bases científicas para la prevención, atención y control de la enfermedad, y seguir de cerca su aplicación.
- Prestar apoyo técnico a los Estados Miembros, ser agente catalizador del cambio y crear una capacidad sostenible.
- Vigilar la situación mundial de la TB y cuantificar los progresos realizados en la atención, el control y la financiación.
- Preparar el programa de investigaciones sobre la TB y estimular la producción, la traducción y la divulgación de conocimientos valiosos.
- Facilitar alianzas contra la TB y participar en las reuniones.

CONCLUSIONES

El diagnóstico rápido y la identificación de las cepas TB-MDR y TB-XDR, así como el tratamiento oportuno de los pacientes con estas formas de TB son claves para el control de la enfermedad. Por lo tanto, el desarrollo e implementación de nuevas herramientas para la detección de MTB y su resistencia a las drogas, son requisitos indispensables para la lucha contra la TB a nivel mundial.

Las pruebas de amplificación de los ácidos nucleicos disponibles y certificadas por la OMS para el diagnóstico de TB y su susceptibilidad a rifampicina

son la prueba de Xpert MTB/RIF y Genotype MTBDR/plus ambas por su especificidad, simplicidad técnica y rapidez en la obtención de resultados. Sin embargo, el diagnóstico continúa representando un reto para los sistemas de salud debido a la poca disponibilidad de recursos para el desarrollo de nuevas técnicas y capacitación de personal en países subdesarrollados.

REFERENCIAS

- ANGULO G.B., TREJO M.S., ROSAS A.A., LÓPEZ, A.L., RAMIREZ, F. C., MONZALVO, M.E., HERNANDEZ, E. A. ARUMIR, E. C. (2014). "Evaluación de la prueba GeneXpert MTB/RIF en el diagnóstico rápido de la tuberculosis y de la resistencia a rifampicina en muestras extrapulmonares" *Rev. Latinoam. Patol. Clin. Med. Lab.* 61(3):140-144.
- ARAUJO Z., ACOSTA M., ESCOBAR H., BAÑOS R., DE LARREA C.F., RIVAS-SANTIAGO B., (2008). "Respuesta inmunitaria en tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de *Mycobacterium tuberculosis* en la protección, patología y diagnóstico". *Revisión, 2008. Invest. Clin.* 49 (39): 411-441.
- ASCENSIO L., GALARZA M., QUISPE N., VASQUEZ L., LEO E., VALENCIA E., RAMIREZ J., ACURIO M., SALAZAR R., MENDOZA-TICONA A., CÁCERES, O., (2012). "Prueba molecular Genotype MTBDRplus, una alternativa para la detección rápida de tuberculosis multidrogorresistente". *Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública* 29 (1): 92-98.
- BANSAL D., AVASHIA S.,KAROTHIYA M., (2016). "A study of gene xpert in screening of sputum in HIV positive patients presenting to tertiary care centre". *National Journal of Community Medicine* 7 (8):657-660.
- CORTÉS E.S., (2009). "Descripción de técnicas fenotípicas y moleculares para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* y micobacterias atípicas en el laboratorio clínico". Trabajo de grado presentado para optar al título de Bacterióloga. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia.
- FANLO P., TIBERIO G., (2007). "Tuberculosis extrapulmonar". *An. Sist. Sanit. Navar.* 30 (2): 143-162.
- FRIEDEN T.R., STERLIN T., PABLOS-MENDEZ A., KILBURN J.O., CAUTHEN G.M., DOOLEY S.W., (1993). "The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City". *N. Engl.J. Med.* 328: 521-526.
- GANDHI N.R., MOLL A., STURM A. W., (2006). "Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa". *Lancet* 368: 1575-1580.
- GUERRA Z., (2016). "Prueba de sondas lineal Genotype MTBDRplus para el diagnóstico de tuberculosis multidrogorresistente en Perú". *Bol. Inst. Nac. Salud* 22 (1-3): 16-21.
- GUILLESPIE S. H., (2002). "Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*:clinical and molecular

- perspective". *Antimicrob. Agents Chemother* 46: 267-274.
- LLERENA C., MEDINA R., (2017). "Descripción de las mutaciones de *Mycobacterium tuberculosis* que confieren resistencia a rifampicina e isoniazida detectadas mediante GenoType® MTBDRplus V.2 en Colombia". *Biomédica* 37:28-33.
- PAI M., BEHR A.M., DOWDY D., DHEDA K., DIVANGAHI M., BOEHME C. C., GINSBERG A., SWAMINATHAN S., SPIGELMAN M., GETAHUN H., MENZIES D., RAVIGLIONE M., (2016). "Tuberculosis". *Nature Reviews Disease Primers* 2:1-23
- RONDÓN S. L., (2010). "Evaluación de un método rápido para la detección de resistencia a fármacos de *Mycobacterium tuberculosis* usando un fago reportero de GFP". Trabajo de grado para optar al título de Magíster Scientiarum, mención Microbiología. IVIC
- RUFAI S. B., SINGH S., SINGH A., KUMAR P., SINGH H., VISHAL A., (2017). "Performance of Xpert MTB/RIF on Ascitic Fluid Samples for Detection of Abdominal Tuberculosis" *J Clin Microbiol.* 53(11):3636-8.
- SOLIS L.A., ACURIO U.M., QUISPE T.N., VASQUEZ C.L., (2011). "Susceptibilidad a drogas de *Mycobacterium tuberculosis* mediante observación microscópica (MODS)". Ministerio de Salud: Instituto Nacional de Salud. Lima-Perú. Pgs 7-10.
- TERÁN R., DE WAARD J. H., (2015). "Recientes avances en el diagnóstico de tuberculosis en el laboratorio clínico". *JIFCC* 26(4):310-325.
- TRICONA A. M., GOTUZZO E. H., (2008). "Tuberculosis extremadamente resistente (TB-XDR), historia y situación actual". Artículo de revisión. *Acta Med. Per.* 25 (4): 236-246
- VALLEJO P., RODRIGUEZ J.C., SEARLE A., FARGA V., (2015). "Ensayo Xpert MTB/RIF en el diagnóstico de tuberculosis". *Rev. Chil. Enferm. Respir.* 31:127-131.
- WHO, (2008). "Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis". Disponible en la web: www.who.int/tb/publications/2008/programmatic_guidelines_for_mdrtb/en/index.html
- WHO, (2013). "Definitions and reporting framework for tuberculosis". Revision. Disponible en la web: www.who.int/tb/publications/definitions
- WHO, (2016). "The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to isoniazid and rifampicin" Disponible en la web: <http://www.who.int/tb/publications/molecular-test-resistance/en/22>.
- COHEN J., (2017). "Simpler, safer treatment hailed as 'breakthrough' against drug-resistant TB". Disponible en la web: <http://www.sciencemag.org/news/2017/02/simpler-safer-treatment-hailed-breakthrough-against-drug-resistant-tb>

Tratamiento de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana con Meglumina en pacientes con inmunoterapia previa

Pedro Navarro†^{1,5},
Luis A. Colmenares^{1,5},
Olinda Delgado²,
María A. De La Parte³,
Mariana Rivas²,
Romy Plaza⁴,
Ana Graciela Angulo^{1,5},
Nathalie Chacon Fonseca^{1,5}

¹ Sección de Endemias Rurales.
Instituto de Medicina Tropical. UCV.
lacsuarez@yahoo.com
y anagangulom@gmail.com

² Sección de Inmunoparasitología.
Instituto de Medicina Tropical. UCV
olinda.delgado@gmail.com

³ Cátedra de Microbiología.
Escuela de Enfermería. UCV
mariantonia.delaparte@gmail.com

⁴ Escuela de Medicina "Luis Razetti"

⁵ Cátedra de Medicina Tropical
Escuela Luis Razetti
Facultad de Medicina
natychacon@yahoo.com

RESUMEN

El antimonio de meglumina (AM) y la inmunoterapia (IMTP), son las opciones terapéuticas individuales más utilizadas en los pacientes con leishmaniasis tegumentaria americana (LTA) en nuestro medio. El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia terapéutica del AM en pacientes con LTA e IMTP previa y cicatrización lenta de sus lesiones. Los pacientes se evaluaron en la Sección de Endemias Rurales del Instituto de Medicina Tropical (SER-IMT), entre el 01 de enero del año 2002 y el 31 de octubre del 2010. Se contó con la colaboración de la Sección de Inmunoparasitología del referido instituto (SIP-IMT). Se estudiaron 32 pacientes, todos con la forma cutáneo localizada de la enfermedad: 25 adultos (78%); sexo femenino: 16 pacientes (50%); provenientes del estado Miranda: 29 (90%); con tratamiento ambulatorio: 28 (88%); tratamiento intrahospitalario: 4 (12%). Se suministró apenas una serie de AM a la razón de 3.000 mg/día a 15 pacientes (47%); dos series a la razón de 3.000 mg/día a 15 (47%) y tres series a la razón de 4.500 mg/día a 2 (6%). Los tratamientos a las dosis convencionales fueron exitosos. Sólo se identificó un paciente adulto con recaída (3%) al año de culminarse el tratamiento que fue resuelto ambulatoriamente con dos series adicionales de AM a la razón de 3.000 mg/día. El AM en pacientes con IMTP previa tiende a acelerar la cicatrización de las lesiones. Se deben diseñar otros estudios clínicos que confirmen estos hallazgos.

Palabras Clave: Leishmaniasis tegumentaria americana; antimonio de meglumina; inmunoterapia.

TREATMENT OF AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS WITH MEGLUMINE IN PATIENTS WITH PREVIOUS IMMUNOTHERAPY

ABSTRACT

Meglumineantimoniate (AM) and immunotherapy (IMTP) are the most widely used individual treatment options in patients with American tegumentary leishmaniasis (LTA) in our country. The aim of this study was the evaluation of the therapeutic efficacy of AM in patients with LTA and previous IMTP with slow healing of their lesions. The patients were evaluated at Rural Endemics Section of the Institute of Tropical Medicine (SER-IMT) between January 1, 2002 and October 31, 2010. It was supported by the Immunoparasitology Section (SIP-IMT) of said institute. Thirty-two patients were studied, all with the localized cutaneous form of the disease: 25 adults (78%); female:

16 patients (50%); coming from Miranda state: 29 (90%); outpatient treatment: 28 (88%); intrahospital treatment: 4 (12%). Only one serie of AM with 3.000 mg/d was given to 15 patients (47%); two series with 3.000 mg/d to 15 (47%) and three series with 4.500 mg/d to 2 (6%). Treatments at conventional doses were successful. Only one adult patient with relapse (3%) was identified one year after the treatment, which was resolved on an outpatient basis with two additional series of AM at a rate of 3,000 mg / day. AM in patients with prior IMTP tends to accelerate the healing of lesions. Other clinical studies should be designed to confirm these findings.

Keywords: American tegumentary leishmaniasis; Meglumineantimoniate; immunotherapy.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis tegumentaria americana (LTA), enfermedad infecciosa parasitaria de transmisión metaxénica, fue descrita por primera vez en Venezuela por Juan Manuel Iturbe Bescanza en 1917, destacado médico tropicalista, quien describió la presencia de *Leishmaniabrasiliensis* en el raspado de la úlcera de un paciente con lesión crónica de la piel (Iturbe 1971). Esta endemia del medio rural venezolano ha sido ampliamente estudiada y evaluada por Pifano (Pifano 1949; Pifano 1960; Pifano et al. 1959); Medina y Romero (Medina et al. 1957); Hómez (Hómez 1958); Albornoz (Albornoz 1968); Villalobos (Villalobos et al. 1987); Navarro y Belfort (Navarro et al. 1996; Belfort et al 2003); De Lima, Borges y Convit (De Lima et al. 2010); Navarro y col (Navarro et al. 2009^a; Navarro et al. 2009^b; Navarro et al 2011^a) y Colmenares (Colmenares et al. 2014), entre otros investigadores, que han publicado variados aspectos clínicos, epidemiológicos, diagnósticos y terapéuticos de la enfermedad.

Por más de 60 años el tratamiento de elección de esta zoonosis parasitaria ha sido la administración del antimonio de meglumina (AM) (Hómez 1958). En el Instituto de Medicina Tropical (IMT) de la Universidad Central de Venezuela se recomienda su uso en series terapéuticas de 10 días (Belfort et al. 2003; Navarro et al. 2009^b; Navarro et al. 2011^a; Colmenares 2014).

En la década de los años 80 del siglo pasado, Convit, Rondón, Ulrich y col, publicaron los resultados sobre la IMTP para la LTA variedad cutánea localizada (LCL), desarrollada en el Instituto de Biomedicina de la UCV (IB-UCV) (Colmenares et al. 2014). La IMTP se aplica

por vía intradérmica en las regiones deltoideas en tres dosis cada 6 semanas. La vacuna, de 0,5 ml, contiene 6,4 x 10⁸ promastigotes de *Leishmania* inactivados por autoclave, más bacilos BCG vivos en una dosis de 0,1 mg para pacientes PPD negativos y 0,01 mg para los PPD negativos. También se ha comunicado, que, combinada con quimioterapia con AM, es efectiva para la leishmaniasis cutánea intermedia y la cutánea difusa (Convit et al. 1987; Convit et al. 1996).

La IMTP es una opción terapéutica de esta zoonosis parasitaria. Sin embargo, al IMT acuden pacientes que han recibido IMTP con lesiones ulcerosas, algunas con varios meses de evolución, las cuales no cicatrizan de manera satisfactoria. A ellos se les efectúa un *diagnóstico integral* y se les administra el tratamiento convencional con AM. El *propósito* del artículo es describir los resultados y conclusiones obtenidos con esta experiencia clínica y terapéutica de pacientes con LTA que fueron evaluados en una dependencia ubicada en el Instituto de Medicina Tropical (IMT): la Sección de Endemias Rurales (SER-IMT), la cual contó con el valioso apoyo del diagnóstico de laboratorio efectuado por la Sección de Inmunoparasitología, ubicado también en el mismo instituto (SIP-IMT).

PACIENTES Y MÉTODOS

Todos los pacientes participantes en este estudio recibieron IMTP en otros centros de salud. La escasa mejoría clínica -según su criterio- fue el único motivo de consulta que los motivó para acudir a la SER-IMT entre el 01 de enero del año 2002 y el 31 de octubre del 2010. Todos refirieron que fueron "orientados" por otros afectados por la LTA, sin inmunoterapia previa, cuyo tratamiento en la SER-IMT fue exitoso.

Los pacientes con LTA fueron evaluados inicialmente por el equipo de salud integrado por médicos y estudiantes en la SER-IMT. Aún cuando ellos fueron diagnosticados con LTA, muy pocos presentaron los informes médicos y/o exámenes de laboratorio necesarios que corroborasen el diagnóstico.

En este sentido, a todos se les practicó una evaluación desde el punto de vista clínico y epidemiológico para la *presunción diagnóstica*. Esto es, se

evaluaron sus lesiones ulcerosas y se les interrogó sobre área de proveniencia, su trabajo, o si viajaron a zonas endémicas, de acuerdo al formato de historia clínica utilizado en la SER-IMT. Ambas indagaciones tenían que ser positivas para continuar al próximo paso, la realización de pruebas especializadas en la SIP-IMT, para efectuar entonces, el *diagnóstico de laboratorio* (Navarro et al. 2004; Pifano 1961; Navarro et al. 2011b; Abdul-Hadi et al. 2012)

Así, los pacientes fueron referidos en la SIP-IMT para dicho diagnóstico. Aquí se les determinó los anticuerpos antileishmania en sangre por el método de inmunofluorescencia indirecta (IFI), la prueba intradérmica de la leishmanina (IDR) y la determinación de amastigotes en frotis por escarificación de segmentos de piel de las úlceras en estudio coloreados con Giemsa. Este último se hizo con el fin de obtener el *diagnóstico de certeza* al visualizarse los amastigotes del parásito (Reyes Romero et al. 2015).

Una vez realizados los procedimientos inherentes al diagnóstico presuntivo al diagnóstico de laboratorio ya referidos, se efectuó el *diagnóstico integral* de LTA (clínica + epidemiología + laboratorio) que recomienda la CMT para las enfermedades tropicales en general y para la LTA en particular (Navarro et al. 2004; Pifano 1961; Navarro et al. 2011b; Abdul-Hadi et al. 2012).

Los pacientes con el diagnóstico integral de LTA, entonces, fueron tratados. Aquí es importante destacar el lugar y la importancia que los exámenes generales de laboratorio, en su abordaje y tratamiento. Por ejemplo, a los mayores de 40 años se les solicitó una evaluación cardiovascular previa a la administración del antimonial. Dicha solicitud a este grupo etéreo responde a su mayor prevalencia de enfermedades tales como hipertensión arterial sistémica u otras condiciones que pueden comprometer su salud por efectos del tratamiento antiparasitario.

A todos ellos, antes, durante y al finalizar el tratamiento, se les solicitó una hematología completa y pruebas de química sanguínea tales como la glicemia y las de funcionalismo hepático y renal así como exámenes simples de heces y orina (Navarro et al.

2009b). Esto se realizó tanto con los fines de detectar cualquier alteración de laboratorio que cursase “asintomática” y que contraindicase el inicio del tratamiento, como por ejemplo un aumento patológico de las transaminasas, o bien, para la detección precoz de los efectos secundarios del AM, una vez instituido el tratamiento.

El manejo terapéutico de los pacientes dependió del tipo de úlceras presentes al momento de la evaluación clínica, esto es si se consideraron como complicadas o no complicadas (Navarro et al. 2009b).

Todos aquellos con úlceras complicadas, es decir, que cumplan con alguna de las siguientes características:

- Lesiones extensas, sangrantes y dolorosas.
- Lesiones en miembros inferiores.
- más de 3 lesiones.
- presentes en pacientes menores de 12 años.
- presentes en pacientes mayores de 65 años.

Todas las lesiones complicadas fueron hospitalizadas (Navarro et al. 2011a). Se les refirió para su hospitalización en los Servicios de Enfermedades Infecciosas del Adulto o al Servicio de Pediatría Médica Infecciosa, ubicados en el Hospital Universitario de Caracas (HUC) dependiendo del caso.

Todos aquellos con úlceras no complicadas, esto es, si carecían de las características mencionadas para las úlceras complicadas, fueron tratados de manera ambulatoria y supervisada cada semana por la SER-IMT.

El tratamiento antiparasitario específico con AM fue indicado de acuerdo a la clasificación de las lesiones.

En este sentido, a los pacientes con criterio de tratamiento ambulatorio se les indicó una serie de AM a la dosis de 3.000 mg diarios por vía intramuscular profunda (glúteos) suministrados de la siguiente manera: 1 ampolla en cada glúteo, siempre a la misma hora de la mañana por 10 días consecutivos. Luego de 10 días de “descanso”, es decir, sin recibir el AM, fueron reevaluados clínicamente. Si las lesiones aún persistían entonces se les repetía otra serie igual a la primera. De manera excepcional se suministraron tres

series. En todos los casos se monitorizaron los efectos secundarios a través de los exámenes de laboratorio generales antes mencionados.

A quienes tenían criterio de hospitalización, el tratamiento fue indicado por el servicio tratante siguiendo las pautas comunicadas en la literatura especializada (Navarro et al. 2009b; Colmenares et al. 2014). A los adultos, se les suministró una serie de AM a la dosis de 3.000 o 4.500 mg diarios y a los niños, 70 mg/kg/día (Navarro et al. 2009d; Navarro et al. 2011d). La duración de la serie así como el “descanso” y la decisión de suministrar una segunda o tercera serie, se efectuó a semejanza de lo expuesto en los pacientes bajo tratamiento ambulatorio. Al terminar la primera serie, ellos fueron egresados y durante su “descanso” el paciente estuvo incorporado a sus labores habituales.

A los pacientes con infección bacteriana sobregregada de sus lesiones ulcerosas fueron tratados de distinta manera según fuese el caso.

Si dicha infección se asentó en lesiones leishmánicas complicadas, éstos recibieron tratamiento antibacteriano según el criterio del servicio tratante. Si se asentó en lesiones leishmánicas no complicadas, entonces recibieron tratamiento antibacteriano con cefadroxilo por vía oral, de manera ambulatoria y a las dosis convencionales para las infecciones de la piel según se tratase de adultos o niños (Navarro et al. 2009c).

El criterio de curación clínica estuvo dado por la cicatrización de las lesiones al término de la primera serie. Si aún para este momento ésta no era satisfactoria, se indicó una segunda serie de AM. Y si al término de la segunda serie, la cicatrización no era satisfactoria, entonces se comenzó una tercera serie.

Luego de culminar el tratamiento completo, todos los pacientes fueron reevaluados al mes y a los 6 meses. Si en este momento, la cicatrización no presentó cambios, entonces fueron egresados de la consulta con controles anuales. No obstante, se les enseñó cómo identificar las recaídas de las lesiones: presencia de nódulos alrededor de la cicatriz anterior; reactivación inflamatoria de la lesión ya

cicatrizada; presencia de lesiones o molestias en las zonas mucosas de cabeza y cuello. En estos casos, se les instruyó que deben acudir a la consulta para indicar el tratamiento correspondiente, incluso antes del control anual. Durante todo el proceso, se le hizo un seguimiento fotográfico a pacientes seleccionados (Navarro et al. 2011d).

RESULTADOS

Las características demográficas y clínicas las especificaremos a continuación. La distribución por sexo fue de 16 femeninas (50%) y 16 masculinos (50%). Se consideró que hasta los 12 años el paciente era pediátrico; de 13 años o más, adulto, coincidiendo con los criterios del HUC. De los 32 pacientes, 25 fueron adultos (78%) y 7, niños (22%). La edad promedio calculada fue de 29 años. Además, 29 (90%) provenían del estado Miranda. Como antecedente epidemiológico, se encontró que 28 (88%) residían en zonas endémicas y 4 (12%) la adquirieron a modo de enfermedad del viajero. En cuanto al manejo clínico, 28 (88%) recibieron tratamiento ambulatorio y 4 fueron hospitalizados (13%).

Es importante puntualizar dos detalles clínicos de esta investigación. Por una parte, sólo 8 pacientes (25%) finalizaron el esquema de inmunoterapia, todos adultos. Por la otra, 16 (50%) presentaron una lesión ulcerosa; 7 (22%) dos; 4 (13%) tres; 5 (16%) cuatro. Todos presentaron su (s) úlcera (s) en sólo una región del cuerpo: 23 en los miembros superiores (72%); 6 en los miembros superiores (19%); 2 en la espalda (6%) y 1 en la cara (3%). Ninguna lesión leishmánica superó los 6 cm de diámetro.

Al especificar el tipo de población que recibió el tratamiento, obtuvimos los siguientes resultados: a) una serie a razón de 3.000 mg/día de AM a 15 pacientes (48%): 14 adultos (93%) bajo tratamiento ambulatorio y 1 niño (7%) que fue hospitalizado; dos series a razón de 3.000 mg/día a 15: 9 adultos (60%) todos ambulatorios y 6 niños (40%) incluyéndose uno hospitalizado; tres series a razón de 4.500 mg/día a dos pacientes (13%), quienes fueron hospitalizados.

Todos los pacientes respondieron de manera

adecuada a la dosis indicada y fueron egresados a los seis meses por curación clínica de sus lesiones. Sólo se identificó una recaída (3%) al año de culminarse el tratamiento que fue resuelto con dos series de AM a la razón de 3.000 mg/día. Hasta la fecha, es la única recaída registrada de esta serie. Tal como puede observarse, predominó ampliamente el tratamiento ambulatorio y no fue necesaria la aplicación de la dosis máxima de AM: 6.000 mg/día.

En lo referente a los efectos secundarios del tratamiento indicado, 8 pacientes (25%) refirieron mialgias y artralgias de moderada intensidad que cedieron con analgésicos comunes y 4 presentaron hematuria microscópica (13%). No se identificó ninguna complicación durante el suministro de la primera serie. En quienes se identificaron dichos efectos, todos ocurrieron al finalizar la segunda serie y durante los 10 días de “descanso” éstos desaparecieron.

DISCUSIÓN

La IMTP es una opción para el tratamiento de los pacientes que padecen LTA. No obstante, en ocasiones la cicatrización de las lesiones es lenta e incluso puede prolongarse por varios meses. Algunos de ellos acuden al Instituto de Medicina Tropical en la búsqueda de una solución a este problema. En la SER-IMT se les indica AM a las dosis que el grupo ha publicado en la literatura. En estos casos, la cicatrización de las lesiones es más rápida respecto a quienes nunca han recibido la IMTP.

La IMTP aplicada por el grupo de investigadores del Instituto de Biomedicina (IB-UCV), consiste en una vacuna combinada de dos antígenos: BCG más promastigotes de *Leishmania*. Dicha inmunoterapia estimula la respuesta Th1 (demostrado por una reacción positiva a la prueba dérmica de Montenegro y a la proliferación celular y la producción de IFN-gamma in vitro, con poca respuesta de anticuerpos) (Tapia et al. 1998). Las células dendríticas, como células presentadoras de antígenos son las responsables de activar, inducir y mantener la respuesta del sistema inmunitario en la piel o generar tolerancia (Motta et al. 2016).

La reactivación o no curación de las lesiones de LCL con la IMTP, podría ser explicado por varios factores multicausales, como la edad del paciente y la no presencia de un sistema inmunológico competente, en menores de 5 o mayores de 65 años, los hábitos tabáquicos importantes y su efecto sobre la piel, la presencia de desnutrición, la infección secundaria, lesiones múltiples y el uso de sustancias irritantes culturalmente recomendadas (Carrero et al. 2011). También, es lógico plantearse la hipótesis de que la inmunoterapia no fue efectiva en eliminar al parásito y podría determinar la reaparición de nuevas lesiones años posteriores a la aplicación de la IMTP, cuando las condiciones inmunológicas del paciente sean distintas. Dicha situación ha sido observada en la Sección de Endemias Rurales, casi 20 años después (comunicación personal Dres. Ana Angulo, Pedro Navarro y Nathalie Chacón).

La respuesta efectiva al tratamiento con AM posterior a la inmunoterapia ha sido referenciada por otros grupos de investigadores. Una de las grandes *ventajas* de usar inmunoterapia previa a la terapia con AM, podría ser la reducción de la dosis y la duración de la terapéutica, disminuyendo considerablemente las probabilidades de efectos adversos (Mayrink et al. 2006).

No se encontraron publicaciones de series de pacientes similares a ésta y bajo tratamiento con la inmunoterapia según la preparación y aplicación que hace el IB-UCV. Por esta razón, no se pudo contrastar los resultados de esta investigación. Un hallazgo digno de destacarse es que la mitad de ellos se curaron clínicamente con apenas una serie de tratamiento con AM. Esto ocurrió en contraste con la experiencia global del grupo en la cual se hace necesaria la administración de dos series de 3.000 mg/día hasta en más del 80% de los pacientes adultos con LTA pero sin IMTP previa (Navarro et al. 2009^a; Navarro et al. 2009^b; Navarro et al. 2011^a; Colmenares et al. 2014). Este hallazgo debe ser confirmado por otros estudios similares a éste.

En este orden de ideas, sería conveniente el diseño de estudios clínicos multicéntricos, a gran escala, con

su respectivo aval bioético, que evalúen la eficacia terapéutica del AM en pacientes con IMTP previa. Así, se podría acortar el número de días para ambas alternativas terapéuticas y los pacientes pudieran verse beneficiados por ello. Ésta es una tarea pendiente una vez que se supere la aguda escasez de medicamentos que se está atravesando nuestro país en la actualidad (Gutiérrez 2016).

A pesar de estas dificultades, la SER-IMT -antes conocida como Consulta de Endemias Rurales, fundada en 1940 por Félix Pifano (Navarro 2015), continua en su labor de atención integral al paciente consultante. Su recorrido ha sido largo y fecundo desde entonces. Al comienzo, ésta no tuvo una sede fija. No obstante, al terminarse de construir en 1956 el IMT, Pifano se establece aquí de manera definitiva (Navas 2000), incluso la Consulta antes referida. En cualquier caso, todo el personal que se ha desempeñado en su seno, ha desplegado actividades asistenciales, docentes, investigativas e incluso de extensión universitaria que han resonado en el devenir histórico del IMT y la UCV.

REFERENCIAS

- ABDUL-HADI S., NAVARRO P., FILGUEIRA I., MARTÍN A., SILVA M., (2012). "Leishmaniasis visceral. Diagnóstico y tratamiento en pacientes atendidos en Medicina Tropical y el Hospital Universitario de Caracas". *Informe Médico*; 14: 61-68.
- ALBORNOZ R., VÁSQUEZ, L., ROSARIO P., (1968). "Estudio de un brote epidémico de Leishmaniasis tegumentaria americana en el Municipio Choroni, estado Aragua". *Dermatol Venez*; 7: 659-670.
- BELFORT E., BOTTO C., (2003). "Leishmaniasis tegumentaria americana". *Universidad Central de Venezuela Facultad de Medicina (Escuela "Luis Razetti"). Cátedra de Medicina Tropical. Tomo III. Pág: 39-52. Caracas.*
- CARRERO RANGEL JA, BORGES RH, CONVIT GARCIA J, AVILAN ROVIRA J, DE LIMA H. (2011) *Inmunoterapia de la leishmaniasis cutánea: factores que influyen su efectividad*; *Bol Mal y Sal Ambient*; 51:25-33.
- CASTÉS M, TAPIA FJ. (1998) *Immunopathology of American tegumentary leishmaniasis*; 49:42-56.
- COLMENARES L., NAVARRO P., DE LA PARTE MA., RIVAS MA., CHACÓN N., ROSAS J., DELGADO O., ANGULO A., (2014). "Leishmaniasis Tegumentaria Americana: tratamiento ambulatorio con meglumina a la dosis de 3.000 mg diarios". *Revista de la Facultad de Medicina*; 37 (1):25-32.
- CONVIT J., RONDÓN A., URLICH M., CASTELLANOS P L., CASTES M., (1987). "Immunotherapy versus Chemotherapy in Localized Cutaneous Leishmaniasis". *Lancet*; I (8530): 401-405.
- CONVIT J., ULRICH M., CASTELLANOS PL., PINARDI ME., LIMA H., (1996). "Desarrollo de la inmunoterapia contra la leishmaniasis cutánea localizada en el Instituto de Biomedicina". *GacMéd Car*; 104:232-246.
- DE LIMA H., BORGES R., ESCOVAR J., CONVIT J., (2010). "Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela: un análisis clínico-epidemiológico a nivel nacional y por entidad federal, 1988-2007". *Bol. Mal. Salud Amb. L:283-299.*
- GUTIÉRREZ A., (2016). "Leishmaniasis: falta de medicamentos es una verdadera tragedia nacional". *Revista Zeta* 2053: 12-13.
- HÓMEZ J., (1958). "Leishmaniasis tegumentarias: estudio sobre 61 casos, especialmente en el Estado Zulia, Venezuela: Tratamiento con Glucantime". *RevSocMed - Quirúrg del Zulia; edición especial: 13-18*
- ITURBE J., (1917). "Primer caso de leishmaniasis cutánea en Venezuela". *GacMéd Car*; 24: 20-21.
- MAYRINK W, DE CARVALHO BOTELHO A, ARAÚJO MAGALHÃES P et al. (2006) *Immunotherapy, Immunochemotherapy and Chemotherapy for American Cutaneous Leishmaniasis Treatment*; *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*; 39:14-21.
- MEDINA R., ROMERO J., (1957). "Estudio sobre la Leishmaniasis tegumentaria americana en Venezuela". *Dermatol-Venez*; 1:30-86.
- MOTTA JM, RUMJANEK VM. (2006) *Sensitivity of Dendritic Cells to Microenvironment Signals*; 2016: 4753607.
- NAVARRO P., BELFORT E, MARTÍN A., DELGADO O., (1996): "Vigencia del N-Metilglucamine en el tratamiento de la Leishmaniasis en los niños". *Bol VenezInfectol*; 6:53-55.
- NAVARRO P., BELFORT E., MARTÍN A., GARCIA J., GARRIDO E., DELGADO O., CORASPE V., (2004). "Evaluación terapéutica del antimonio de meglumina en niños con leishmaniasis tegumentaria americana". *ArchVenezPuer Pediatr*;67: 63-66.
- NAVARRO P., CHACÓN N., SILVA S., COLMENARES L A., ROJAS O., DE LA PARTE M A., CORASPE V., RIVAS M., SILVA M., (2011d). "Leishmaniasis tegumentaria americana: el seguimiento fotográfico en la evolución clínica del tratamiento con meglumina". *XVII Jornadas Nacionales de Infectología. Isla de Margarita. Bol VenezInfectol*; 22: 83-84.
- NAVARRO P., COLMENARES L A., ROSALES R., POSTALIAN A., CORASPE V., SILVA S., (2009a). "Tratamiento de Leishmaniasis tegumentaria con meglumina". *Informed*; 11: 73-78.
- NAVARRO P., COLMENARES LA., CHACÓN N., MARTÍN A., MONTERO R., GARRIDO E., MENDOZA I., CORASPE V., (2011b). "El diagnóstico presuntivo en enfermedades infecciosas parasitarias: casos clínicos". *Informed* 1;13:13-21.
- NAVARRO P., CORASPE V., COLMENARES L A., DELGADO O., SILVA S., MIQUILARENO M., DE LA PARTE M., CHACÓN

- N., (2011a). "Leishmaniasis tegumentaria americana en miembros inferiores. Diagnóstico y terapéutica". *Informe Médico*; 13: 355-360.
- NAVARRO P, MARTÍN A., DE LA PARTE M A., GARRIDO E., ROBLES F, SILVA S., DELGADO O., COLMENARES L A., RAMOS L., QUIJARQUE S., CORASPE V., (2011c). "Meglumina en series terapéuticas de 10 días en niños con Leishmaniasis tegumentaria americana". *RevFacMed Caracas*; 34: 54-59.
- NAVARRO P, RIERA J, CARVAJAL A., SILVA S., COLMENARES L A., RÍOS H., (2009) "Leishmaniasis ¿Cuándo hospitalizar?". *Kasmera*; 37: 117-130.
- NAVARRO P, SILVA S., DE LA PARTE M A., COLMENARES L A., CORASPE V., GARRIDO E., REDONDO M C.,(2009). "Utilidad del cefadroxilo en Leishmaniasis tegumentaria americana con infecciones piógenas sobreagregadas". *Kasmera*; 37: 131-139.
- NAVARRO P, SILVA S., RAMÍREZ O., RODRÍGUEZ MI., QUIJADA S., RAMÍREZ O., CORASPE V., ANDRADE E., DELGADO O., DE LA PARTE MA., (2009b). "Leishmaniasis tegumentaria americana: efectividad del antimoniato de meglumina en series terapéuticas de 10 días" *RevFacMed Caracas*; 32:101-106.
- NAVARRO P., (2015). "Se propaga la leishmaniasis". Disponible en: <http://www.larazon.net/2015/04/pedro-navarro-se-propaga-la-leishmaniasis/1434617013476999/>. Consultado el 14/01/2017.
- NAVAS G., (2.000). "Félix Pifano". *Vitae Academia Biomédica*. <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=60&n=1921&m=3&e=2010>. Consultado el 17/04/2017.
- PIFANO F, ALVAREZ A., NOGERT C., SCORZA JV.,(1959). "Comprobación del *Plebotomus panamensis* como transmisor de la leishmaniasis tegumentaria americana en Venezuela". *Gac Méd Car*; 67:229-235.
- PIFANO F., (1949). "La Leishmaniasis tegumentaria en Venezuela". *ArchVenezMedTropParasitolMed*; 1: 170-182.
- PIFANO F., (1960). "Aspectos epidemiológicos de la Leishmaniasis tegumentaria americana en la región neotropical con especial referencia a Venezuela". *ArchVenezMedTropParasitolMed*; 3: 31-61.
- PIFANO F., (1961). "La enseñanza de Medicina Tropical en la Facultad de Medicina". *ArchVenezMedTropParasitolMed*; 4: 126-140.
- REYES ROMERO H., NAVARRO ROJAS P, RUIZ MONTUFAR., SEMIDEY CHÁVEZ B., (2015) "Leishmaniasis tegumentaria americana". En: H. Reyes, P. Navarro, H Reyes. *Medicina Tropical e Infecciones del Viajero Segunda reimpresión*. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Pág. 441-461. Caracas.
- VILLALOBOS G., VARGAS DE CAMINO N., FLORES DE DURÁN T., DÍAZ ANCIANI I., (1987) "Leishmaniasis tegumentaria americana: Aspectos clínicos, parasitológicos e inmunoalérgicos en Zipayare, edo. Zulia". *Kasmera*; 15: 147-165.

Clonación, expresión y purificación de una proteína MASP de *Trypanosomacruzi*

Alí Agudelo¹,
Marielys Laurens²,
Belkisyolé Alarcón de Noya³,
Teresa Abate⁴

¹ Universidad Central de Venezuela,
Facultad de Ciencias, Escuela de Biología.
agudelo.ali@gmail.com

² Universidad Simón Bolívar,
División de Ciencias Biológicas,
Departamento de Biología Celular.
marielyslaurens@gmail.com

³ Universidad Central de Venezuela,
Facultad de Medicina, Instituto de Medicina
Tropical, Sección de Inmunología.
belkisuole@gmail.com

⁴ Universidad Central de Venezuela,
Instituto de Medicina Tropical,
Sección de Biología Molecular.
teresabate@gmail.com

RESUMEN

El proyecto genoma de *Trypanosomacruzi* reveló la existencia de la segunda familia más grande de genes de este parásito causante de la enfermedad de Chagas: la familia MASP. Las proteínas MASP son antigénicas por lo que nos propusimos expresar y purificar una proteína MASP recombinante para una posterior caracterización inmunológica con sueros chagásicos venezolanos. Con este fin se realizó un despistaje inmunológico con sueros de pacientes chagásicos venezolanos, de una genoteca de genes MASP construida mediante amplificación por PCR con cebadores específicos de las regiones 5' y 3' conservadas y subsecuente clonación en el vector de expresión pT7-MAT-2, que contiene una etiqueta de histidinas. Luego de despistajes primario y secundario se seleccionó el clon CM82 que mostró un inserto completo de 400 pb. Se indujo la expresión de la proteína CM82 a partir de un cultivo de bacterias *E. coli* incubadas con IPTG durante 4 horas y se purificó la proteína recombinante por cromatografía de afinidad a metal inmovilizado. La electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, reveló una proteína purificada de aproximadamente 28 kDa. El ensayo de DOT-ELISA, usando una mezcla de suero de pacientes chagásicos, permitió verificar su antigenicidad.

Palabras clave: MASP; *Trypanosomacruzi*; *Trypanosomarangeli*; antígeno recombinante; Chagas; purificación

CLONING, EXPRESSION AND PURIFICATION OF A MASP PROTEIN FROM *TRYPANOSOMA CRUZI*

ABSTRACT

The genome project of *Trypanosoma cruzi* revealed the existence of the second largest family of genes of this parasite that causes Chagas disease: the MASP family. The MASP proteins are antigenic, so we proposed to express and purify a recombinant MASP protein for subsequent immunological characterization with venezuelanchagasic sera. To this end, immunological screening with sera from venezuelanchagasic patients was performed from a MASP gene library constructed by PCR amplification with specific primers from the conserved 5' and 3' regions and subsequent cloning into the expression vector pT7-MAT-2, which contains a histidine tag. After primary and secondary screenings clone CM82 was selected which showed a complete 400 bp insert. Expression of the CM82 protein was induced from a culture of *E. coli* bacteria incubated with

IPTG for 4 hours and the recombinant protein was purified by immobilized metal affinity chromatography. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis revealed a purified protein of approximately 28 kDa. The DOT-ELISA assay, using a serum pool of chagasic patients, allowed to verify its antigenicity.

Keywords: MASP, *Trypanosomacruzi*; *Trypanosomarangeli*; recombinant antigen; Chagas; purification

INTRODUCCIÓN

Trypanosomacruzi, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas posee un genoma con un 50% de secuencias repetidas, las cuales están organizadas en grandes familias de genes de proteínas de superficie, retrotransposones y repeticiones subteloméricas.

Las proteínas de superficie asociadas a mucinas, llamadas MASP por sus siglas en inglés, constituyen la segunda familia más grande de este parásito. Fueron inicialmente descritas a raíz de la secuenciación del genoma de *T. cruzi* en 2005 (El-Sayed et al. 2005), siendo por primera vez demostrada su transcripción en *T. cruzi* por Abate et al. ese mismo año (Abate et al. 2005).

La familia MASP está caracterizada por dominios altamente conservados en los extremos N y C - terminales y una región central variable. Compone al menos el 6% del genoma diploide de *T. cruzi* y debe su nombre al hecho de estar ubicada entre los genes que codifican para las trans-sialidasas y mucinas. En concreto, aguas abajo de los miembros de TcMUC II con los cuales se asemejan en estructura no así en secuencia (El-Sayed et al. 2005).

Las proteínas MASP se expresan preferencialmente en tripomastigotes. Poseen sitios para la N y O-glicosilación, sufriendo extensas modificaciones postraduccionales (Atwood y et al. 2005). Estas proteínas se han asociado a la virulencia del parásito, participando en procesos de evasión del sistema inmune e invasión celular (De Pablos et al. 2016). Algunas proteínas MASP se secretan, ya sea individualmente o mediante exovesículas, mientras que otras permanecen unidas a la membrana del parásito. La expresión de una determinada MASP está limitada a un grupo de la población total de parásitos (Bartholomeu et al. 2009). Se ha confirmado la existencia

de una respuesta inmune humoral en el suero de pacientes chagásicos hacia el segmento conservado C-terminal de los miembros de la familia MASP (De Pablos et al. 2016) quienes determinaron que la secuencia DGSTAV es el epítoto más inmunogénico de la región C-terminal.

El diagnóstico inmunológico de la enfermedad de Chagas se realiza usando principalmente la técnica de ELISA (Luquetti et al. 2010). Esta técnica ha demostrado una alta especificidad y sensibilidad, dependiendo del antígeno que se use, entre los cuales están proteínas recombinantes y extractos del parásito crudos o semipurificados (Duarte et al. 2014). Sin embargo, aún no existe un antígeno que haya sido aceptado como reactivo de referencia para un diagnóstico unificado, debido en parte al diferente desempeño que demuestran entre los diversos estudios reportados. En este contexto, el presente trabajo reporta la clonación, expresión y purificación de una proteína MASP recombinante como método que podría conducir a la producción de un antígeno útil para ser evaluado en el diagnóstico inmunológico de la enfermedad de Chagas.

METODOLOGÍA

Cepa bacteriana

La cepa de *Escherichiacoli* empleada para el clonamiento y la expresión fue BL21(DE3), cuyo genotipo es *huA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7gene1) i21 Δnin5* (Studier y Moffat, 1986).

Parásitos

Los epimastigotes de la cepa EP de *Trypanosoma cruzi* (un aislado humano venezolano) se cultivaron en medio LIT a 28°C (Camargo 1964). Para el control positivo en los ensayos inmunológicos se utilizó como antígeno un extracto crudo de epimastigotes de esta cepa (Maekelt y Colmenares De Alayón 1960) deslipidado y liofilizado para almacenamiento a -20°C (Díaz-Bello et al. 2008), con una concentración de 1

mg/mL luego de su reconstitución en agua destilada.

Sueros

Para los ensayos inmunológicos se utilizó una mezcla de sueros de pacientes con enfermedad de Chagas (n = 16) diagnosticados por un ensayo de ELISA con extracto crudo antigénico de epimastigotes de *T. cruzi* (Maekelt y Colmenares De Alayón 1960) y por hemaglutinación indirecta. Como control negativo se usó una mezcla de sueros de individuos sanos (n = 20) confirmados como negativos por los dos ensayos serológicos ya mencionados.

Todos los sueros provienen de la Sección de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Para la utilización de estos sueros se contó con el consentimiento previa información de los pacientes e individuos sanos y con el aval de la Comisión de Bioética del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad Central de Venezuela.

Construcción de la genoteca de familia de genes MASP

La genoteca se construyó mediante amplificación por PCR de la familia de genes MASP usando ADN genómico de epimastigotes de la cepa EP de *T. cruzi* purificado con DNAZOL (Thermo Fisher Scientific, USA), de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial.

Para la PCR se diseñaron los cebadores FXhoI (5' - CGCGGCCTCGAGATGGCGATGATGATGACG - 3') y RBgIII (5' - GATCTAGAAGATCTTTTCG

CGGCCACCACCGC-3') específicos de las regiones 5' y 3' conservadas, comunes a todos los miembros de la familia de genes MASP. Estos cebadores contienen los sitios de restricción *XhoI* y *BglIII*, que permitieron la inserción de los productos de amplificación en el vector de expresión pT7-MAT-2 (SIGMA, USA) que contiene una etiqueta de histidina. La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl que contenía MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 200 µM, *GoTaq Hot Start Polymerase* (Promega, USA) 0,5 U, cebador FXhoI 0,2 µM, cebador RBgIII 0,2 µM, tampón 1X. Las condiciones

de ciclado fueron: desnaturalización a 95°C durante 1 min, 30 ciclos de 95°C por 1 min, 60°C por 1 min, 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 5 min. Los productos de amplificación (genes MASP), así como el vector pT7-MAT-2 se digirieron con las enzimas de restricción *XhoI* y *BglIII* (Promega, USA) de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial. Una vez digeridos se purificaron con el estuche *PureLink™ PCR Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA) siguiendo las instrucciones de la casa comercial y se cuantificó por espectrofotometría en un espectrofotómetro *SmartSpect 3000* de BIO-RAD. A continuación, se realizó la ligación inserto-vector con el estuche *Ligase T4 Rapid DNA Ligation Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA), siguiendo sus instrucciones y con esta mezcla de ligación se transformaron bacterias *E. coli* BL21 competentes (Ausubel et al. 2003). Las bacterias transformantes, que constituyen la genoteca de genes MASP, se seleccionaron por crecimiento en medio selectivo con ampicilina, marcador de resistencia del vector pT7-MAT-2.

Despistaje inmunológico de la genoteca

A partir de las placas de LB - agar con las colonias transformantes de la genoteca se hicieron réplicas en membrana de nitrocelulosa que fueron colocadas en nuevas placas de LB - agar suplementado con IPTG 0,5 mM e incubadas durante 4 horas a 37°C. Las colonias crecidas se lisaron colocando la membrana de nitrocelulosa en una atmósfera saturada de cloroformo durante 10 min e incubándolas a continuación en una solución de lisis (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM pH 8,0, lisozima 200 ng/mL) durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas 2 veces por 10 min cada vez en TBST (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween 20 0,5%) y se transfirieron a una solución de bloqueo (leche descremada 5% en TBST) a 4°C durante la noche. Las membranas se incubaron en 10 ml de una mezcla de sueros de pacientes chagásicos diluidos 1:250 que contenía 500 µl de lisado de *E. coli* BL21, durante 1 h a temperatura ambiente. Se hicieron 4 lavados de 15 min en TBST y se incubaron 1 h con anti-IgG humana de cabra

conjugada con peroxidasa de rábano picante (Thermo Fisher Scientific, USA). Luego se realizaron 4 lavados en TBST y 1 en TBS, para entonces incubar con la solución de sustrato quimioluminiscente (*SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate*, Pierce, USA) y detectar la señal en un *Chemidoc Imagen System* (BIO-RAD, USA).

A las colonias que resultaron positivas se les realizó un despistaje inmunológico secundario siguiendo el mismo procedimiento.

Inducción y purificación de la expresión de la proteína recombinante

Una de las colonias positivas en el despistaje inmunológico, que denominamos CM82, se cultivó en caldo LB suplementado con ampicilina durante la noche a 37°C, para inocular al día siguiente 250 ml de LB hasta alcanzar una DO₆₀₀= 0,6 U. En ese momento se añadió IPTG 0,5 mM para inducir la expresión durante 4 h a 37°C. Luego de una centrifugación a 3000 x g, por 10 min a 4°C, se resuspendió el sedimento en 10 ml de solución de lisis del estuche *QiaEXPRESS Ni-NTA* (Qiagen, Alemania) y se purificó la proteína recombinante a partir de la fracción soluble del lisado bacteriano por cromatografía de afinidad a metal inmovilizado siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se analizó un volumen de 5 µl de cada fracción de la purificación en un gel de poliacrilamida-SDS al 17% (Laemmli 1970). La cuantificación de proteínas se hizo siguiendo el protocolo descrito por Bradford (1976).

Ensayo de dot-blot

Se aplicaron 1, 5 y 10 µl del eluato con la proteína recombinante CM82 purificada, así como de los eluatos provenientes de cultivos de bacterias con el plásmido pT7-MAT-2 sin inserto (usado como control negativo), a una membrana de nitrocelulosa que fue entonces procesada para la detección inmunológica con mezcla de sueros de pacientes chagásicos tal como se describió para el despistaje inmunológico de la genoteca.

RESULTADOS

La clonación de un gen de la familia MASP de *T. cruzi* codificante de una proteína con actividad antigénica se llevó a cabo mediante el despistaje inmunológico con sueros de pacientes chagásicos, de una genoteca construida por amplificación PCR usando cebadores específicos de las regiones 5' y 3' conservadas comunes a todos los miembros de esta familia de genes. Luego de despistajes primario y secundario se obtuvo un clon que llamamos CM82 (Fig. 1).

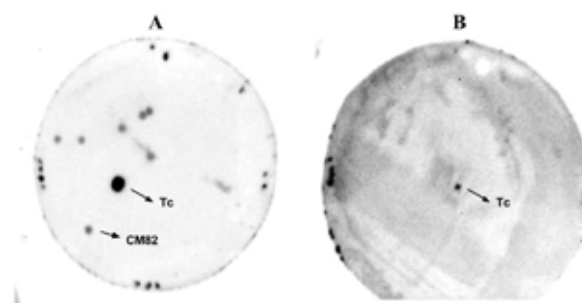


Figura 1

Despistaje inmunológico secundario de la genoteca de genes MASP con una mezcla de sueros de pacientes chagásicos. Panel A: colonias de *E. coli* BL21 de la genoteca con reacción positiva. Panel B: colonias de *E. coli* BL21 con el vector pT7-MAT-2 sin inserto como control negativo. Tc: extracto crudo de *T. cruzi* usado como control positivo.

El crecimiento de CM82 en presencia de IPTG indujo la expresión de la proteína MASP-CM82 recombinante, que fue entonces purificada por cromatografía de afinidad a metal inmovilizado, utilizando la etiqueta de histidina presente en el vector de expresión pT7-MAT-2 usado para la construcción de la genoteca. La Fig. 2 muestra una banda de aproximadamente 25 kDa eluida de la columna de purificación (carril 6). Usando el método de Bradford no se logró cuantificar la cantidad de proteína purificada, presumiblemente por estar bajo el límite de detección del ensayo.

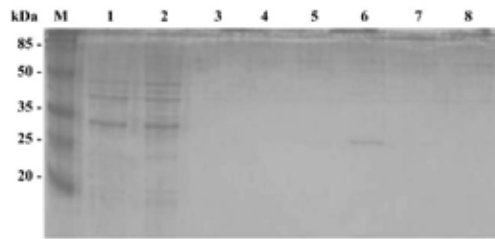


Figura 2

Electroforesis en gel de poliacrilamida - SDS al 17% de las distintas fracciones provenientes de la purificación de la proteína recombinante CM82 y de bacterias con el vector pT7-MAT-2 sin inserto. M: marcador de pesos moleculares (Pierce Blue Prestained Protein de Thermo Fisher Scientific, USA); 2, 4, 6 y 8: *flowthrough*, lavado, elución 1 y elución 2 de CM82; 1, 3, 5 y 7: *flowthrough*, lavado, elución 1, elución 2 de pT7-MAT-2.

Cuando se aplicó a la columna el sobrenadante del lisado de bacterias *E. coli* BL21 con el vector pT7-MAT-2 sin inserto e inducidas con IPTG, usadas como control negativo de todo el procedimiento, no se observó purificación de ninguna proteína (carriles 5 y 7). El ensayo de DOT-ELISA, usando una mezcla de suero de pacientes chagásicos, permitió verificar la antigenicidad de la proteína recombinante CM82, tal

usaron como antígeno, 6 péptidos sintéticos solapados correspondientes a la secuencia consenso de la región C-terminal de estas proteínas, demostrando un reconocimiento específico de anticuerpos hacia esta región. Esta antigenicidad convierte a las proteínas MASP en candidatos ideales para el desarrollo de ensayos diagnósticos serológicos que puedan complementar y/o mejorar los ya existentes.

En el presente trabajo reportamos la obtención de una proteína MASP recombinante purificada que es reconocida por sueros de pacientes chagásicos venezolanos, como primer paso para su evaluación inmunológica en ensayos diagnósticos.

La producción de proteínas recombinantes en sistemas bacterianos es una opción simple y económica para la obtención de cantidades suficientes de la proteína de interés.

Con el fin de asegurar la antigenicidad de la proteína expresada por el clon a utilizar para purificar la MASP recombinante, se realizó despistaje inmunológico de una genoteca de expresión de genes MASP con sueros de pacientes chagásicos. Es así como, efectivamente, se logró seleccionar un clon reactivo a partir del cual se indujo la expresión de la proteína recombinante y se purificó por afinidad en columna de metal inmovilizado.

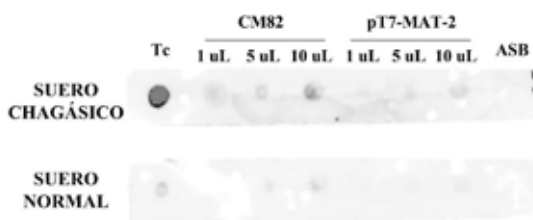
Sin embargo, el rendimiento de la purificación fue muy bajo, ya que la cantidad de proteína en el eluato estuvo por debajo del límite de detección del método de Bradford, que en nuestro caso fue 125 µg/mL. A pesar de ello, sí fue posible verificar su antigenicidad específica en un ensayo de DOT-ELISA que es ideal, por su simplicidad y costos relativos, para ser adaptado a laboratorios clínicos.

En conclusión, logramos implementar un método para la obtención de proteínas MASP recombinantes que podrían ser usadas en la evaluación de nuevos ensayos para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas.

como se muestra en la Fig. 3.

Figura 3

Ensayo de DOT-ELISA. Tc: extracto crudo de *T. cruzi*; ASB: albúmina sérica bovina.



DISCUSIÓN

Recientemente se demostró la presencia de una respuesta inmune humoral de las proteínas MASP de *T. cruzi* en humanos (De Pablos et al. 2016). Los autores

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por FONACIT, Ministerio del Poder Popular para la Ciencia y Tecnología

(MPPCT) Proyecto 2007001425 y por Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, UCV, Proyecto 20060000216.

REFERENCIAS

- ABATE T., RINCÓN M., DÍAZ-BELLO Z., SPENCER L., RODRÍGUEZ A. (2005). A mucin like gene different from the previously reported members of the mucin like gene families is transcribed in *Trypanosoma cruzi* but not in *Trypanosoma rangeli*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100:391-395.
- ATWOOD J. A. 3RD, WEATHERLY D., MINNING T., BUNDY B., CAVOLA C., OPPERDOES F., ORLANDO R., TARLETON R.L.(2005). The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* 309:473-476.
- AUSUBEL F.M., BRENT R., KINGSTON R.E., MOORE D.D., SEIDMAN J.G., SMITH J.A., STRUHLK. (eds) (2003) *Current Protocols in Molecular Biology* John Wiley & Sons, Inc.
- BARTHOLOMEU D.C., CERQUEIRA G.C., LEÃO A.C., DAROCHA W.D., PAIS F.S., MACDO C., DJIKENG A., TEIXEIRA S.M., EL-SAYED N.M. (2009). Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (*masp*) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Research* 37:3407-3417.
- BRADFORD M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- CAMARGO E.P. (1964) Growth and differentiation in *trypanosoma cruzi*. i. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. (1964). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*.6:93-100.
- DE PABLOS L.M., DÍAZ LOZANO I.M., JERICIC M.I., QUINZADA M., GIMÉNEZ M.J., CALABUIG E., ESPINO A.M., SCHIJMANA.G., ZULANTAY I., APT W., OSUNA A. (2016). The C-terminal region of *Trypanosoma cruzi* MASPs is antigenic and secreted via exovesicles. *Scientific Reports* 6:27293-27305.
- DÍAZ-BELLO Z., ZAVALA-JASPER., DÍAZ-VILLALOBOS M., MAURIELLO L., MAEKELT A., DE NOYA B.A. (2008) A confirmatory diagnosis of antibodies anti-*Trypanosoma cruzi* in donors referred by blood banks in Venezuela. *Invest Clín* 49:141-50.
- DUARTE, L.F., FLÓREZ, O., RINCÓN G., GONZÁLEZ C.I. (2014) Comparison of seven diagnostic tests to detect *Trypanosoma cruzi* infection in patients in chronic phase of Chagas disease. *Colombia Médica* 45:61-66.
- EL-SAYED N., MYLER P, BARTHOLOMEU D, NILSSON D, AGGARWAL G. et al. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309:409-415.
- LAEMMLI U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- LUQUETTI A.O., SCHMUNIS G.A. *Diagnosis of Trypanosoma cruzi* infection. En: Telleria J, Tibayrenc M, editors. (2010). *American trypanosomiasis (Chagas disease) one hundred years of research*. E-book. Amsterdam: Elsevierp. 743-792.
- MAEKELT G.A., COLMENARES DE ALAYÓN C. (1960). Simple method for the mailing of chagasic serums from rural regions. *Arch Venez Med Trop Parasitol Med* 3:133-42.
- STUDIER F., MOFFAT B. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189:113-130.

La planificación de un álbum virtual de parásitos intestinales

Nathalie Chacón^{1,2},
Darling Sánchez²,

¹ Universidad Central de Venezuela.
Facultad de Medicina. Escuela Luis Razetti.
Cátedra de Medicina Tropical
natychacon2004@gmail.com

² Universidad Central de Venezuela.
Facultad de Medicina. Instituto de Medicina
Tropical. Sección de Geohelmintiasis
darlingsanchezucv@gmail.com

RESUMEN

La planificación de un álbum virtual de microfotografías de parásitos intestinales es novedosa y su desarrollo requerirá de las tecnologías de la información y comunicación. La Sección de Geohelmintiasis del Instituto de Medicina Tropical está especializada en la atención de pacientes con parasitosis intestinales a nivel nacional, donde se realizan exámenes de heces con técnicas coproparasitológicas, lo que permitirá la recopilación del material fotográfico. El presente trabajo tiene como objetivo planificar la elaboración de un álbum de fotos virtual de parásitos intestinales y publicarlo en la web con fines divulgativos y educativos. A las muestras de heces de pacientes referidos se les practicará examen directo con solución salina y lugol, Formol Etil-Acetato, Baermann, Cinta Adhesiva Transparente, Kato-Katz y Zielh-Neelsen modificado. Con el examen microscópico se observarán las formas parasitarias al microscopio de luz y se clasificarán. Las fotografías se realizarán con una cámara digital de 12 píxeles y microscopio que se enfocará con objetivos de 10X, 40X y 100X para los helmintos, protozoarios y coccidias respectivamente. Las licencias de autoría serán de Creative commons, se estructurará la página web para la publicación de las imágenes. Este álbum de fotos virtual de parásitos intestinales es el primero que la Sección de Geohelmintiasis planifica y cuya colección de microfotografías constituirán un banco de imágenes de protozoarios, helmintos y coccidias intestinales, basado en la experiencia clínico-asistencial y de investigación propia de la Sección de Geohelmintiasis, logrando su visión y misión integral.

Palabras Clave: Medicina Tropical; álbum virtual; parásitos intestinales; banco de imágenes; parásitos intestinales (Fotos Virtuales)

THE PLANNING OF A VIRTUAL ALBUM OF INTESTINAL PARASITES

ABSTRACT

The planning of a virtual album of microphotographs of intestinal parasites is novel and its development will require the use of information and communication technologies. The Soil-Transmitted Helminths (STH) laboratory of the Institute of Tropical Medicine is a care laboratory and a specialist in taking care of patients with intestinal parasites at the national level and that has mastery of the settings upon coproparasitological techniques, it will permit the compilation of the photographic material. The present work has as its object how to

make a virtual photos album of intestinal parasites and to publish it in the web with the aims of disclosure and education. To the feces samples of referred patients, a direct examination will be made with saline solution and Lugol, Formol-Ethil-Acetate, Baermann, Transparent Adhesive Tape, Kato-Katz and Zielh-Neelsen modified. The parasites forms will be observed by microscope. The microphotographs will perform with a 12 pixels digital camera and a light microscope with 10X, 40X and 100X lenses for helminths, protozoa and coccidian respectively. The author licenses will be of Creative Commons and the structure of the web page will be planned for the publication of the images. This album of virtual photos will be the first to be made in Venezuela, and this collection of microphotographs will constitute an image bank of clinical, assistance and investigation experience of STH lab, it is complying with the integral laboratory's vision and mission.

Keywords: Tropical medicine; virtual album; intestinal parasites; images bank

INTRODUCCIÓN

La Sección de Geohelmintiasis del Instituto de Medicina Tropical (SGH), fue creada en 1947 por el director del Instituto de Medicina Tropical, el Dr. Félix Pifano (Navas, 2000). La SGH tiene la visión de ser una organización integral, de investigación, docencia y extensión, especializada en la atención de pacientes con parasitosis intestinales, con el fin de dar servicio a instituciones médicas públicas y privadas de la comunidad venezolana, con impacto a nivel nacional e internacional. La misión de la SGH es la de ofrecer y proveer a los pacientes afectados con parasitosis intestinales, una asistencia médica integral, diagnóstico de laboratorio de excelencia y tratamiento especializado y de calidad, destacándose en la calidad de servicio hacia el paciente, en relación al profesionalismo demostrado por el personal, los exámenes coproparasitológicos empleados y la atención personalizada de cada paciente que consulta a escala nacional. Adicionalmente, generar conocimientos sobre la clínica, la epidemiología, el diagnóstico parasitológico e inmunológico, la terapéutica y la prevención de parasitosis intestinales que afectan la población venezolana.

La SGH ha contribuido con la promoción del conocimiento y con la formación de los recursos humanos participando en actividades docentes con estudiantes de pregrado y postgrado, también

adiestramiento de técnicos en carreras del área de la salud. Las metas cumplidas han incluido el mejoramiento de las técnicas de diagnóstico existentes en el área de los parásitos intestinales, así como el servicio asistencial a la comunidad venezolana. Los objetivos de la SGH se resumen en sus aportes encaminados hacia el diagnóstico clínico y de laboratorio, labores de investigación y de extensión en las parasitosis intestinales: consultas médicas, servicio comunitario, cursos de adiestramientos, asesorías, entre otros. Enmarcado en la visión y misión integral de la SGH, está la creación de un álbum de microfotografías de formas parasitarias. La creación de un álbum de fotos científicas de parásitos intestinales requiere invertir tiempo, creatividad, dinero, esfuerzo y dedicación, si es virtual, necesita adicionalmente tecnologías de la información y la comunicación (TIC).

Los foto-álbum virtuales o álbumes de fotos digital son una herramienta adaptable, que aportaría la ventaja de recoger información amplia y variada para diferentes fines, usos y utilidades, sobre todo educativos y de aprendizaje, resultarían muy útiles en el presente y en el futuro tanto en las aulas físicas como virtuales.

A medida que los tiempos cambian, la abundante información que se genera diariamente necesita más y más espacio, los foto-álbum virtuales brindan múltiples posibilidades, gracias a las TIC, adquieren flexibilidad y multiplicidad, se hacen accesibles a múltiples usuarios, los registros de imágenes pueden ser visualizados, revisados y/o descargados por varias personas al mismo tiempo a través del mundo, siendo posiblemente de uso ilimitado en tiempo y espacio. Difieren del álbum de fotos físicas en cuanto a perdurabilidad, los cuales tienden a degenerarse espontáneamente por leyes físico químicas, en la práctica un foto-álbum virtual no sufriría tal proceso, la nitidez de su imagen se mantiene en el tiempo, cualidad indispensable cuando se necesitan precisar los detalles. Además, las fotos físicas son de uso limitado en tiempo, usuario y espacio.

La Sección de Geohelmintiasis del Instituto de Medicina Tropical, de la Universidad Central de

Venezuela recibe muestras de heces de pacientes a nivel nacional con condiciones especiales, referidos por médicos generales y especialistas, este hecho incrementa la oportunidad de poder obtener la visualización de formas parasitarias.

El presente trabajo tiene como objetivo planificar la elaboración de un álbum de fotos virtual de parásitos intestinales y publicarlo en la web con fines divulgativos y educativos. Este material fotográfico servirá de apoyo y herramienta de aprendizaje a los estudiantes del área de la salud y a los profesionales como médicos generales o especialistas: microbiólogos, parasitólogos y bioanalistas, adicionalmente, podrá ser usado en las aulas físicas o virtuales a nivel global.

PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

Consentimiento previa información(C.P.I.)

Todos los pacientes participantes deberán ser informados de su participación en la elaboración de un álbum virtual de imágenes de parásitos intestinales, con fines divulgativos y docentes. Las muestras serán codificadas en el momento de su entrega, con el fin de mantener el anonimato del paciente y serán desechadas al concluir su uso. El paciente obtendrá el beneficio de ser diagnosticado y tratado si resulta positivo en sus resultados.

Los aspectos bioéticos de este estudio serán evaluados por el comité ético-científico del Instituto de Medicina Tropical, de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela.

Obtención de las muestras

Las muestras de heces serán recolectadas de los pacientes que son referidos por el médico o especialista a la Sección de Geohelmintiasis del Instituto de Medicina Tropical, desde los principales hospitales y centros de Servicio del área metropolitana de Caracas (Gran Caracas) y ciudades cercanas de los estados Miranda, Vargas, Aragua, Carabobo y Guárico, principalmente.

Procesamiento de las muestras

Se realizará la búsqueda activa de parásitos intes-

tinales en las muestras frescas recibidas, con menos de una hora de colectada por el paciente. El seriado de heces, incluirá la evaluación de tres muestras de heces de cada paciente con el examen directo (WHO 1991; Koneman et al. 2008; Trabelsi et al. 2012; Chacón et al. 2007), técnica de concentración con acetato de etilo (FEA) (WHO 1991; García 2007) y Baermann (Hernández-Chavarría et al. 2001). A todo paciente con sintomatología de prurito anal en el momento de la consulta, se le realizará Cinta Adhesiva Transparente CAT (García 2007; Jeandron et al. 2010), a todo paciente inmunosuprimido se le realizará el Ziehl-Neelsen modificado (WHO 1991; Chacón et al. 2007; García 2007) y aquellos con antecedentes epidemiológicos para helmintos, se les realizará Kato-Katz (Katz et al. 1972).

Obtención de la imagen fotográfica

La obtención de la fotomicrografía se realizará utilizando una cámara digital de 12 pixeles, marca Panasonic®, Lumix y el uso de un microscopio de luz, marca Globe® y Nikon®, con objetivos de 10X para los helmintos y el de 40X para los protozoarios. Se usará el objetivo de inmersión de 100X para enfocar las coccidias intestinales.

Normas de derecho de autor en internet

El derecho de autor nace con la creación, pero se deben reforzar los derechos morales y patrimoniales.

Los trámites sobre el derecho de autor, se deben tramitar según las indicaciones del Servicio Autónomo de Propiedad intelectual (SAPI 2015), previo a las licencias de la propiedad intelectual en el internet. Se deben seguir las instrucciones indicadas en su sitio web. Posteriormente, en el sitio web de la publicación del álbum, se indicará la licencia de bienes comunes creativos, que permite reservar algunos derechos de la obra y es gratuito.

Publicación en la red

Para lograr publicar el álbum de fotos en internet con fines divulgativos es necesario planificar y definir cuatro ítems fundamentales (Mozilla DeveloperNet-

work 2005). Pensar y definir el tipo de dominio que se desea crear, su nombre y su terminación o raíz.

- Buscar un alojamiento o “hosting” para el sitio web. Hay empresas dedicadas a alojar páginas web o a patrocinar el alojamiento. También existen plataformas para la creación y alojamiento de páginas web de forma gratuita, permitiendo la publicación de publicidad que permite ofrecer este servicio, como patrocinantes del sitio web.

- Estructurar el sitio web, en forma lógica y dinámica que le permita al visitante disfrutar y permanecer en la página.

- Editar las imágenes con programas adecuados tipo PhotoShop y utilizar formatos universales como JPEG o JPEG2000.

RESULTADOS

La planificación se organizó en tres fases:

Primera Fase: Bioética

El comité ético-científico del Instituto de Medicina Tropical, de la U.C.V., es el encargado de la evaluación de los aspectos bioéticos de este proyecto. Se le presentará por escrito este proyecto junto con el formato de consentimiento previa información. Su aprobación y autorización permitirá el inicio de la elaboración del álbum de microfotografías de parásitos intestinales y se continuará a la segunda fase.

Segunda Fase: Álbum de Microfotografías

2. a.- Captación de los participantes

A los pacientes referidos se les invitará a participar, se les informará sobre el objetivo de este proyecto, con el consentimiento previa información, el cual firmarán si están de acuerdo en participar, el mismo paciente o su representante.

2.b.- Obtención del seriado de heces

Cada participante entregará al laboratorio tres muestras de heces, de reciente emisión, en un envase de recolección de heces, al llegar al laboratorio cada una se identificara con un código único que permite trabajar en forma anónima con cada paciente.

2.c.- Procesamiento de las muestras de heces

A cada muestra codificada según el protocolo interno del laboratorio, procesada con la técnica coproparasitológica correspondiente: Examen directo con solución salina y lugol, Formol Etil-Acetato, Baermann, CAT y Ziehl- Neelsen modificado. Se le realizará examen con microscopio de luz, que se enfocarán con objetivos de 10x y 40x para la búsqueda y observación de las formas parasitarias de helmintos y protozoarios. Para coccidias intestinales se empleará el objetivo de 100x y aceite de inmersión.

2.d.- Obtención de las microfotografías

Los hallazgos obtenidos al examen microscópico, se les realizará una microfotografía con una cámara fotográfica de 12 píxeles.

La toma de las fotografías tendrá un aumento de 100X, 400X para los helmintos y los protozoarios. Las coccidias intestinales a un aumento de 1000X.

En la figura 1 se puede observar un ejemplo de una microfotografía de un huevo de helminto.

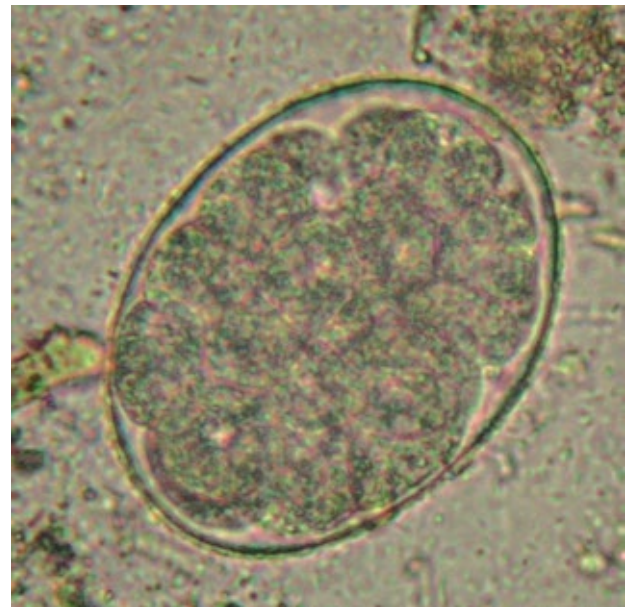


Figura 1

Huevo de Ancilostomídeo. Imagen en JPEG. Técnica usada: FEA. Aumento: 400X.

2.e.- Clasificación de las imágenes

Las imágenes seleccionadas, se clasificarán usando lo indicado en la tabla 1.

Tabla 1.
Clasificación de los parásitos intestinales, según técnica coproparasitológica para su publicación en el álbum virtual

Técnicas: Directo (Lugol-Salina) y FEA
Protozoarios
<i>Blastocystis</i> sp. Formas con cuerpo central
<i>Blastocystis</i> sp. Formas granulosas
<i>Blastocystis</i> sp. Formas globulosas
<i>Blastocystis</i> sp. Formas ameboides
<i>Blastocystis</i> sp. Formas Quistes
Quistes de <i>Entamoeba histolytica</i> y/o dispar
Quistes de <i>Entamoeba histolytica</i>
Trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> y/o dispar
Quistes de <i>Entamoeba coli</i>
Trofozoítos de <i>Giardia duodenalis</i>
Quistes de <i>Giardia duodenalis</i>
Trofozoíto de <i>Endolimax nana</i>
Quistes de <i>Endolimax nana</i>
Helmintos
Huevos fértiles de <i>Ascaris lumbricoides</i>
Huevos infértiles de <i>Ascaris lumbricoides</i>
Adulto hembra de <i>Ascaris lumbricoides</i>
Adulto macho de <i>Ascaris lumbricoides</i>
Huevos de <i>Trichuris trichiura</i>
Adultos de <i>Trichuris trichiura</i>
Huevos de <i>Anquilostomídeos</i>
Adulto de <i>Necator americano</i>
Adulto de <i>Ancylostoma duodenale</i>
Adulto de <i>Taenia solium</i>
Adulto de <i>Taenia saginata</i>
Huevos de <i>Taenia</i> spp.
Huevos de <i>Himenolepis nana</i>
Técnica de Zielh Neelsen modificado.
Coccidias intestinales
Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp.
Ooquistes de <i>Isospora belli</i> (<i>Cystoisospora belli</i>)
Ooquiste de <i>Cyclospora cayetanensis</i>
Técnica de Baermann
Larvas rhabditoides de <i>Strongyloides stercoralis</i>
Técnica de la Cinta Adhesiva Transparente

Huevos de *Enterobius vermicularis*
Adultos de *Enterobius vermicularis*
Huevos de *Taenia* spp.
Huevos de *Himenolepis nana*

Tercera fase: Publicación en la Web

3.a.- Derechos de autor

Los trámites sobre el derecho de autor, previo a las licencias de la propiedad intelectual en el internet, se tramitarán según las indicaciones del Servicio Autónomo de Propiedad Intelectual (SAPI 2015). Posterior a dicha licencia para cada una de las imágenes virtuales se escogerá una licencia de Creative Commons de Reconocimiento-NoComercial-Sin Obra Derivada 4.0 Internacional (Creative Commons 2001).

3.b.- Alojamiento de la página Web

Se trabajará en conjunto con una empresa o profesional especializado en el alojamiento de páginas web (12), con la cual se hará la estructuración del sitio web y la edición de las imágenes. Se planificará el trabajo desde el comienzo para almacenar la data en una base de datos no estructurada (MongoDB 2007), con el fin de realizar una página web dinámica, empleando lenguajes de programación ideales para Ciencia de Datos (Data Science) tipo Python (SciPyDevelopers 2017), con sus herramientas respectivas como SciPy, NumPy, Pandas y SciKitlearn. También se podrá explorar la posibilidad de usar el ecosistema de paquetes (Linux foundation2017) como ecosistema de librerías de código abierto. Las posibilidades de nuevas aplicaciones hoy en día son infinitas y la decisión de su uso dependerá de los costos.

DISCUSIÓN

Un álbum de fotos virtual como proyecto resulta muy gratificante e interesante. El propósito de documentar una colección de imágenes que se relacionan entre sí, con el objeto de guardarlos para ser posteriormente expuestos y visualizados, son útiles como herramienta didáctica en diversas áreas profesionales como salud, educación, tecnología, ingeniería, artes, antropología, botánica, zoología, entre otras (Sampeiro 2013; MNA 2011; Escolástico León et al. 2013).

En la actualidad existen varias aplicaciones y

servicios web que permiten su elaboración, desde su organización, diseño, edición, personalización e incluso permiten introducir palabras clave, textos o explicaciones de las fotografías seleccionadas y hasta servicio de impresión si el usuario lo desea (ScienceSource 2017; Freeimages 2000).

Un álbum virtual ofrece la libertad de tema, diseño y presentación que el autor en su creatividad desea ofrecer a los internautas, ya sea con fines didácticos, divulgativos y también recreativos, basados en su propia experiencia.

Algunos de los ejemplos de páginas web que se han dedicado a la divulgación de imágenes científicas a nivel mundial serán presentadas a continuación, las cuales son: El *New England Journal of Medicine (NEJM 2017)*, publica imágenes de casos clínicos con fines divulgativos y de difusión de conocimientos clínicos entre los especialistas suscriptores de la revista. Las imágenes fotográficas de excelente calidad son de pacientes, imágenes radiológicas o ecográficas, de anatomía patológica (de tejidos microscópicos o de piezas anatómicas), de exámenes especiales como fondo de ojo o endoscopias y otras que permitan la resolución del caso clínico presentado.

La **Universidad de Málaga** (UCiencias 2017) en España, tuvo la idea de publicar un banco de imágenes en la página de la Universidad, para que sus usuarios estudiantes y profesores, la utilicen como plataforma para exponer sus contribuciones fotográficas.

ScienceSource (2017) es una empresa norteamericana, con casi 50 años de experiencia, que vende imágenes digitales, en el área de la ciencia. No incluye imágenes de parásitos intestinales pero sí de otros microorganismos del área de la microbiología. La variedad y calidad de las imágenes, merecen atención y divulgación de la información.

Son escasas las publicaciones específicas tipo álbum virtual o digital en el área de la salud, lo que predominan son atlas especializados de parasitología (Angélica M 2008), microbiología o ecología (Universidad de Cundinamarca 2014; Escolástica León et al. 2013). La creación de un álbum de fotos científicas de parásitos intestinales de la SGH se unirá a los pocos

ya publicados en la web, contribuyendo a ampliar la información global en esta categoría específicamente (Flórez Juárez 2013).

En Venezuela, la publicación de un foto álbum virtual o digital, sobre parásitos intestinales con fines divulgativos y/o educativos no existe, si se realiza la búsqueda en la web por imágenes, sólo aparecerán imágenes fotográficas publicadas aisladamente, algunos con la modalidad galería, de instituciones o personas, coleccionadas o no, sin organización ni las otras características de un álbum.

CONCLUSIONES

La planificación de este álbum de fotos virtual de parásitos intestinales de la SGH, es el primer paso para su creación, el cual sería el primero en su categoría, cuyo banco de imágenes de microfotografías son propias de la experiencia asistencial y de investigación, labor que lleva a cabo desde sus inicios en el año 1947.

AGRADECIMIENTOS

Al Sr. Edwin Díaz, auxiliar del laboratorio, la Sra. Karolay Bermúdez, secretaria de la Sección y a la Srta. Anny Pomenta Rojas, bioanalista, por la valiosa colaboración brindada para la culminación de este manuscrito.

REFERENCIAS

- ANGÉLICA M. (2008) *Álbum Helmitos*. Google plus [citado el 3 de mayo de 2017] Disponible en: <https://get.google.com/albumarchive/109668050259229441652/album/AF1QipMG-EbHWRUga7tKGJRH498E9F4ZzGvqUpbS8hpL>
- CHACÓN N, CONTRERAS R, MÁRQUEZ W, SALINAS R, ROMERO J. (2007) *Importancia de la Referencia Médica en el diagnóstico de parasitosis intestinales por métodos coproparasitológicos en la Sección de Geohelmintiasis*. Instituto de Medicina Tropical -Universidad Central de Venezuela. *Rev. Fac. Med.*30: 90-96.-
- CREATIVE COMMONS (2001) *creativecommons.org*. Mountain View, EEUU. [citado el 1 de mayo de 2017] Disponible en: <https://creativecommons.org/>-
- ESCOLÁSTICO LEÓN C, CABILDO MIRANDA MP, CLARAMUNT VALLESPI RM, CLARAMUNT VALLESPI T. (2013) *Ecología I: Introducción organismos y poblaciones*. Editorial UNED [citado el 3 de mayo de 2017].

- Disponible en: https://books.google.co.ve/books/about/ECOLOG%3%8DA_I_INTRODUCCI%3%93N_ORGANISMOS_Y_P.html?id=LzVIAgAAQBAJ&redir_esc=y.-
- FLOREZ JUAREZ O. (2013) Álbum de fotografías de protozoarios parásitos [citado el 2 de mayo de 2017] Disponible en: <http://www.eneo.unam.mx/publicaciones/publicacionesoct2013/Album%20de%20fotos%20de%20protozoarios%20y%20parasitos.pdf>.-
- FREEIMAGES.CO.UK. (2000) freeimages.co.uk Reino Unido [citado el 3 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.freeimages.co.uk/gallery.htm>.-
- GARCIA L.S. (2007) *Diagnostic medical parasitology*. 5th ed., Washington D.C: ASM Press.-
- HERNÁNDEZ-CHAVARRÍA F. y AVENDAÑO L. (2001) A simple modification of the Baermann Method for Diagnosis of Strongyloidiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 96: 805- 807.-
- JEANDRON A., ABDYLDAIEVA G, USUBALIEVA J, ENSINK JH, COX J, MATTHYS B, RINALDI L, CRINGOLI G, UTZINGER J. (2010) Accuracy of the Kato-Katz, adhesive tape and FLOTAC techniques for helminth diagnosis among children in Kyrgyzstan. *Acta Trop.*, 116: 185-92.-
- KATZ N, CHAVES A, PELLEGRINO J. (1972) A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 14:397-400.-
- KONEMAN EW y KONEMAN SA. (2008) *Diagnóstico Microbiológico/Microbiological diagnosis*. Editorial Panamericana. 1961 pp.-
- LINUX FOUNDATION collaborative projects. Node.js foundation (2017) Disponible en: <https://nodejs.org/es/>.-
- MUSEO NACIONAL DE ANTROPOLOGIA. MUSEO NACIONAL DE HISTORIA NATURAL (2011) Álbum de flora, fauna y antropología de Uruguay. Uruguay. [citado el 3 de mayo de 2017] Disponible en: http://www.mna.gub.uy/museosdigitales/?mod=ficha&id=25&buscador=fichas_fauna&v=fichas.-
- MONGODB. (2007) Norte América, Europa y Asia del pacífico. Disponible en: <https://www.mongodb.com/>.-
- MOZILLA DEVELOPER NETWORK y colaboradores individuales (2005) [citado el 1 de mayo de 2017] Disponible en: https://developer.mozilla.org/es/docs/Learn/Getting_started_with_the_web/Publishing_your_website.-
- NAVAS G. (2000). Personaje Félix Pifano. *Vitae*. [citado 2017 Abr 29] Disponible en: <http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeDos/Personajes/Pifano/pifano1.htm>. -
- NEJM (The New England Journal of Medicine (2017) Browse figures and multimedia. Inglaterra [citado el 3 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.nejm.org/multimedia/images-in-clinical-medicine>.-
- SAMPEDRO X. (2013) Álbum digital Botánico. Plantas alimenticias y forrajeras. ISSUU [citado el 3 de mayo de 2017] Disponible en: https://issuu.com/xavisam/docs/album_bio.-
- SCIENCE SOURCE.(2017)- Science Source Images. Nueva York-Estados Unidos [citado el 3 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.sciencesource.com/>.-
- SCIPYDEVELOPERS. (2017) SciPy.org. Disponible en: <https://www.scipy.org/>.-
- SERVICIO AUTÓNOMO DE PROPIEDAD INTELECTUAL (SAPI) (2015) Caracas [citado el 1 de mayo de 2017] Disponible en: <http://sapi.gob.ve/>.-
- TRABELSI S, AOUINET A, KHALED S.(2012) Procedure and indications of stool examination in parasitology. *Tunis Med*. 90:431-434.-
- UCIENCIAS Universidad de Málaga (UMA). (2017) Vicerrectorado de Investigación y Transferencia. España. Banco de imágenes [citado el 3 de abril de 2017]. Disponible en: <http://uciencia.uma.es/Banco-de-Imagenes/Subir-imagen>.-
- UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA Álbum virtual de insectos de importancia agrícola. (2014). Facultad de Ciencias Agropecuarias. Ingeniería Agronómica. Entomología General IIPA [citado el 2 de mayo de 2017]. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=HzVDIcrNAdE>.-
- WHO (1991). *Basic laboratory methods in medical parasitology*. World Health Organization. Geneva. p. 10–31.-

Caracterización de casos atendidos de toxocariasis visceral y ocular en el Instituto de Medicina Tropical, Caracas, Venezuela, 2011-2016

Olinda Delgado¹,
María Ana Rivas¹,
Virginia Coraspe¹,
Sylvia Silva¹,
María Laura Dos Santos¹,
Yalitz Centeno¹,
Alfonso J. Rodríguez-Morales^{1,2,3,4}

¹ Sección de Inmunoparasitología,
Instituto de Medicina Tropical,
Universidad Central de Venezuela,
Caracas, DC, Venezuela.
olinda.delgado@gmail.com

² Grupo de Investigación Salud Pública e
Infección, Facultad de Ciencias de la Salud,
Universidad Tecnológica de Pereira,
Pereira, Risaralda, Colombia.

³ Comité de Zoonosis y Fiebres
Hemorrágicas, Asociación Colombiana de
Infectología, Bogotá, DC, Colombia.

⁴ Working Group on Zoonoses,
International Society for Chemotherapy,
Aberdeen, United Kingdom.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La toxocariasis es una zoonosis prevalente en muchas regiones tropicales y subtropicales. En Venezuela existe un número relativamente bajo de investigaciones, pese a su alta frecuencia, cuando es buscada. En este estudio se revisó el comportamiento en 6 años de los pacientes atendidos en el Instituto de Medicina Tropical (IMT) para esta patología.

MÉTODOS: Se realizó un estudio observacional, en el período 2011-2016, evaluando los diagnósticos y las principales características de los casos atendidos con toxocariasis en el IMT, por técnicas inmunológicas como ELISA, Western-bloty ELISA-Avidez-IgG.

RESULTADOS: Se atendieron 2.750 casos (408 casos por año ± 184); 69,5% correspondieron a toxocariasis visceral. La edad promedio de los pacientes fue 20,43 años (IC95% 19,5-21,27), 54,9% del género masculino; 51,47% refirió la posesión de mascotas, 40,46% eran del Distrito Capital (resto de los 24 estados). Del total, 53,02% fueron positivos por ELISA, en estos la mediana de Avidez de anticuerpos IgG anti-Toxocara fue de 86%. En cuanto a la eosinofilia, los valores promedios fueron de 22,6% (IC95% 21,1-24,1%), mayores en aquellos con ELISA positiva (promedio 23,9%) ($p=0,0268$), también significativamente mayores en pacientes con toxocariasis visceral (22,9%) ($p=0,0364$).

DISCUSIÓN: La toxocariasis sigue siendo un importante problema de salud pública que requiere mayor estudio y evaluación, ejemplo estudios trasversales y prospectivos para precisar mejor su comportamiento epidemiológico, así como en el conocimiento de su impacto clínico. El desarrollo de mejores técnicas de diagnóstico, y en particular de biología molecular, son una clara necesidad en Venezuela y otros países de la región.

Palabras Clave: toxocariasis; *Toxocara canis*; *Toxocara cati*; epidemiología; inmunodiagnóstico; Venezuela.

CHARACTERIZATION OF CASES TREATED FOR VISCERAL AND OCULAR TOXOCARIASIS OF THE TROPICAL MEDICINE INSTITUTE, CARACAS, VENEZUELA, 2011-2016.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Toxocariasis is a zoonosis, prevalent in many tropical and subtropical regions. In Venezuela, there are a relatively low number of investigations, despite its high frequency, when it is sought. For these reasons

we reviewed the trends and features in 6 years, of the patients attended in the Tropical Medicine Institute for this pathology.

METHODS: An observational study was carried out in the period 2011-2016, evaluating the diagnoses and main characteristics of the cases treated with toxocariasis in IMT, using immunological techniques such as ELISA, Western-blot and ELISA-avidity-IgG.

RESULTS: 2,750 cases were attended (408 cases per year \pm 184); 69.5% were visceral toxocariasis. The mean age of the patients was 20.43 years (95% CI 19.5-21.27), 54.9% of the male gender; 51.47% referred to the possession of pets, 40.46% were from the Capital District (rest of the 24 states). Of the total, 53.02% were positive by ELISA, in these, the median avidity of anti-Toxocara IgG antibodies was 86%. As for eosinophilia, the mean values were 22.6% (CI95% 21.1-24.1%), higher in those with positive ELISA (mean 23.9%) ($p=0.0268$), as well significantly higher in patients with visceral toxocariasis (22.9%) ($p=0.0364$).

DISCUSSION: Toxocariasis remains a major public health problem, requiring further study and evaluation. Cross-sectional and prospective studies are needed to better define its epidemiological behavior, as well as its clinical impact. The development of better diagnostic techniques and molecular biology in particular, is a clear need in Venezuela and other countries in the region.

Keywords: toxocariasis; *Toxocara canis*; *Toxocara cati*; epidemiology; immunodiagnosis; Venezuela.

INTRODUCCIÓN

La toxocariasis continúa siendo un importante problema de salud pública en muchos países, incluida Venezuela¹⁻⁴. Esta zoonosis tiene múltiples implicaciones epidemiológicas⁵⁻¹¹, así como clínicas¹²⁻¹⁷, por lo cual cobra gran importancia una mayor investigación de la misma. Sin embargo, aún el número de estudios publicados en el país, así como en otros de América Latina, es limitado¹⁸. También es importante mencionar que se requiere mejorar la disponibilidad de técnicas de diagnóstico inmunológico y molecular que permitan una mejor identificación de los casos^{1,2,4,19}, especialmente aquellos que pueden considerarse agudos y que ameritan tratamiento para evitar las múltiples consecuencias, que tanto la toxocariasis visceral como la ocular pueden tener^{20,21}.

Los estudios transversales de seroprevalencia, fundamentalmente basados en pruebas como la ELISA, han encontrado en América Latina una variación de 1 a 67%^{3,22}. En el caso de Venezuela, en el mismo rango, donde además de la prevalencia de infección en perros, se ha encontrado alrededor de

12% y 65% en suelos en algunos lugares^{3,22}.

La mayoría de los estudios de toxocariasis en América Latina están basados en pequeñas muestras, poco representativas, y fundamentalmente limitadas a lugares puntuales, en tiempo y espacio^{3,22}. Por estas razones, el presente estudio, caracteriza el comportamiento de la toxocariasis en más de 2.750 casos evaluados en un período de 6 años, con pacientes procedentes de todo el territorio nacional, mostrando la importancia de esta zoonosis parasitaria y de su alta prevalencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional sobre la base de sujetos atendidos en el Instituto de Medicina Tropical en el período 2011-2016 (para el año 2016 solo se presentan resultados obtenidos durante el período enero-marzo), con una muestra no aleatoria, en la Sección de Inmunoparasitología, procedentes de diferentes lugares de Venezuela.

Todos los participantes fueron entrevistados para determinar la presencia de factores asociados a la infección (como tenencia de mascotas) y se realizó examen clínico general. Asimismo, se obtuvo una muestra de sangre de cada individuo, para la obtención de suero (para ELISA y ELISA-Avididad-Ig G) y con anticoagulante para realizar el conteo relativo de eosinófilos (%).

Las muestras de suero fueron procesadas mediante la técnica de ELISA para detectar anticuerpos específicos contra *Toxocara*, mediante el método estandarizado en el IMT en estudios previos.

Los resultados fueron almacenados en una base de datos elaborada con la hoja de cálculo Excel y el análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico Stata v.14.0 ® (licenciado para la UTP). Las variables cuantitativas se resumieron como promedios, con desviaciones estándar y/o intervalos de confianza del 95% (IC95%). Se analizaron frecuencias absolutas y relativas (con rangos intercuartiles para dispersión), se buscaron diferencias en la distribución de individuos en cada factor estudiado, tanto clínico como epidemiológico, con respecto al resultado de la

prueba inmunológica; estas diferencias fueron verificadas mediante la prueba de X² y t de Student, luego de verificar supuestos (normalidad con la prueba de Shapiro-Wilks), con un nivel de confianza de 95%, p significativa <0,05.

RESULTADOS

Durante el período de estudio (6 años) se atendieron un total de 2.750 casos evaluados inmunológicamente, para un promedio de 408 casos por año (± 184 /año, mínimo 90 en 2016, máximo 616 en 2012) (Figura 1). Del total de casos, 69,5% correspondieron a toxocariasis visceral y 30,5% a toxocariasis ocular.

La edad promedio de los pacientes fue 20,43 años (IC95% 19,5-21,27), siendo mayores las pacientes del género femenino, 22,5 años (IC95% 21,2-23,8) que las

de pacientes del género masculino, 18,8 años (IC95% 17,6-20,0) (p=0,0001). En cuanto al género, 54,9% correspondió al género masculino y 45,1% al femenino. Del total de casos, 51% correspondió a menores de 10 años de edad (Figura 2).

Los casos de toxocariasis visceral ocurrieron en pacientes de edad promedio 16,74 años (IC95% 15,8-17,7), en tanto los de toxocariasis ocular con edad promedio 28,7 años (IC95% 27,2-30,2) (p<0,0001).

De los pacientes, en 51,47% refirió la posesión de mascotas (48,53% no). Sin diferencias significativas según fuese toxocariasis visceral o toxocariasis ocular (p=0,537).

En cuanto a la procedencia 40,46% eran del Distrito Capital, seguidos por 35,9% del estado Miranda, seguidos por otros estados (Figura 3), en total 24

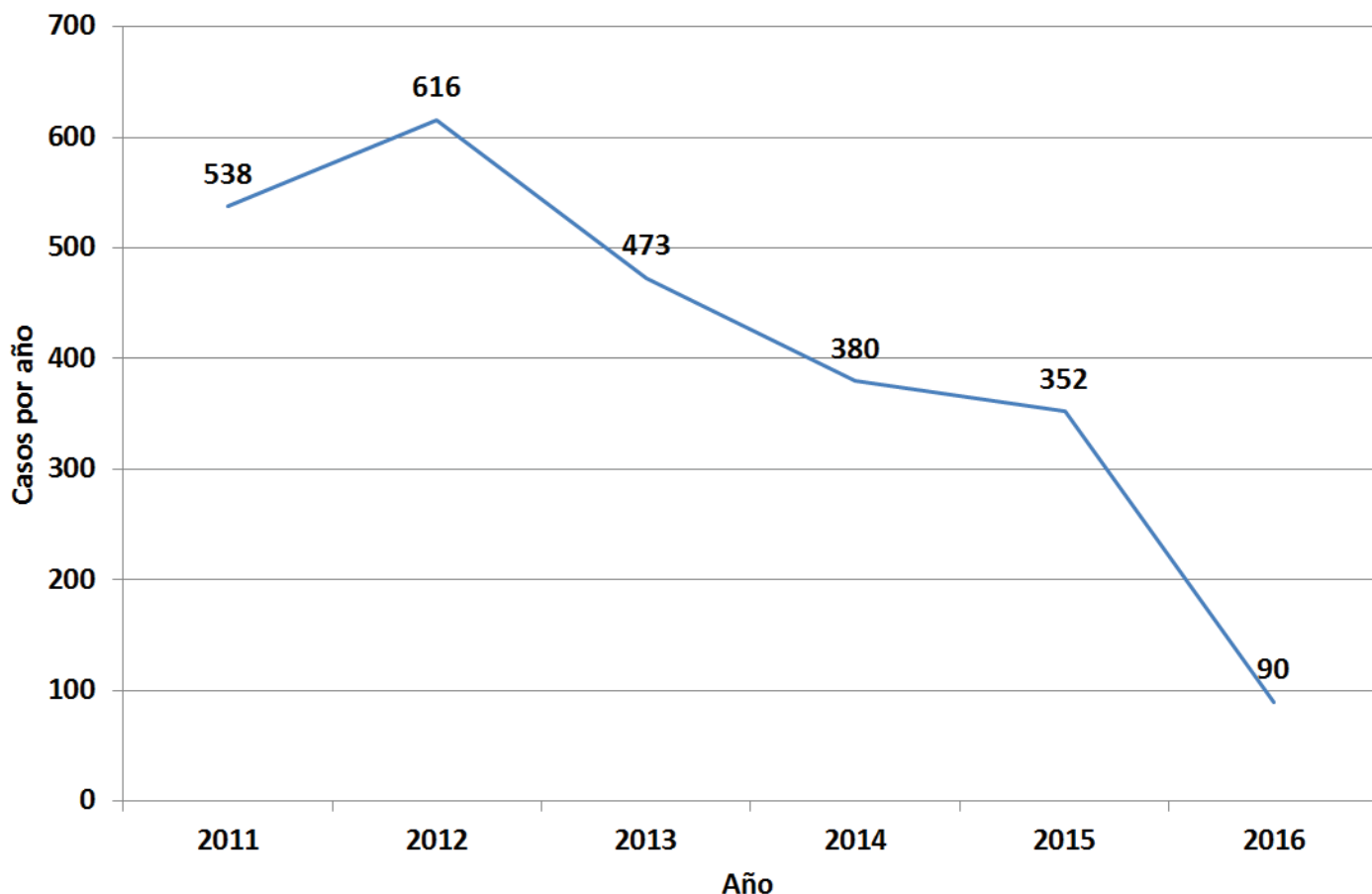


Figura 1

Número de casos atendidos por año, toxocariasis, Instituto de Medicina Tropical, 2011-2016 (para el año 2016 solo se presentan resultados obtenidos durante el período enero-marzo)

estados. También se identificaron 2 casos importados, uno de Colombia y otro de Perú (países donde la toxocariasis es una patología presente también).

Del total de pacientes evaluados, 53,02% fueron positivos por ELISA para anticuerpos anti-*Toxocara*. En los casos positivos por ELISA, la mediana de Aidez de anticuerpos IgG anti-*Toxocara* fue de 86% (rango intercuartil 62-100), correspondiendo 82,6% a un valor >50%, 11,6% a 30-50% y 5,8% a valores <30%.

En cuanto a la eosinofilia, los valores promedios fueron de 22,6% (IC95% 21,1-24,1%), mayores en aquellos con ELISA positiva (promedio 23,9%) en comparación con ELISA negativa (promedio 20,8%) ($p=0,0268$). De igual forma, siendo significativa-

mente mayores en pacientes con toxocariasis visceral (22,9%) en comparación con aquellos con toxocariasis ocular (14,4%) ($p=0,0364$).

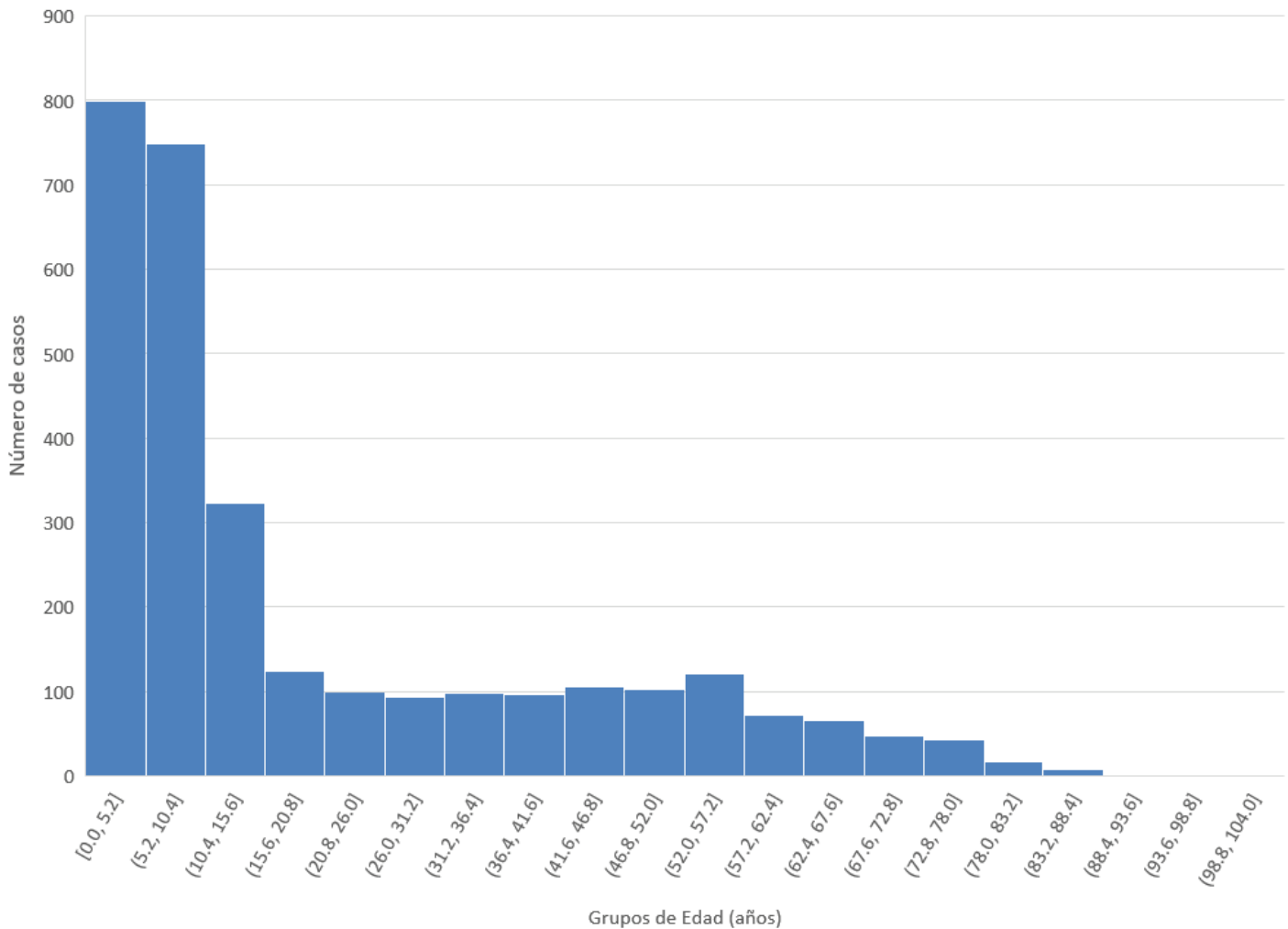


Figura 2

Distribución automática por grupos de edad (años) de los casos evaluados, toxocariasis, Instituto de Medicina Tropical, 2011-2016

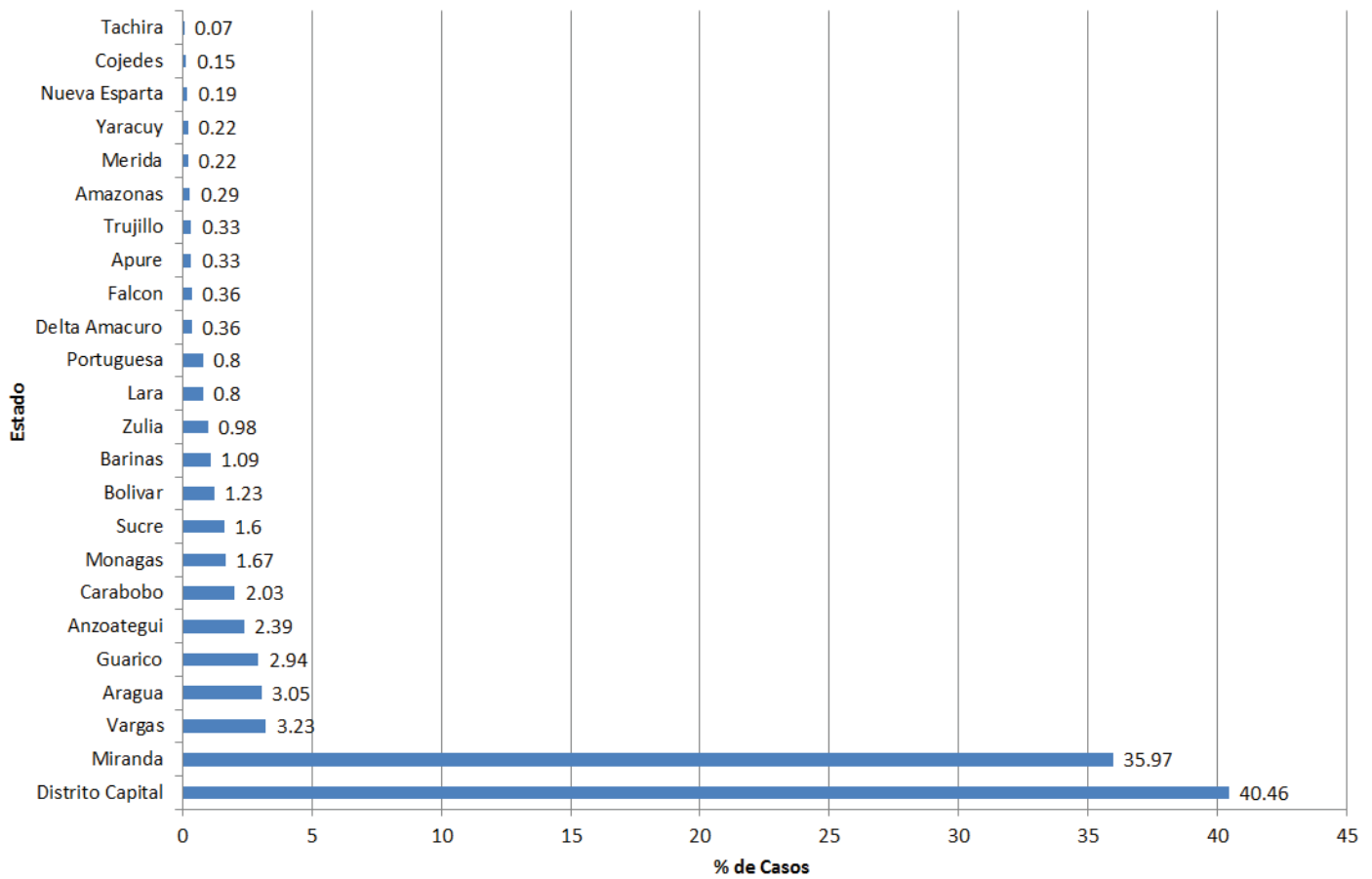


Figura 3
Procedencia de los casos de toxocariasis por estados del país, Instituto de Medicina Tropical, 2011-2016.

DISCUSIÓN

La toxocariasis continúa siendo un importante problema de salud pública²³⁻²⁶. Como agente causal del síndrome de *larva migrans visceral* y del síndrome de *larva migrans ocular*^{18, 21, 27, 28}, *Toxocara canis* y *Toxocara cati*, producen un amplio espectro clínico que aún precisa ser mejor clarificado. Esta infección zoonótica representa un considerable reto diagnóstico para el clínico y en tal sentido, las técnicas de diagnóstico inmunológico proveen en los actuales momentos el único medio para poder identificar casos especialmente agudos y crónicos^{4, 29-32}.

El presente estudio representa un importante esfuerzo en cuanto al número de casos incluidos, más de 2500 evaluados inmunológicamente durante 6 años en el principal centro de referencia para el diagnóstico de esta patología en el país. Consistente con lo reportado en la literatura científica internacional, la edad promedio de los casos en este trabajo, estuvo

por debajo de 21 años de edad, siendo más de la mitad de los casos menores de 10 años^{21, 33}.

En el Instituto de Medicina Tropical se pudo llevar a cabo el diagnóstico a través de ELISA así como, Western-blot y de la técnica de avidin de anticuerpos IgG1, 2. De acuerdo con las características clínicas y de laboratorio de la infección, los valores promedios de eosinofilia estuvieron alrededor del 22%, siendo significativamente mayores en aquellos que fueron ELISA positivos^{2, 33}. Es de notar que el número de casos atendidos en el tiempo ha disminuido considerablemente desde el año 2011 y 2012 hasta el año 2015. Finalmente, es de destacar los resultados, que a pesar de corresponder más del 40% de los casos a pacientes que proceden del Distrito Capital, existe una amplia variedad de procedencias de prácticamente todos los estados en el territorio nacional^{1-3, 34-41}.

Para la toxocariasis, existe actualmente un importante esfuerzo en incrementar las técnicas serológicas

para la detección de anticuerpos anti-*Toxocara canis*^{1, 3, 4, 19, 20, 22, 35, 42}, que se basen en antígenos de excreción y secreción (TES) con ELISA y Western-blot (Cuadro 1), entre otros²¹.

En este contexto existe una clara necesidad de incrementar los estudios serológicos tanto en Venezuela, como en otros países de la región donde revisiones recientes indican que existe una carencia de datos que permitan estimar con mayor precisión la seroprevalencia en humanos así como la prevalencia en suelos y en animales^{1, 3, 4, 18, 21, 22, 34, 38, 39}.

Cuadro 1.

Técnicas serológicas para la detección de anticuerpos anti-*T. canis*²¹.

Técnica	Propósito y desempeño
IgG-TES-WB	Detección específica de IgG total en suero humano, con alta especificidad y menor reacción cruzada.
IgG-TES-ELISA	Detección específica de IgG total en suero humano, con sensibilidad de 97% y especificidad de 36%
IgG1-TES-ELISA	Detección específica de subclase IgG1 en suero humano, con sensibilidad de 60% y especificidad de 76%
IgG2-TES-ELISA	Detección específica de subclase IgG2 en suero humano, con sensibilidad de 98% y especificidad de 71%
IgG3-TES-ELISA	Detección específica de subclase IgG3 en suero humano, con sensibilidad de 78% y especificidad de 81%
IgG4-TES-ELISA	Detección específica de subclase IgG4 en suero humano, con sensibilidad de 64% y especificidad de 71%
IgG4-rTES-ELISA (rTES-30USM, rTES-120)	Detección específica de subclase IgG4 en suero humano, con sensibilidad de 93% y especificidad incrementada
IgM/G-TES-ELISA (TES-58 and TES-68)	Detección específica de IgG o IgM en suero humano, con sensibilidad de 100% y especificidad de 100%
IgG-TCLA-ELISA	Detección específica de IgG total en suero humano, con sensibilidad de 92% y especificidad de 87%
IgG-dTES-ELISA	Detección específica de IgG total en suero humano, con sensibilidad de 100% y especificidad de 100%

IgG-dTES-WB	Detección específica de IgGtotal en suero humano, sin reacción cruzada con las fracciones 32 kDa, 55 kDa, y 70 kDadel dTES
Avidez de IgG	Medición del índice de avidéz IgGen suero humano, con sensibilidad de 44% y especificidad de 83%
IgG-DiM-BSA-ELISA	Detección específica de IgGtotal en suero humano, con sensibilidad de 92% y especificidad de 95%

Se requiere desarrollar consensos para el diagnóstico de la toxocariasis en humanos⁴, seguir mejorando la disponibilidad de pruebas diagnósticas y precisar en cuanto al espectro de manifestaciones clínicas^{1, 3, 19, 20}, no solamente aquellos de presentación visceral sino también de presentación ocular y finalmente continuar en el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento^{22, 35, 42}. Como se ha venido adelantando en años recientes, es importante también mencionar a la luz de estos resultados y dado al gran volumen de casos reportados en 6 años que se necesita incrementar el conocimiento por parte del personal de salud sobre esta enfermedad. Estudios recientes han reportado que menos de la mitad de los especialistas conocen correctamente cómo hacer el diagnóstico clínico y de laboratorio de esta patología⁴³.

La toxocariasis puede considerarse una patología desatendida y como tal deben profundizarse los estudios a nivel epidemiológico, clínico, terapéutico y también preventivo. A nivel diagnóstico, particularmente la biología molecular, con el uso de la PCR⁴⁴⁻⁵⁹, para la identificación de las infecciones por *Toxocara*, son una clara necesidad en Venezuela y otros países de la región.

REFERENCIAS

1. DELGADO O, ROSAS-BUSTAMANTE J, ORTEGOZA J, DUARTE E, CORASPE V, RIVAS M, SILVA S, RODRIGUEZ-MORALES AJ. Acute cases of toxocariasis classified by IGG antibodies avidity in Venezuela. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 2011;41:611-4.
2. MARTINEZ M, GARCIA H, FIGUERA L, GONZALEZ V, LAMAS F, LOPEZ K, MIJARES V, CORRALES Y, LARES M, FERRER E. Seroprevalence and risk factors of toxoca-

- riasis in preschool children in Aragua state, Venezuela. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2015;109:579-88.
3. DELGADO O, RODRIGUEZ-MORALES AJ. Aspectos clínico-epidemiológicos de la toxocariasis: una enfermedad desatendida en Venezuela y América Latina. *Bol Malarial Salud Ambient* 2009;49:1-33.
 4. RODRIGUEZ-MORALES AJ, ECHEVERRI-CATANO LF, DELGADO O. Need for a consensus in the diagnosis of human toxocariasis: implications for the Latin American public health. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública* 2011;28:161-2.
 5. FILLAUX J, SANTILLAN G, MAGNAVAL JF, JENSEN O, LARRIEU E, SOBRINO-BECARIA CD. Epidemiology of toxocariasis in a steppe environment: the Patagonia study. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2007;76:1144-7.
 6. GILLESPIE SH. The epidemiology of *Toxocara canis*. *Parasitology today* 1988;4:180-2.
 7. HALSBY K, SENYONJO L, GUPTA S, LADBURY G, SUVARI M, CHIODINI P, MORGAN D. Epidemiology of Toxocariasis in England and Wales. *Zoonoses and public health* 2016;63:529-33.
 8. O'LORCAIN P. Epidemiology of *Toxocara* spp. in stray dogs and cats in Dublin, Ireland. *Journal of helminthology* 1994;68:331-6.
 9. OVERGAAUW PA. Aspects of *Toxocara* epidemiology: human toxocarosis. *Critical reviews in microbiology* 1997;23:215-31.
 10. OVERGAAUW PA. Aspects of *Toxocara* epidemiology: toxocarosis in dogs and cats. *Critical reviews in microbiology* 1997;23:233-51.
 11. TAYLOR MR. The epidemiology of ocular toxocariasis. *Journal of helminthology* 2001;75:109-18.
 12. CELLA W, FERREIRA E, TORIGOE AM, MACCHIAVERNI-FILHO N, BALARIN V. Ultrasound biomicroscopy findings in peripheral vitreoretinal toxocariasis. *European journal of ophthalmology* 2004;14:132-6.
 13. CLARKE HM, HINDE FR, MANNS RA. Case report: hepatic ultrasound findings in a case of toxocariasis. *Clinical radiology* 1992;46:135-6.
 14. GEORGIU C, EFSTATHIADES Y, DIMITRIOU N, THEOPHANOUS M, VOROS D. An unusual case of *Toxocara canis* of the ascending colon. *European journal of gastroenterology & hepatology* 2007;19:1149-53.
 15. SAKAI S, SHIDA Y, TAKAHASHI N, YABUUCHI H, SOEDA H, OKAFUJI T, HATAKENAKA M, HONDA H. Pulmonary lesions associated with visceral larva migrans due to *Ascaris suum* or *Toxocara canis*: imaging of six cases. *Ajr* 2006;186:1697-702.
 16. TEMPLETON PA, RAO KC. Computed tomography of *Toxocara canis* endophthalmitis. *The Journal of computed tomography* 1987;11:99-101.
 17. WAN WL, CANO MR, PINCE KJ, GREEN RL. Echographic characteristics of ocular toxocariasis. *Ophthalmology* 1991;98:28-32.
 18. ZYOUD SEH. Global toxocariasis research trends from 1932 to 2015: a bibliometric analysis. *Health Research Policy and Systems* 2017;15:14.
 19. MARTINEZ-PULGARIN DF, MUNOZ-URBANOM, GOMEZ-SUTA LD, DELGADO OM, RODRIGUEZ-MORALES AJ. Ocular toxocariasis: new diagnostic and therapeutic perspectives. *Recent patents on anti-infective drug discovery* 2015;10:35-41.
 20. BOLÍVAR-MEJÍA A, RODRÍGUEZ-MORALES AJ, PANIZ-MONDOLFI AE, DELGADO O. [Cardiovascular manifestations of human toxocariasis]. *Archivos de cardiología de México* 2013;83:120-9.
 21. MA G, HOLLAND CV, WANG T, HOFMANN A, FAN CK, MAIZELS RM, HOTEZ PJ, GASSER RB. Human toxocariasis. *The Lancet Infectious diseases* 2017.
 22. BOLÍVAR-MEJÍA A, ALARCÓN-OLAVE C, CALVO-BETANCOURT LS, PANIZ-MONDOLFI A, DELGADO O, RODRÍGUEZ-MORALES AJ. Toxocariasis in the Americas: Burden and Disease Control. *Current Tropical Medicine Reports* 2014;1:62-8.
 23. FISHER M. *Toxocara cati*: an underestimated zoonotic agent. *Trends Parasitol* 2003;19.
 24. SCHANTZ PM. *Toxocara larva migrans* now. *Am J Trop Med Hyg* 1989;41.
 25. NICOLETTI A. Toxocariasis. In: García HH, Tanowitz HB, Brutto OH, editors. *Neuroparasitology and Tropical Neurology*; 2013.
 26. LEE RM, MOORE LB, BOTTAZZI ME, HOTEZ PJ. Toxocariasis in North America: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;8.
 27. HOLLAND CV. Knowledge gaps in the epidemiology of *Toxocara*: the enigma remains. *Parasitology* 2017;144.
 28. SHIELDS JA. Ocular toxocariasis. A review. *Surv Ophthalmol* 1984;28.
 29. MAGNAVAL JF, FABRE R, MAURIERES P, CHARLET JP, LARRARD B. Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitol Res* 1991;77.
 30. RUBINSKY-ELEFANT G, HIRATA CE, YAMAMOTO JH, FERREIRA MU. Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. *Ann Trop Med Parasitol* 2010;104.
 31. JACQUIER P, GOTTSTEIN B, STINGELIN Y, ECKERT J. Immunodiagnosis of toxocarosis in humans: evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. *J Clin Microbiol* 1991;29.
 32. SAVIGNY DH, VOLLER A, WOODRUFF AW. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *J Clin Pathol* 1979;32.
 33. BEAVER PC, SNYDER CH, CARRERA GM, DENT JH, LAFERTY JW. Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans; report of three cases. *Pediatrics* 1952;9.
 34. LYNCH NR, HAGEL I, VARGAS V, ROTUNDO A, VARELA MC, DI PRISCO MC, HODGEN AN. Comparable seropositivity for ascariasis and toxocariasis in tropical slum children. *Parasitology research* 1993;79:547-50.
 35. DELGADO O, BOTTO C, MATTEI R, ESCALANTE A. Effect of albendazole in experimental toxocariasis of mice. *Annals of tropical medicine and parasitology* 1989;83:621-4.

36. GARCÍA-PEDRIQUE ME, DÍAZ-SUÁREZ O, ESTEVEZ J, CHENG-NG R, ARAUJO-FERNÁNDEZ M, CASTELLANO J, ARAUJO J, CABRERA L. [Prevalence of infection by *Toxocara* in schoolchildren in the community of El Mojan, Zulia state, Venezuela]. *Investigación clínica* 2004;45:347-54.
37. ARAUJO Z, BRANDES S, PINELLI E, BOCHICHIO MA, PALACIOS A, WIDE A, RIVAS-SANTIAGO B, JIMÉNEZ JC. Seropositivity for ascariasis and toxocarosis and cytokine expression among the indigenous people in the Venezuelan Delta region. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 2015;57:47-55.
38. LYNCH NR, EDDY K, HODGEN AN, LÓPEZ RI, TURNER KJ. Seroprevalence of *Toxocara canis* infection in tropical Venezuela. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1988;82:275-81.
39. LYNCH NR, WILKES LK, HODGEN AN, TURNER KJ. Specificity of *Toxocara* ELISA in tropical populations. *Parasite immunology* 1988;10:323-37.
40. GIULIARI GP, RAMÍREZ G, CÓRTEZ RT. Surgical treatment of ocular toxocarosis: anatomic and functional results in 45 patients. *European journal of ophthalmology* 2011;21:490-4.
41. DEVERA R, BLANCO Y, HERNÁNDEZ H, SIMOES D. [*Toxocara* spp. and other helminths in squares and parks of Ciudad Bolívar, Bolívar State (Venezuela)]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 2008;26:23-6.
42. DELGADO OM, FERNÁNDEZ G, SILVA S, RAMÍREZ O, ROMERO J, RODRÍGUEZ-MORALES AJ. Preliminary evidence of nitazoxanide activity on *Toxocara canis* in a mouse model. *International journal of antimicrobial agents* 2008;31:182-4.
43. WOODHALL DM, GARCÍA AP, SHAPIRO CA, WRAY SL, SHANE AL, MANI CS, STIMPERT KK, FOX LM, MONTGOMERY SP. Assessment of U.S. Pediatrician Knowledge of Toxocarosis. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2017.
44. BORECKA A, GAWOR J. Modification of gDNA extraction from soil for PCR designed for the routine examination of soil samples contaminated with *Toxocara* spp. eggs. *Journal of helminthology* 2008;82:119-22.
45. DEMELER J, RAMUNKE S, WOLKEN S, IANIELLO D, RINALDI L, GAHUTU JB, CRINGOLI G, VON SAMSON-HIMMELSTJERNA G, KRUCKEN J. Discrimination of gastrointestinal nematode eggs from crude fecal egg preparations by inhibitor-resistant conventional and real-time PCR. *PloS one* 2013;8:e61285.
46. DURANT JF, IRENGE LM, FOGT-WYRWAS R, DUMONT C, DOUCET JP, MIGNON B, LOSSON B, GALA JL. Duplex quantitative real-time PCR assay for the detection and discrimination of the eggs of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* (Nematoda, Ascaridoidea) in soil and fecal samples. *Parasites & vectors* 2012;5:288.
47. EPE C, MEUWISSEN M, STOYE M, SCHNIEDER T. Transmission trials, ITS2-PCR and RAPD-PCR show identity of *Toxocara canis* isolates from red fox and dog. *Veterinary parasitology* 1999;84:101-12.
48. JACOBS DE, ZHU X, GASSER RB, CHILTON NB. PCR-based methods for identification of potentially zoonotic ascaridoid parasites of the dog, fox and cat. *Acta tropica* 1997;68:191-200.
49. JEFFERIES R, MORGAN ER, HELM J, ROBINSON M, SHAW SE. Improved detection of canine *Angiostrongylus vasorum* infection using real-time PCR and indirect ELISA. *Parasitology research* 2011;109:1577-83.
50. KHADEMVAATAN S, RAHIM F, TAVALLA M, ABDIZADEH R, HASHEMITABAR M. PCR-based molecular characterization of *Toxocara* spp. using feces of stray cats: a study from Southwest Iran. *PloS one* 2013;8:e65293.
51. KNAPP J, UMHANG G, POULLE ML, MILLON L. Development of a Real-Time PCR for a Sensitive One-Step Coprodiagnosis Allowing both the Identification of Carnivore Feces and the Detection of *Toxocara* spp. and *Echinococcus multilocularis*. *Applied and environmental microbiology* 2016;82:2950-8.
52. KRAMER F, VOLLRATH T, SCHNIEDER T, EPE C. Improved detection of endoparasite DNA in soil sample PCR by the use of anti-inhibitory substances. *Veterinary parasitology* 2002;108:217-26.
53. LI MW, LIN RQ, CHEN HH, SANI RA, SONG HQ, ZHU XQ. PCR tools for the verification of the specific identity of ascaridoid nematodes from dogs and cats. *Molecular and cellular probes* 2007;21:349-54.
54. MIKAEILI F, MATHIS A, DEPLAZES P, MIRHENDI H, BARAZESH A, EBRAHIMI S, KIA EB. Differentiation of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* based on PCR-RFLP analyses of rDNA-ITS and mitochondrial *cox1* and *nad1* regions. *Acta parasitologica* 2017;62:549-56.
55. NAKANO S, SUGITA S, TOMARU Y, HONO A, NAKAMURO T, KUBOTA T, TAKASE H, MOCHIZUKI M, TAKAHASHI M, SHIMIZU N. Establishment of Multiplex Solid-Phase Strip PCR Test for Detection of 24 Ocular Infectious Disease Pathogens. *Investigative ophthalmology & visual science* 2017;58:1553-9.
56. NORHAIDA A, SUHARNI M, LIZA SHARMINI AT, TUDA J, RAHMAH N. rTES-30USM: cloning via assembly PCR, expression, and evaluation of usefulness in the detection of toxocarosis. *Annals of tropical medicine and parasitology* 2008;102:151-60.
57. PINELLI E, ROELFSEMA JH, BRANDES S, KORTBEEK T. Detection and identification of *Toxocara canis* DNA in bronchoalveolar lavage of infected mice using a novel real-time PCR. *Veterinary parasitology* 2013;193:337-41.
58. UMHANG G, BASTIEN M, RENAULT C, FAISSE M, CAILLOT C, BOUCHER JM, HORMAZ V, POULLE ML, BOUE F. A flotation/sieving method to detect *Echinococcus multilocularis* and *Toxocara* spp. eggs in soil by real-time PCR. *Parasite* 2017;24:28.
59. YU H, HUANG B, ZHUO X, CHEN X, DU A. Evaluation of a real-time PCR assay based on the single-copy *SAG1* gene for the detection of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary parasitology* 2013;197:670-3.

Histoplasmosis en Venezuela: un enemigo no sospechado

Sofía Mata-Essayag¹,
María Eugenia Landaeta¹,
Rommie Merino¹,
Liseloth Garrido²,
David Mota²,
Jacinto Pineda²,
María Teresa Colella¹,
Vanessa Pineda¹,
Antonio Serrano¹,
Saúl Quijada¹,
María Elena Savino¹,
Jesús Dawaher¹,
Omar Linares³,
Elías Kassisse⁴,
Sylvia Magaldi¹,
Jessica Martínez¹

¹ Sección de Micología Médica, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela.

² Instituto de Anatomía Patológica "Dr. José A. O' Daly". Universidad Central de Venezuela

³ Universidad Simón Bolívar

⁴ Hospital "Santos Dominici", Carúpano, estado Sucre.
mariaeugenialandaeta1@gmail.com

RESUMEN

Se recopilan evidencias con respecto a la epidemiología de la histoplasmosis, obtenidas durante los últimos 70 años en Venezuela, extraídas de los diferentes estudios realizados en el país, en los cuales se demuestra la existencia de esta micosis en nuestro medio. El objetivo fue estimular el interés entre nuestros médicos, por la búsqueda de esta micosis.

Palabras clave: Histoplasmosis; *Histoplasma capsulatum*; epidemiología; histoplasmina; micosis endémicas

HISTOPLASMOSIS IN VENEZUELA: AN UNSUSPECTED ENEMY

ABSTRACT

Evidence related to the epidemiology of histoplasmosis during the last 70 years in Venezuela is gathered, extracted from several studies performed in the country, in which the presence of the disease is demonstrated. The aim was to raise the awareness of our physicians for the search of the mycosis.

Key words: Histoplasmosis; *Histoplasma capsulatum*; epidemiology; histoplasmine; endemic mycosis

INTRODUCCIÓN

La histoplasmosis es una enfermedad granulomatosa, producida por un hongo dimorfo *Histoplasma capsulatum* (Hc). Fue descubierta por Darling, un anatomopatólogo norteamericano en Panamá en 1905 (Rippon 1988). Tiene una distribución geográfica amplia, con grandes variaciones en su incidencia en los diferentes países. En América Latina, las áreas de mayor prevalencia se encuentran en Venezuela, Colombia, Brasil, Argentina, Ecuador, Paraguay, Perú México y Uruguay. En América del Norte, los valles de los ríos Mississippi y Ohio se cuentan entre las principales áreas afectadas. En África, se observa en la región Sub-Sahariana. Es endémica en el suroeste de Asia y China. En Europa se han reportado pocos casos (Bahr et al, 2015 y Wheat 2016).

Datos epidemiológicos actuales han identificado una tendencia ascendente en la incidencia de histoplasmosis en Venezuela y otros países (Mata-Essayag et al 2008, Bahr et al, 2015, Wheat 2016), siendo

una de las micosis endémicas más frecuente en la población general en nuestro país y la más importante en niños (Albornoz 1985, De Sousa 1987, Castro et al 1990, Vargas 1997, Mata-Essayag et al 2006, López et al 2016)

Esta enfermedad ha emergido como problema en muchas áreas urbanas a pesar de haber sido considerada por años como una micosis de las comunidades rurales. (Vargas 1997, Mata-Essayag et al 2008) Esta variación en la epidemiología, pudiera ser una consecuencia del cambio climático y de la contaminación ambiental, causada por remoción de grandes cantidades de tierra, ocasionada por deslaves durante las épocas de lluvia, construcción de túneles del metro, sistema ferroviario y grandes complejos habitacionales en las ciudades. Sin dejar de mencionar además, las condiciones socioeconómicas deficientes de la población (desnutrición y estrés) y por último, la migración de aves y murciélagos desde su hábitat natural, como consecuencia de la tala y deforestación de áreas aledañas a las zonas urbanas. Este dato es importante, si se toma en cuenta que *Hc* vive en el suelo enriquecido con deyecciones de aves, murciélagos y quizás de otros animales (Emmons 1950, Conant 1972, Rippon 1988)

Cabe destacar, que la epidemia de SIDA ha aumentado considerablemente la incidencia de esta micosis en Venezuela y en otras partes del mundo y ha traído a la luz muchas áreas geográficas en donde no se sabía que la histoplasmosis era endémica. Han sido reportados casos en estas regiones, haciendo que la distribución de la histoplasmosis se expanda (Bahr et al, 2015, Wheat 2016). Desde 1987, esta micosis está incluida entre las infecciones marcadoras de SIDA, y en Venezuela juega un papel muy importante como coinfección en los pacientes VIH/SIDA (Landaeta-Nezer et al 2015)

El espectro de presentaciones de la enfermedad es una consecuencia de las relaciones entre diversos factores, tales como el tamaño del inóculo, el grado de exposición a las conidias del hongo y las condiciones del huésped (Rippon 1988).

En Venezuela, nuestro conocimiento acerca de

la incidencia real de la infección y de la enfermedad es deficiente, entre otras causas debido a que sus manifestaciones clínicas son poco características y muy variables, a la escasa información que tienen las instituciones de salud pública sobre esta entidad y a la pobre información de los médicos en temas de micología.

La intención de esta revisión es suministrar datos acerca de la epidemiología de esta micosis, obtenidos de diferentes estudios realizados en el país, en los cuales se evidencia la existencia de la histoplasmosis en nuestro medio, con la intención de elevar el índice de sospecha de la misma en nuestros profesionales de la salud.

EPIDEMIOLOGÍA

Histoplasma capsulatum es un hongo que posee un dimorfismo térmico. La forma de moho se encuentra en el medio ambiente, en la tierra, casi siempre a 20 cm de la superficie, a temperaturas que oscilan entre 20 y 28 °C y la forma de levadura en los tejidos de animales parasitados, generalmente en el interior de las células del sistema macrofágico fijo (Rippon 1988).

En la naturaleza, *Hc* crece en suelos que contienen abundantes cantidades de nitrógeno y fósforo, asociado esto a lugares con excrementos parcialmente descompuestos de palomas, guacharacas, gallinas, guacamayas, zamuros, murciélagos y quizás de otros animales, por lo cual es posible encontrarlo en gallineros, cuevas, agujeros de árboles y en los llamados “ambientes abiertos”, los cuales son zonas asociadas igualmente a las excretas de aves y murciélagos. En este tipo de ambiente juega un papel determinante la desecación y la diseminación de los aerosoles infectantes por el viento. Desde el punto de vista epidemiológico es importante porque puede aclarar el origen de brotes epidémicos urbanos (Ajello 1961, Wheat 1992, Taylor et al 1997).

Hc requiere de condiciones especiales de temperatura, humedad y precipitaciones. Por esta causa, se ha señalado que pertenece al grupo de las micosis de distribución geográfica, entre las cuales

se encuentran también la paracoccidiodomicosis y coccidiodomicosis. Las condiciones para su desarrollo son temperatura entre 22 y 29° C, humedad de 67 a 87% y un promedio de precipitación anual de 1000mm (Rippon 1988) Cuando se alteran estos ambientes, las conidias se volatilizan y pueden viajar varios kilómetros. Los seres humanos y otros animales se infectan por inhalación de las microconidias y fragmentos de hifas libres en el ambiente, principalmente por vía inhalatoria. Se ha descrito también la transmisión transplacentaria, traumática por accidente laboral en laboratorios de diagnóstico y por vía digestiva (Rippon 1988, Carlucci 2016).

Los brotes epidémicos se han relacionado con actividades que alteran el nicho ecológico y la formación de aerosoles del hongo, tales como movimientos telúricos, limpieza de locales abandonados, tala de árboles, construcciones de viviendas y sistemas ferroviarios, recolección de guano, minería y la espeleología, entre otras. Una exposición repetida a cantidades abundantes de conidias en ambientes cerrados puede resultar letal, mientras que las exposiciones moderadas provocan infecciones de gravedad variable, que dependen de la naturaleza de la inmunidad del individuo (desnutrición, inmunocompromiso, inmunosenescencia) (Rippon 1988, Wheat et al 2016).

Histoplasma capsulatum es un microorganismo con gran capacidad de producir infección, pero de baja patogenicidad y virulencia, por lo que no es tan frecuente la enfermedad en personas inmunocompetentes (Wheat et al 2016).

La puerta de entrada es el tracto respiratorio, desde donde se inicia una infección primaria, por lo general autolimitada y benigna. El individuo infectado porta los microorganismos durante muchos años después de esta primoinfección, sin presentar signos ni síntomas de enfermedad. En áreas endémicas se infectan tanto animales domésticos como silvestres con *Hc*, hecho comprobado en perros, gatos, ovinos, porcinos, ratas caseras y de los tejados, hurones, ratones, mofetas, zarigüeyas, zorros, mapaches y marmotas. El índice de infección varía según la localización geográfica y la especie animal. En Missouri se

encontró reacción positiva a histoplasmina en 73% de equinos, 34% de ovinos, 12% de bovinos y 12% de porcinos (Conant 1972). Emmons aisló *Hc* a partir de ganglios linfáticos mediastínicos en 44% aproximadamente de 50 perros y 50 gatos en Loudoun County, Virginia. En los animales son raras las infecciones espontáneas mortales que se observan en el hombre, pero el perro parece ser más susceptible (Emmons, 1950). En este sentido, en la Sección de Micología Médica hemos diagnosticado recientemente 4 perros con histoplasmosis.

La histoplasmosis es usualmente subclínica, excepto en pacientes inmunocomprometidos, tales como los enfermos de SIDA, con enfermedades hemato-oncológicas, receptores de trasplantes de órganos, desnutridos, lactantes, escolares, embarazadas y ancianos (Mata-Essayag et al 2006, Mata-Essayag 2008, Landaeta-Nezer et al 2015, Landaeta et al 2016).

La infección por *Hc* causa un amplio espectro de manifestaciones clínicas, desde una enfermedad catarral parecida a la gripe, hasta la enfermedad pulmonar cavitaria crónica y en algunos casos, formas diseminadas. Aunque estas últimas pueden comprometer la vida del paciente, la mayoría de los individuos se recuperan sin presentar complicaciones cuando son tratados oportunamente (Wheat et al 2016).

El conocimiento actual acerca de la distribución de este hongo y de la enfermedad que produce en todo el mundo y en Venezuela, se basa principalmente en las pruebas de hipersensibilidad a la histoplasmina, con información complementaria del aislamiento del hongo en los suelos, estudios de casos clínicos y autopsias. Muchos de los estudios fueron conducidos en el período 1950-1970. Sin embargo en la actualidad, a pesar de los pocos trabajos realizados, los datos obtenidos sugieren que se mantienen los mismos encontrados en el siglo pasado y recientemente en algunas regiones se ha observado el incremento de la micosis o emergencia de la misma. (Mata-Essayag 2008, Landaeta-Nezer 2015, Bahr et al 2015).

EVIDENCIAS DE LA ENDEMICIDAD EN VENEZUELA.

a) Pruebas intradérmicas de histoplasmina.

En Venezuela se conoce la histoplasmosis, desde 1949 por Campins y Scharyj cuando realizaron la primera encuesta epidemiológica en escolares de Barquisimeto, la cual reflejó que 13,7% de los individuos estudiados habían tenido una exposición anterior al hongo, comprendiendo casos tuberculino negativos con calcificaciones en la radiografía de tórax (Campins et al 1950), también fueron descritos en 1945 por Christie y Paterson y en 1946 por Palmer en USA, quienes habían observado calcificaciones pulmonares en sujetos negativos a la tuberculina e histoplasmina positivos, este es el primer indicio de que la histoplasmosis es una enfermedad común y además benigna en la mayoría de los casos (Rippon 1988).

Se suceden entonces encuestas epidemiológicas que demuestran la infección en personas procedentes de distintas regiones del país, entre las más importantes tenemos: Pollak en 1953 informa de la positividad a la histoplasmina en alumnas de la escuela de enfermeras de Caracas, provenientes de diferentes zonas del país, que alcanza hasta un 35,6% (Baldó et al 1961). En 1954 Murzi y Galindo, en 999 pruebas realizadas en escolares menores de 15 años en el Edo. Táchira, consiguen un 18,34% de positividad en San Cristóbal y 29.4% en Rubio (Vargas 1997). Moncada y col en Mérida en 1957 obtuvieron un 25% de sensibilidad a histoplasmina (Baldó et al 1961), cifra corroborada por Salfelder y col. en 1964 cuando al revisar 244 autopsias encuentran que el 25% presentaban lesiones histoplasmósicas pulmonares y/o ganglionares residuales (Salfelder et al 1965). Príncipe y col. en 1959, en un estudio que abarcó a 40.000 personas a nivel de gran parte del territorio nacional, con diferentes edades, conjuntamente con estudios radiológicos, para investigar la presencia de calcificaciones o infiltrados en pulmón, encontraron un alto porcentaje de reactores a la histoplasmina, en zonas consideradas de alta endemicidad, como son la región minera de El Callao, con 89% de pruebas

positivas, siendo igualmente altos los resultados en Corobal 63.6% (Alto Ventuari), Cumanacoa con 60.1% (Edo. Sucre), Perijá 56.1% (Edo Zulia), Chivacoa 53% (Edo. Yaracuy) y Tacarigua 50.5% (Edo. Carabobo); sin embargo, en los demás estados evaluados, Táchira, Mérida, Lara, Apure, Aragua y Dto. Federal para ese entonces, también fue evidente la prevalencia de esta micosis (Príncipe et al 1961).

De Sousa en el año 1987, evidencia en niños menores de 6 años una positividad de 9% en Santa Teresa del Tuy (estado Miranda) (De Sousa 1987), cifras similares a las encontradas por Castro y col. en Tinaquillo (estado Cojedes) en 1989, con 8.2% (Castro et al 1990). En contraste, Rodríguez y col. en 1986, en Zipayare, costa oriental, Edo. Zulia, encontraron una cifra más alta en niños lactantes y escolares, de un 37.5% y en la Guajira Mesa y col., el mismo año en 386 estudiantes de educación media, encontraron 77.1%. (Rodríguez et al 1986, Mesa et al 1986).

Albornoz y Vargas en 1987, estudiando el caserío La Culebra en el Alto Orinoco, en el estado Amazonas, encuentran una positividad del 45% (Vargas et al 1987). Igualmente Albornoz en 1994 estudia la población del municipio foráneo Las Ollas de Caracate (estado Aragua) y encuentra un 61% de reactividad (Albornoz 1994). Recientemente, Cermeño y col. en 2004 reportan un 42.7% de positividad a la histoplasmina en Monte Ralo, comunidad rural del estado Bolívar (Cermeño 2004).

Kassisse y col., en El Mayar (Edo, Sucre) en 2015, posterior a un brote de histoplasmosis aguda en escolares, detectan una prevalencia de 27,9% en las personas evaluadas de la localidad y un 33,7% en Cariaco (Edo. Sucre) (Datos en publicación)

Estas encuestas han permitido tener una idea del grado de exposición al hongo, de algunos grupos etarios y de la población general. Estos estudios de prevalencia realizados en todo el territorio nacional, evidencian que existe aproximadamente entre un 50 a 60% de positividad en la población venezolana aparentemente sana (Albornoz 1990).

Al referirnos a las micosis en Venezuela, es preciso hablar de infección subclínica y de enfermedad.

Si aceptamos que la infección se caracteriza por la presencia de calcificaciones localizadas en regiones parahiliares o bases pulmonares, acompañadas de una prueba de histoplasmina positiva, tenemos que admitir que *Histoplasma capsulatum* es el hongo que origina el mayor número de casos de infección subclínica y el de más amplia distribución geográfica en nuestro país (Vargas 1990).

b) Aislamiento del hongo

El aislamiento de *H. capsulatum* en el suelo, realizado por Emmons en 1948, revela la fuente de la infección de la histoplasmosis, en humanos y animales (Emmons 1949). El descubrimiento del hongo en el aire efectuado por Ibach y col. en 1954 apoyó la hipótesis de que el aire era el vehículo por medio del cual se diseminaban las conidias desde su reservorio en el suelo, entonces la inhalación de estos aerosoles por hombres y animales susceptibles conducían a la infección. (Ibach et al 1954).

Emmons en 1961 aísla el hongo, en el suelo en las cercanías de un centro comercial en Washington DC y alertó acerca del peligro que esto representaba para visitantes del centro, vendedores y personal que laboraban en las oficinas del mismo, quienes se exponían diariamente al viento con polvo que transportaba los fragmentos de hifas y las conidias del hongo, este aporte representa quizás el primer aislamiento en un espacio abierto. (Emmons, 1961). Desde entonces el hallazgo ha sido confirmado cientos de veces en zonas endémicas alrededor del mundo, incluyendo Venezuela.

En 1954 Campins y col. aíslan el hongo por primera vez en Venezuela en la cueva La Vieja en Sanare, Edo. Lara (Campins et al 1955), posteriormente fue aislado por Borelli en 1957 en los alrededores de Caracas, en el patio de la hacienda La Urbina-Petare (Edo. Miranda) (Borelli 1957). Montemayor y col. en 1958 en las cavernas del Peñón de Guacas (Edo. Miranda) (Baldó et al 1961), Ajello y col. en 1960 en la cueva del Guácharo (Edo Monagas) (Ajello et al 1960) y Albornoz en 1971 en Paracotos (Edo. Miranda) (Albornoz et al 1971).

En Venezuela, Cermeño y col., en 2006, refieren aislamiento de *H. capsulatum* en excretas de paloma

procedentes de varios lugares del estado Bolívar (Cermeño et al 2006).

Desde el 2009, en la Sección de Micología Médica del IMT, se han estudiado 19 muestras de guano de diferentes regiones del país. De ellas, se logró aislar Hc sólo en una, la cual provenía de una cueva en las cercanías de las playas de Carúpano.

En El Mayar Edo Sucre, Kassade y col. en 2016, como consecuencia de un brote de histoplasmosis aguda en un grupo de escolares de esa localidad, aíslan el hongo a partir de dos muestras obtenidas de los suelos de la comunidad, una proveniente de un gallinero cercano al colegio y la otra, de la tierra amontonada alrededor de un árbol ahuecado en el cual habitaban murciélagos y en su interior había gran cantidad de excretas; estas fueron extraídas para actividades ecológicas escolares, encontrándose así la fuente de contagio (Kassade et al 2016).

En Venezuela se ha comprobado que el hábitat natural de *Histoplasma capsulatum* se encuentra en el suelo de ciertas cuevas, zonas aledañas a estas y en criaderos de aves de corral. Como se mencionó anteriormente, el hábitat de aves así como el de los quirópteros son ambientes favorables para la proliferación del hongo y contribuyen a la diseminación de la enfermedad.

c) Aislamiento en murciélagos

Emmons es la primera persona que estudia la asociación de los murciélagos con la histoplasmosis y aísla *Histoplasma capsulatum* del suelo contaminado con excrementos de este quiróptero (Emmons et al 1966).

Con respecto a la histoplasmosis, los murciélagos desempeñan un doble papel, por una parte, a través de las excretas proporcionan un sustrato muy rico para el crecimiento y desarrollo del hongo en el suelo y por otro lado, debido a sus hábitos migratorios, constituyen un importante vehículo para la diseminación del hongo en la naturaleza.

En 1969, DiSalvo, Ajello y col. recopilaron informes relativos al aislamiento de Hc a partir de 20 especies de murciélagos en 10 estados de los Estados Unidos

y en el Salvador, Panamá y Colombia.(Conant 1972)

Desde 2009, se ha aislado en Venezuela *Hc* en 17 especímenes de murciélagos, de 25 evaluados hasta el momento. En 12 se obtuvo el aislamiento del hongo mediante el cultivo. En los 5 restantes la presencia incuestionable de *Histoplasma sp* en los órganos, se observó mediante el uso de las coloraciones especiales de Grocott, Giemsa y HE. Se ha encontrado que el pulmón es el órgano más afectado en el 68% de los casos, en donde se evidenció principalmente una neumonitis intersticial, signo inequívoco de alteración pulmonar a consecuencia del hongo.

Las especies en donde se encontró *Histoplasma* fueron: *Carollia perspicillata*, *Carollia brevicauda*, *Molossus molossus*, *Myotis nigricans*, *Molossus coibensis*, *Molossus bondae*, *Artibeus obscurus* y *Saccopteryx leptura*., estos quirópteros son muy comunes en Venezuela, no son de costumbres cavernícolas, tienden a formar colonias, viven en árboles bajos, suelen morar en los techos dentro de las casas, tienen hábitos alimentarios frugívoros e insectívoros, salen a comer en la noche y coexisten con el humano sin mayor problema. En la mayoría de los trabajos internacionales, los principales aislamientos de *Hc*, se han realizado en murciélagos con hábitos cavernícolas. Sin embargo, existen antecedentes de aislamientos en espacios abiertos de zonas urbanas, en donde se han registrado brotes de la enfermedad, el más importante de ellos ocurrió en Indianápolis, USA (Wheat 1992). Fernández en Cuba, aisló el hongo a partir de los órganos macerados de *Artibeus jamaicensis*, que es un quiróptero que además de habitar cuevas, vive en troncos y ramas de grandes árboles (Fernández 1988). Canteros y col., en Argentina, aislaron también el hongo de un murciélago macho de la especie *Eumops bonariensis*, urbano y no cavernícola (Canteros et al 2005).

Es importante hacer notar, que nuestros especímenes fueron suministrados por pacientes con histoplasmosis que adquirieron la enfermedad en el sitio de donde sustrajeron a los mamíferos. Todas las especies estudiadas provienen del Oriente del país, inclusive la del estado Guárico (San José de Guaribe),

zona que queda cercana al estado Anzoátegui. Aunque no se aisló el hongo de los murciélagos procedentes de este pueblo, el paciente viajaba mucho al estado Anzoátegui.

Adicionalmente, se han diagnosticado varios casos de esta enfermedad en pacientes procedentes del oriente del país, principalmente del estado Sucre, la mayoría de los cuales se presentan con manifestaciones poco frecuentes de la micosis, tales como mastitis, uveítis, osteomielitis de la cadera y huesos largos de la pierna. En muchos de estos pacientes se ha encontrado el antecedente de contacto directo con murciélagos y sus excretas. Alarmante es el caso de un niño de 2 años de edad, con histoplasmosis diseminada, diagnosticada por examen directo, cultivo y serología, quien falleció, aunque se encontraba en tratamiento con anfotericina B e itraconazol. La madre refirió como antecedente epidemiológico que los murciélagos entraban a la habitación del niño y que había encontrado guano de los mismos sobre las sábanas de su cama. Se aisló el hongo a partir de los dos murciélagos que el padre del niño trajo congelados.

d) Estudios en tejidos y autopsias.

El progreso de la micología médica nacional corre paralelo con el desarrollo de la anatomía patológica. La mayor parte de las primeras observaciones de las micosis profundas conocidas en Venezuela han sido diagnosticadas en las salas de autopsias o en los laboratorios de histopatología.

En 1953 Campins y col. confirman la enfermedad en Venezuela mediante la autopsia de un adulto residente del estado Lara quien presentó una forma generalizada de histoplasmosis (Campins et al 1953).

En 1953, Pollak, Rodríguez y Adrianza describen la primera forma clínica pulmonar con una biopsia a cielo abierto, en este momento Pollak logra el crecimiento del hongo procedente de la muestra de pulmón, en donde observaron formas cavitarias, que los autores describen como una de las primeras comunicaciones en la literatura médica, acerca de estas formas producidas por la histoplasmosis. En este paciente no se

encontró *Mycobacterium tuberculosis* (Pollak et al 1953). En 1970, Salfelder en Mérida, comunica 42 casos con lesiones diseminadas en niños con predominio en lactantes. Angulo y col. en 1985, publican 31 casos de histoplasmosis pulmonar en niños mayores de 3 años. (Vargas 1997). Igualmente interesante, es un trabajo publicado por Angulo y col. en 1985, en donde publican cuatro casos de histoplasmosis en los cuales se hizo la impresión diagnóstica de sarcoidosis en biopsia de ganglios linfáticos. Llama la atención de los autores, que en tres de los casos, el cultivo para hongos y bacterias fue negativo, además uno de los pacientes fue evaluado en USA. El diagnóstico de todos los casos en cuestión fue realizado por histopatología (Angulo et al 1985).

Merheb y García en 1991 revisan 1791 protocolos de autopsias en el IAP/UCV en un periodo de 5 años (1985-1989) y encuentran que de 66 casos con SIDA, histoplasmosis fue la micosis más frecuente en un 74% de los casos, seguida por candidiasis y criptococosis. Para estos autores, *Histoplasma capsulatum* es el hongo más frecuentemente detectado en los pacientes autopsiados con SIDA en Venezuela y adicionalmente ocupa el segundo lugar entre el grupo de pacientes inmunosuprimidos no relacionados con el VIH, comportamiento que se mantiene hasta la fecha de esta revisión (Merheb et al 1991. Mata et al, datos en publicación)

En 2016 durante la investigación de la causa de muerte de dos mujeres embarazadas que cursaron con distrés respiratorio en la ciudad de Barquisimeto (Edo Lara), en la exhumación de los cadáveres, se encontró que la causa de la muerte de una de las pacientes fue un daño alveolar difuso severo (DAD) como consecuencia de la presencia de *Histoplasma*, adicionalmente se encontró *Paracoccidioides brasiliensis*. En el otro cadáver, la mayoría de los órganos estaban alterados, producto de la putrefacción, sin embargo en el hígado se pudo observar *Histoplasma*. La embarazada era especialmente susceptible a esta micosis.

Vale la pena mencionar una paciente de 17 años con sospecha clínica de mieloma, procedente de Puerto Ayacucho, con dificultad respiratoria y

presencia a nivel de pulmón de una imagen de aspecto tumoral. Se realiza biopsia que reporta infiltrado plasmocitario abundante y levaduras intracelulares. Recibe tratamiento con quimioterapia y radioterapia, sin embargo el cuadro clínico se exagera y muere por insuficiencia ventilatoria. Las coloraciones especiales confirman la presencia de *Histoplasma* y la inmunohistoquímica demuestra policlonalidad, con lo que se descarta el diagnóstico de mieloma.

Así tenemos que la comprobación anatomopatológica de la histoplasmosis en cadáveres, constituye un método eficaz para fines epidemiológicos.

e) Epidemias de histoplasmosis en Venezuela.

Se han registrado en muchas partes del mundo epidemias de histoplasmosis pulmonar aguda, las cuales se caracterizan por la exposición de un pequeño grupo de personas a una gran cantidad de conidias, en un área pequeña y usualmente todos al mismo tiempo.

La primera epidemia de infección por *Histoplasma capsulatum* que se registró en el país fue descrita por Campins y col., en 12 escolares que visitaron la cueva de La Vieja en Sanare (Edo. Lara) en 1954, se comprobó luego la presencia de *Histoplasma capsulatum* en el suelo de la misma (Campins 1955).

En Venezuela son escasos los reportes descritos en la literatura médica. La mayoría de los brotes documentados se han relacionado con visitas a cuevas, particularmente con la cueva Alfredo Jahn, en la localidad de Birongo, Edo. Miranda y por lo tanto en espacios cerrados donde la inhalación de microconidias presentes en el suelo contaminado con excretas de aves y murciélagos es mucho más fácil. Existen registrados dos brotes, uno en el 2002 y el último en 2007 (Suarez et al 2002, Telo et al 2007)

En 2016, Kassisse y col. describen en El Mayor (Edo Sucre) una epidemia que involucró a doce estudiantes de un grupo escolar de la localidad, en donde uno de los afectados murió, se sabe que fue el que estuvo más expuesto a la fuente de contagio, la cual fue identificada. Vale la pena acotar que el escolar fallecido, estuvo acudiendo por un mes a varios

médicos de la zona, quienes nunca sospecharon de una histoplasmosis, el diagnóstico se pensó en el Hospital “Dr. Santos Aníbal Dominici” de Carúpano. Los autores consideran este reporte, como el primero descrito en Venezuela de inhalación de conidias del hongo en espacios abiertos (Kassisse et al 2016).

EL PROBLEMA

A continuación presentamos algunos problemas con los que nos enfrentamos a diario:

La mayoría de los médicos en nuestro medio considera que si se diagnostica a un paciente con histoplasmosis y no tiene VIH/SIDA, EL DIAGNÓSTICO DE HISTOPLASMOSIS ES INCORRECTO.

Desafortunadamente, la creencia actual entre muchos de nuestros profesionales de la salud es que si al paciente se le diagnostica histoplasmosis, se asume que éste tiene VIH/SIDA. El enfermo con serología negativa para VIH puede ser considerado inmunocompetente y por lo tanto es imposible que el diagnóstico de la micosis sea correcto. Existen otras causas de inmunocompromiso que también predisponen a la enfermedad por *Hc*. Los problemas de inmunodeficiencia primaria pueden presentarse por primera vez en adultos y pueden deberse a muchas causas relacionadas con el sistema inmunológico. Por otro lado, se debe considerar (debido a la situación actual en nuestro país) a la desnutrición como causa de una inmunodeficiencia adquirida, ya que afecta la diferenciación, expresión y memoria de los linfocitos T, disminuye los niveles de leptina, complemento, IgA e IgG y la activación de los macrófagos, lo cual podría predisponer a infecciones (Housson et al 2011, López et al 2016).

Si se presenta un enfermo con clínica pulmonar y con formas cavitarias,” ESO ES TUBERCULOSIS”. Por otro lado, si se observa en el estudio imagenológico de tórax, una imagen de aspecto tumoral. “ESO ES CANCER”

Es de gran importancia resaltar que la patogenia de la infección por *Hc* es similar a la de la tuberculosis, por lo cual muchas veces son confundidas o se

presentan como coinfección. Desde el siglo pasado, eminentes anatomopatólogos y neumonólogos venezolanos han descrito la formas cavitarias de la histoplasmosis (Pollak et al 1953, Baldó et al 1961, Angulo et al 1961). Con respecto a las imágenes de aspecto tumoral en tórax pensamos que deben ser bien estudiadas, lo cual incluye practicar el examen micológico, observar con especial cuidado los pacientes mayores de 60 años, fumadores, con antecedentes de contacto con tierra en algún momento de su vida, aves o murciélagos y pacientes que fueron inmigrantes, procedentes de España, Italia y Portugal, entre otros. Hemos observado recientemente algunos casos con lesiones de aspecto tumoral en la radiografía de tórax, procedentes de los países antes mencionados, cuyo diagnóstico resultó histoplasmosis

Si el paciente tiene manifestaciones clínicas atípicas, en donde no hay alteraciones pulmonares aparentes, “¿DE DONDE SACA UD ESO?”.

En medicina existen enfermedades que mimetizan otras patologías. En clínica, tradicionalmente se ha pensado que desde el punto de vista de las enfermedades inmunológicas lo hace el lupus, en las neoplásicas el linfoma, en las infecciosas la tuberculosis. En base a lo planteado anteriormente, tendríamos que colocar en esta lista también a la histoplasmosis. Se han descrito muchos tipos de síndromes producidos por el hongo, incluyendo mastitis, osteomielitis, anemia hemolítica, serositis, vasculitis, ooforitis, ganglionares, meningoencefalitis, abscesos y LOE en cerebro, sin olvidar la fiebre de origen desconocido, entre otros muchos. (Gta et al 2010, Negri et al 2012, Landaeta et al 2015, Landaeta et al 2016)

Si se diagnostica histoplasmosis en un niño de meses, “NO, UD ESTA EQUIVOCADA, ¿COMO SE INFECTO EL NIÑO?”.

En Venezuela, así como en otros países, la histoplasmosis es la micosis endémica más importante en nuestros niños lactantes, preescolares y escolares, lo certifican todas las encuestas epidemiológicas ya descritas (Albornoz 1985, De Sousa 1987, Castro et al 1990, Vargas 1997, Mata-Essayag et al 2006, López

et al 2016). La forma de contagio puede ser transplacentaria o simplemente a través de las conidias transportadas por el aire y que el niño respira tranquilo en su cama por la costumbre de nosotros los venezolanos de permanecer en nuestras casas con las ventanas abiertas, esto aún es más importante, si en las cercanías de la vivienda existe remoción de tierra por cualquier motivo.

Si el cultivo o la serología están negativos, NO ES HISTOPLASMOSIS

En la histoplasmosis, el porcentaje de positividad del cultivo es de 50 a 85% de los casos y en la serología, es de 75%. Es decir, que existe en estas dos pruebas la posibilidad de los falsos negativos. Esto depende de diversos factores. En el caso del cultivo, de la calidad de la muestra, del medio de cultivo utilizado, de la cepa que se investiga, del crecimiento de otros hongos en el cultivo que alteren el de *Hc*, entre otras causas. Con respecto a la serología, de la inmunidad del paciente, y del momento en que se tome la muestra (Wheat et al 2016). Por lo tanto, lo ideal sería que al investigar la micosis, se tomaran en cuenta los datos epidemiológicos y clínicos, además de aplicar todas las técnicas al alcance del laboratorio para realizar el diagnóstico. Cabe destacar que uno de los métodos más vilipendiados es el examen directo, el cual, en manos de un personal bien entrenado, es el que brinda mayor rendimiento. La observación microscópica requiere de una búsqueda minuciosa y del conocimiento de la morfología del hongo en el tejido. El extendido de sangre periférica, es un método excelente, de diagnóstico rápido, en el 95% de las histoplasmosis diseminadas que ocurren principalmente en lactantes, preescolares y ancianos, ayudando al inicio de un tratamiento oportuno, en la espera del resultado del cultivo (Wheat 2003).

Para finalizar, los médicos venezolanos en la actualidad, le restan importancia a la enfermedad. *Histoplasma capsulatum* es escasamente virulento, lo que no causa mayor mortalidad en personas con inmunidad conservada, sin embargo, debemos alertar acerca del aumento de la sobrevida de los pacientes inmunocomprometidos, el SIDA, los tratamientos

con esteroides, los trasplantes de órganos, el uso de drogas inmunomoduladoras, la inmunosenescencia, los lactantes, los preescolares, el embarazo, la desnutrición y el estrés, adicionalmente la contaminación ambiental, por lo tanto, veremos incrementada la incidencia de esta micosis y por ende, su morbilidad y mortalidad en estas poblaciones.

Así mismo, nos parece conveniente resaltar las zonas de mayor endemicidad en Venezuela como son el Dto. Capital, Edos. Miranda, Vargas, Aragua, Carabobo, Zulia, Monagas, Anzoategui, Mérida, Táchira y Sucre, sin embargo, se han reportado casos en todo el territorio nacional. Faltaría evaluar estados como Guárico, Barinas y Apure, de donde recibimos muchos casos en la Sección.

El diagnóstico de histoplasmosis no es sencillo, así como la sospecha de la enfermedad. Si con esta información hemos contribuido a elevar el nivel de búsqueda entre los médicos acerca de esta micosis, nos damos por satisfechos.

RESEÑA

En 1956, después de terminada la construcción de la sede del Instituto de Medicina Tropical en los espacios de la Universidad Central de Venezuela, se crea la Sección de Micología Médica, en los laboratorios 211, 212 y 213 en el segundo piso de dicho instituto. La Señora Mildred Feo, quien tenía el título de Medical Technologist de la Western Reserve University, Cleveland y había realizado un entrenamiento durante dos años, en levaduras patógenas al hombre con el Dr. Potenza, en el hospital de niños "J. M. de los Ríos", temporalmente se encarga de la sección hasta la llegada en 1961 del Dr. Dante Borelli, procedente de Uruguay, en donde se entrenó en Micología Médica, con el Profesor Mackinnon. Desde entonces, funge de jefe de la misma con la asistencia de la Sra. Feo. Es así, como la Sección se encamina hacia la clínica, investigación y diagnóstico de las micosis. Se emprendieron estudios para la epidemiología, la identificación y designación de nuevas especies y géneros de hongos patógenos, proposiciones de modelos experimentales para el estudio de algunas de las micosis y ensayos

con nuevos agentes terapéuticos. En esta tarea se une la Dra. Carmen Marcano, dermatólogo, quien impulsa la labor asistencial de la Sección, los martes y jueves en la tarde, acompañada por la doctora Homagdi Rodríguez, también dermatólogo, el Señor José Salas, dedicado y competente auxiliar de laboratorio, la Sra. Ilva Osorio, secretaria y la Sra. Reina Camacho, obrera. Posteriormente, se integraron las doctoras Claudia Hartung y Sofía Mata. El producto de lo realizado en esa época de oro está representado por la descripción de 10 nuevas especies patógenas al hombre, el desarrollo de nuevos medios de cultivo para los hongos, como son el medio casero o lactritmel y el medio de bilis agar Feo, entre otros, así como más de dos centenares de publicaciones. En 1981, posterior a la jubilación del Dr. Borelli, asume la jefatura de la Sección la Dra. Carmen Marcano. En el año de 1996 se le otorga el nombre de "Doctor Dante Borelli" a la Sección. A partir de 2002, después de la jubilación de la doctora Marcano, se encarga la Dra. Sofía Mata-Essayag hasta la actualidad.

Quizás lo más importante que cabe destacar en esta reseña, es la constante formación de recursos humanos, que se implementó como meta especial en la Sección, es así que asistieron a la misma, personas reconocidas en el ámbito nacional e internacional, cómo son los especialistas Ramón Zamora, Edgard Belfort, Hernán Vargas, Francisco Yegres, Nicole Yegres, Romea Misrachi, Silvy Magaldi, Maigualida Pérez, Francisco González, Omaira Urbina y Celina Pérez, entre tantos otros que se nos escapan de la memoria, ofrecemos disculpas. Sin dejar de ser menos importantes, la gran cantidad de estudiantes de pre y postgrado de las diferentes disciplinas de la salud, que han acudido a nosotros para realizar sus tesis.

Otra de nuestras metas más importantes es la de ser centro de referencia para el diagnóstico y manejo de las micosis, en pacientes procedentes de centros asistenciales, tales como el Hospital Universitario de Caracas, Hospital de Niños "JM de los Ríos", Hospital "Elías Toro", Oncológico "Luis Razetti", Ortopédico Infantil, Hospital Militar "Dr. Carlos Arvelo", Hospital José Ignacio Baldo" del Algodonal, entre otros del área

Metropolitana de Caracas y de otras ciudades del país.

Durante el lapso de tiempo en que ésta Sección ha prestado servicio a la comunidad, han ocurrido múltiples actos de vandalismo, siendo en el último año los peores, lo cual ha ocasionado una disminución en la calidad y cantidad del servicio asistencial y de investigación que realizamos. Sin embargo, el personal que labora en la actualidad: Sofía Mata, María Teresa Colella, Vanessa Pineda, Desiree Villaroel y Rayglenys Rodríguez, con gran esfuerzo y con la ayuda de muchos de nuestros pacientes, de quienes estamos muy agradecidos, hemos tratado de continuar efectuando el diagnóstico y asistencia a los pacientes con micosis, principalmente las profundas, las cuales estamos viendo cada vez con más frecuencia.

REFERENCIAS

- AJELLO L., BRICEÑO-MAAZ T., CAMPINS H., MOORE JC., (1960) "Isolation of *Histoplasma capsulatum* from *Steatormis caripensis* Cave in Venezuela". *Mycop et Micol Appl*; 12: 199-206.-
- AJELLO, L., (1961) "Observations on the epidemiology of histoplasmosis". *Mycopat. et Mycol Appl*; 15: 231-237.-
- ALBORNOZ M., ALBORNOZ R., (1971) "Estudio de la sensibilidad específica en residentes de un área endémica a la paracoccidiodomicosis en Venezuela". *Mycop et Micol Appl*; 45(2): 65-75.-
- ALBORNOZ M., (1985) "Micosis profundas más frecuentes en nuestra población infantil" *Bol Inf de las Micos en Venez*;1: 8.-
- ALBORNOZ, M., (1990) "Pruebas cutáneas en el estudio de la hipersensibilidad retardada". *Bol Inf de las Micos en Venez*; 16: 16-20.-
- ALBORNOZ, M., (1994) "Comentarios sobre el estudio epidemiológico de la histoplasmosis y paracoccidiodomicosis en la población del municipio foráneo Las Ollas de Caramacate (Edo Aragua)". *Bol Inf de las Micos en Venez*; 26: 8-9.-
- ANGULO A., CARBONELL L. (1961). "Labor Realizada en el Campo Anatomo-Patológico". *Mycopathol et Mycol Appl*; 15: 61-76.-
- ANGULO A, ALFONSO E. (1985) "Sorpresas, dificultades y contradicciones en el diagnóstico histo-patológico y citológico de las micosis profundas en el adulto". *Cien. Tecnol. Venez*; 2:155-159-
- BAHR N., SPINELLO A., WHEAT L., GEORGE A., (2015) "Histoplasmosis infections worldwide: Thinking outside of the Ohio River valley". *Curr Trop MedRep*; 2(2): 70-80.-
- BALDÓ J, CAMPINS H., AYALA C., (1961) "Histoplasmosis en Venezuela". *Mycopathol et Mycol Appl*; 15: 177-216.-
- BORELLI D., (1957) "*Histoplasma capsulatum* aislado del

- suelo en el Distrito Federal". *Acta Cient Venez*; 8(5): 118.-
- CAMPINS H., SCHARYI M., (1950) "Investigación de la sensibilidad cutánea a la histoplasmina en Venezuela". *Arch. Venezol. Patol. Trop. Par. Med*; 2: 75-82. -
- CAMPINS, H, SCHARYJ, M., (1953) "Comprobación de la histoplasmosis en Venezuela". *Gac Med de Caracas*; 60: 67-75.-
- CAMPINS H., ZUBILLAGA C., GÓMEZ LÓPEZ L., DORANTES M., (1955) "Estudio de una epidemia de histoplasmosis en el estado Lara, Venezuela". *Gac Med Caracas*; 62: 85.-
- CANTEROS CE., IACHINI RH., RIVAS MC., VACCARO O., MADARIAGA J., Y COLS., (2005). "Primer aislamiento de *Histoplasma capsulatum* de murciélago urbano *Eumops bonariensis*". *Rev Argent Microbiol*; 37(1): 46-56. -
- CARLUCCI JG., HALASA N., CREECH CB., DULEK DE., GÓMEZ-DUARTE OG. Y COLS. (2016) "Vertical Transmission of Histoplasmosis Associated With Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy". *J Pediatric Infect Dis Soc*; 5(2): e9-e12.-
- CASTRO M., DOMINGUEZ M., GOMEZ F., GONZÁLES A., (1990) "Estudio clínico epidemiológico de histoplasmosis en niños entre 6 meses y 5 años en el barrio La Floresta, Tinaquillo, Edo. Cojedes" *Bol Inf de las Micos en Venez*; 16:14-15.-
- CERMEÑO, J., (2004) "Epidemiological survey of histoplasmine and paracoccidioidine skin reactivity in an agricultural area in Bolivar state, Venezuela". *Eur J Epidemiol*; 19(2): 189-93.-
- CERMEÑO J., HERNANDEZ I., CABELLO I., ORELLAN Y., CERMEÑO Y. Y COLS (2006) "Cryptococcus neoformans and *Histoplasma capsulatum* in dove's (*Columbia livia*) excreta in Bolivar State, Venezuela" *Rev. Latina Microb*; 48(1): 6-9.-
- CONANT N., (1972) "Micología". 3era Edición. Nueva Editorial Interamericana S.A, México. p. 170-212.-
- DE SOUSA A., (1987) "Valor de la histoplasmina como orientación diagnóstica de la histoplasmosis en nuestra población infantil". *Bol Inf de las Micos en Venez*; 7: 11-12.-
- EMMONS C., (1949) "Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil". *Pub. Health Rep*; 64:892-896-
- EMMONS C., (1950) "Histoplasmosis. Animal reservoirs and others sources in nature of pathogenic fungus" *Amer. J. Pub. Health*; 40:436.-
- EMMONS C., (1958) "Association of bats with histoplasmosis". *Pub Health. Rep*; 73: 590-595.
- EMMONS C., (1961) "Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil in Washington, D.C." *Pub. Health Rep*; 76: 591.-
- EMMONS C., KLITE P., BAER G AND HILL W. (1966) "Isolation of *Histoplasma capsulatum* from bats in the United States". *Am J Epidemiol*;84: 103-109.-
- FERNANDEZ, C., (1988) "Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* en murciélagos en Cuba". *Rev. Cubana Med, Trop*; 40: 36-43.-
- GTA J., AKAA P., BANWAT E., DAUDA, M., (2010) "A review of literature on unusual clinical presentations and potential challenges in diagnosis of histoplasmosis". *J of Clin Med and research*; 2(10): 159-166.-
- HOUSSOON A., KRISHNA MT., (2011) "Does this patient have an immunodeficiency?" *Clin Med*; 11(4): 380-384.-
- IBACH M., LARSH H., FURCOLOWW M., (1954) "Epidemic histoplasmosis and airborne *Histoplasma capsulatum*". *Proc Soc Exp Biol Med*; 85: 72-74.-
- KASSISSE J., KASSISSE E., MATA S., GARRIDO L., MENDOZA M. Y COLS., (2016) "Brote de histoplasmosis aguda en escolares de El Mayar (Edo. Sucre), Venezuela". *Arch Ven Puer Ped*; 79 (4): 132-138.-
- LANDAETA ME., COLELLA MT., CALDERA J., ROSELLÓ A., MATA-ESSAYAG S., (2015) "Presentaciones atípicas de histoplasmosis". *Acta Med Colomb*; 40: 254-259.-
- LANDAETA ME., MATA-ESSAYAG S., COLELLA MT., PINEDA V., INATY J., (2016) "Presentaciones atípicas de histoplasmosis: anemia hemolítica. Descripción de un caso y revisión de la literatura". *Kasmera*; 44 (1): 22 - 25. -
- LANDAETA-NEZER ME., MATA-ESSAYAG S., COLELLA MT., PINEDA V., ROSELLO A., (2015) "Histoplasmosis in AIDS Patients in Venezuela". *J J Aids-HIV*; 1(1): 006.
- LOPEZ L, VALENCIA Y, TOBON A, VELASQUEZ O, SANTA C Y COLS.(2016) "Childhood histoplasmosis in Colombia: Clinical and laboratory observations of 45 patients" *Medical Mycolog*; 54: 677-683-
- MATA-ESSAYAG S., COLELLA MT., LANDAETA ME., ROSELLOA., HARTUNG C. Y COLS. (2006) "Estudio de 40 casos de Histoplasmosis en niños y revisión de la literatura". *Arch Ven Puer Ped*; 69(2): 53-59.-
- MATA-ESSAYAG S., COLELLA MT., ROSELLOA., HARTUNG C., LANDAETA ME. Y COLS. (2008) "Histoplasmosis. A study of 158 cases in Venezuela, 200-2005". *Medicine*; 87(4): 193-202.-
- MATA-ESSAYAG S., LANDAETA ME., COLELLA MT., PINEDA V., DAWAHER J. Y COLS. (2014) "Histoplasmosis mamaria. Estudio de una serie de casos". *INFORMED*; 16 (2): 71 - 74
- MERHEB GUILLOT JC, GARCÍA TAMAYO J., (1991) "Infecciones micóticas en pacientes inmunocomprometidos: estudio anatomopatológico de 404 necropsias". *Arch Venez Farmacol Terap*; 10: 37-45.-
- MESA L., RODRIGUEZ DVS., MOLERO DLM., VARGAS H., VARGAS DCN., (1986) "Sensibilidad cutánea a la histoplasmina y coccidioidina en población estudiantil en Goajira Venezolana". *Bol Inf de las Micos en Venez*; 6: 30.-
- NEGRI M.,GONTERO R.,BENAVENTE E.,ZUNINO A., Y COLS (2012) "Manifestaciones inusuales de histoplasmosis en enfermedades del tejido conectivo".*Rev Arg Reumatol*;23(2):26-39-
- PRINCIPE A., CONVIT J., PIFANO F., (1961) "Resultados de las encuestas epidemiológicas sobre histoplasmosis, coccidioidomicosis y tuberculosis, realizadas en algunas regiones de Venezuela". *Mycopathol et Mycol Appl*; 15: 11-51-
- POLLAK L., RODRIGUEZ C., ADRIANZA M., (1953) "Histoplasmosis pulmonar, presentación de un caso". *Acta Med. Venezol*; 1: 242-245.-
- RIPPON JW., (1988) "Medical Mycology". 3era edición. Editorial WB Saunders Company. cap 15: p. 381-423.-
- RODRIGUEZ DVS., MOLERO DLM, VAGAS DCN., MESA L., VARGAS, H., (1986) "Encuesta epidemiológica con histoplasmina en población infantil de Zipayare Edo. Zulia".

- Bol. Inf. de las Micos en Venez;*6: 34.-
- SALFELDER,K., REYES DE LISCANO T., (1965) "Lesiones Histoplasmóticas autópsicas como índice epidemiológico de la enfermedad en los Andes venezolanos". *Mycopathol et Mycol Appl*; 26 (1): 19-30.-
- SUAREZ J, TORRES J, TORRES C., ABDUL S., NARANJO L., (2002) "Histoplasmosis asociada a cuevas en Venezuela". *Bol Venez Infectol*; 10(2): 47-51.-
- TAYLOR M., REYES M., MARTINEZ M, RODRIGUEZ G., DUARTE E. Y COLS., (1997) "Histoplasmosis en Mexico. Aportaciones inmunológicas y moleculares sobre su epidemiología". *Ciencia y desarrollo*; 136: 59-63.-
- TELO C., NUÑEZ MJ,ALAYO E.,SILVA M, MATA-ESSAYAG S y COLS.,(2007)"Epidemic Outbreak of Acute Pulmonary Histoplasmosis Related to a visit to Alfredo Jahn Cave, Miranda State, Venezuela.48th Annual ICAAC/IDSA 46th Annual Meeting. Washington,DC.M-730:635-
- VARGAS-MONTIEL H. (1997) "Histoplasmosis". *Bol inform. de las Mico en Venez*; 30: 33-36.-
- VARGAS, H., (1990) "Histoplasmosis". *Bol Inf de las Micos en Venez*; 16: 38-
- VARGAS H., ALBORNOZ M., (1987) "Estudio epidemiológico del caserío La Culebra (Alto Orinoco)". *Bol Inf de las Micos en Venez*; 7: 15.-
- WHEAT L., (1992) "Histoplasmosis in Indianapolis". *Clin Infect Dis*; 14(1): 91-99. -
- WHEAT L., (2003) "Current diagnosis of histoplasmosis". *Trends in Microbiol*; 11(10): 488-494-
- WHEAT L., (2016) "Histoplasmosis". *Infect Dis Clin N Am*; 30: 207-227.-

Arbovirus, Miocarditis e Insuficiencia Cardíaca

Ivan Mendoza¹,
Igor Morr²,
Ivan Mendoza Britto³,
Yolimar Meza²,
Nahir Martinez¹,
Jaime Torres¹,
Francesca Misticchio¹,
Vicente Finizola⁴,
Juan Marques¹,
Karina Gonzalez Carta⁵

¹ Instituto de Medicina Tropical.
UCV. Venezuela.
imivanjm@gmail.com
nahirmu@gmail.com
torresj@iname.com
fmisticchio@gmail.com
juan.alberto.marques@gmail.com

² Fundación Venezolana de Cardiología.
Maracay. Venezuela.
igormorr@hotmail.com

³ Hospital Jackson Memorial. Miami. USA.
ivanovich13@hotmail.com

⁴ Ascardio. Barquisimeto. Venezuela.
vfinizola@gmail.com

⁵ Mayo Clinic-Rochester. Minesota. USA. carta.
karina@mayo.edu.

RESUMEN

Las enfermedades tropicales son enfermedades infecciosas más prevalentes en regiones tropicales y subtropicales. Cada año más de un millón de personas se contagian con ellas, y más de un millón de casos mueren por estas afecciones entre ellas la infección por arbovirus.

En este artículo revisamos la afectación cardíaca que puede llevar a insuficiencia cardíaca (IC) producida por arbovirus. El 40% de la población mundial está en riesgo de contraer estas infecciones transmitidas por mosquitos de la especie *Aedes*. La IC es una complicación importante que ha sido poco estudiada. La afectación cardíaca por *arbovirus* puede evolucionar a cardiomiopatía dilatada e IC. No se conoce el porcentaje en que ocurre. El Chikungunya generalmente no es una enfermedad letal, pero la IC es la primera causa de muerte por esta enfermedad. En cuanto al Dengue, el 45% de los casos con signos de alarma o severos pueden desarrollar disfunción sistólica ventricular izquierda. El 25% de los pacientes con Dengue y Miocarditis desarrollan IC. Existen pocos reportes de afectación cardíaca por Zika. Nosotros presentamos por primera vez una serie de 9 casos con manifestaciones cardiovasculares por Zika. De los 9, seis desarrollaron IC, 5 con Fracción de Eyección (FE) reducida y uno con FE preservada y derrame pericárdico moderado a severo.

La importancia de esta revisión es un llamado a los médicos a estar conscientes con la posibilidad de afectación cardíaca en pacientes con estas infecciones por *arbovirus*. Este conocimiento puede ayudar a establecer un diagnóstico precoz y una estrategia para mitigar las complicaciones.

Palabras clave: Arbovirus; Zika; Chikungunya; Dengue; Miocarditis Viral.

ARBOVIRUS, MYOCARDITIS AND HEART FAILURE

ABSTRACT

Neglected tropical diseases are infectious diseases that affect more than a 1 billion people in tropical and subtropical areas. These diseases have emerged in a large number of regions and have reached clinical and epidemiological relevance in the USA. Many of these diseases may have cardiac involvement leading to Heart Failure (HF). Among them arbovirus infections transmitted by mosquitoes of the *Aedes* species. In this review we are focussing on Chikungunya, Dengue and Zika. Chikungunya is generally not life-threatening but, in cases where it is fatal, HF is the first cause of death. In a proper epidemiologi-

cal context the triad of fever, polyarthralgia and arrhythmias suggests Chikungunya myocarditis. Dengue cardiac manifestations include arrhythmias, HF, hypotension, and sudden death. There are only a few reports on Zika cardiovascular involvement. Including HF mainly with low ejection fraction (EF), arrhythmias and chest pain.

Keywords: Neglected Tropical Diseases; Heart Failure; Zika; Chikungunya; Dengue; Arbovirus

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades tropicales son enfermedades infecciosas que son prevalentes en regiones tropicales y subtropicales. La mayoría de ellas están incluidas dentro de las llamadas enfermedades desasistidas u olvidadas. Son infecciones por parásitos, virus o bacterias. Estas infecciones afectan a más de un billón de personas al año, matan a más de un millón y tienen gran poder incapacitante (1-2).

Las enfermedades tropicales que afectan el corazón pueden llevar a insuficiencia cardíaca (IC) (3-4). Dentro de las enfermedades tropicales en esta revisión nos referimos a las ocasionadas por *arbovirus* que son transmitidas por mosquitos de la especie *Aedes*. Ellas pueden afectar un 40% de la población mundial y pueden producir arritmias, cardiomiopatías, insuficiencia cardíaca (IC) y muerte súbita.

La IC es un síndrome clínico caracterizado por síntomas típicos (ej: disnea, edema en tobillos y fatiga) que puede ser acompañado por signos (ej: presión venosa yugular elevada, crepitantes pulmonares y edema periférico) causado por una anomalía cardíaca funcional y/o estructural, que resulta en un gasto cardíaco reducido y/o presión intracardíaca elevada en reposo o durante el estrés (3).

La etiología de la IC incluye hipertensión arterial, cardiopatía isquémica, cardiomiopatías incluyendo enfermedades tropicales, diabetes mellitus, enfermedades valvulares y enfermedades reumáticas (3). En el estudio PARADAGIM-HF Regional que es la publicación con más casos de IC incluidos hasta el presente, la etiología de cardiopatía isquémica fue menos frecuente en América Latina (43%) que en Norte América (54%) (5). Un hallazgo similar se había reportado en dos ensayos sobre IC aguda, presumiblemente reflejando etiologías diferentes en América

Latina, incluyendo enfermedades cardíacas tropicales como la enfermedad de Chagas y la afectación cardíaca por *arbovirus* (6-7).

OBJETIVO

El objetivo de este artículo es revisar la afectación cardíaca que puede llevar a la IC producida por 3 *arbovirus*: Chikungunya, Dengue y Zika. Este es un tema relevante por las epidemias a nivel mundial que provocan estos virus, que también afectan Venezuela. La IC en enfermedades tropicales es un tema poco estudiado en el caso del Dengue, Chikungunya (CHIK V) y Zika, por lo que nos planteamos una revisión descriptiva y explorativa.

METODOLOGÍA

Se investigó publicaciones desde 1970 hasta julio 2017 en busca de trabajos científicos incluyendo Google Académico, PubMed, Medline, Scopus, Research Gate, Scielo, Scivers, Embase

Se utilizaron las palabras claves: *Arbovirus*, Tropical Diseases and Heart Disease, Heart Failure, Cardiología Tropical, Neglected Tropical diseases, Zika, Chikungunya, Dengue, Viral Myocarditis.

Se realizó una evaluación crítica de los trabajos seleccionados analizando el título, resumen incluyendo las conclusiones.

Se identificaron y revisaron los estudios relevantes que se seleccionaron para su revisión completa. Adicionalmente se consultaron libros de Cardiología y Medicina Tropical. Se investigó por tweeter con las mismas palabras claves y se consultó a expertos en la materia. También se concluyó 2 trabajos que realizamos en la Sección de Cardiología Tropical de la Universidad Central de Venezuela. El primero es un artículo observacional prospectivo multicéntrico de 277 pacientes con Chikungunya (CHIK V) de la epidemia de Venezuela incluidos independientemente si presentaban o no manifestaciones cardiovasculares, evaluado cardiológicamente en forma sistemática y cuyo resumen fue aceptado para publicación en Congresos del American College of Cardiology, American Heart Association, Sociedad Europea de Cardiología

y la Sociedad Española de Cardiología analizando diversos aspectos (8-10). El segundo sobre un estudio observacional prospectivo de 9 pacientes con Zika y afectación cardíaca que se presentó y publicó en el Congreso ACC 2017, Mayo Clinic 2016 y Europeo de Insuficiencia Cardíaca 2017.

Los documentos filtrados se leyeron en detalles, se organizó, se diseñaron mapas mentales y con estos documentos se describió el conocimiento actual sobre el tema, los vacíos existentes y finalmente se redactó críticas sobre estos estudios y las conclusiones.

CHIKUNGUNYA

La fiebre Chikungunya (CHIK V) es una enfermedad viral transmitida al humano por la picadura de un mosquito hembra infectado de la especie *Aedes* (11). Es causada por un virus ARN del género *Alfavirus*, la familia *Togaviridae*. La enfermedad se describió por primera vez en un brote ocurrido en Tanzania en 1952. Chikungunya es una voz del idioma Kimakonde que significa doblarse, en alusión al aspecto encorvado de los pacientes debido a dolores articulares (12-13).

VECTORES

Los vectores principales de esta enfermedad son el *Aedes Aegypti* (patas blancas) y el *Aedes Albopictus* (tigre), ambos mosquitos están ampliamente distribuidos en el trópico, y el *Albopictus* se presenta también en latitudes más templadas a nivel mundial, incluyendo a Europa y Estados Unidos. Son los mismos transmisores del Zika y Dengue, CHIK V y fiebre amarilla (13-14).

IMPORTANCIA MUNDIAL DE LA FIEBRE POR CHIKUNGUNYA

La Chikungunya constituye un grave problema de Salud Pública a nivel mundial que se estima podría llegar a afectar el 40% de la población, cifra que se calcula para el Dengue. Aunque se considera una de las principales enfermedades de los viajeros, también se ha demostrado transmisión local en regiones no tropicales como Europa y Estados Unidos de Norteamérica. La enfermedad se ha detectado en más

de 60 países de Asia, África, Europa y las Américas (13-14).

CHIKUNGUNYA EN VENEZUELA

En Venezuela no se ha publicado datos oficiales recientes de morbilidad y mortalidad por Chikungunya. La oficina Panamericana de la Salud y la Organización Mundial de la Salud en un boletín reciente actualizado al 9 de septiembre del 2016 señalan en la semana 32 un total de 3107 casos sospechosos y 68 confirmados, una tasa de incidencia de 10%, sin casos fallecidos (15). Torres y Colaboradores publicaron recientemente una serie de 4 casos de la forma atípica y letal de Chikungunya en Venezuela, de los que fallecieron tres (16). Estos autores están conscientes de al menos 20 muertes adicionales confirmados virológicamente en Venezuela y estiman el número de casos de Chikungunya en más de 1900000, esto basado en el número de casos agudos febriles no explicados vistos en dependencias del Ministerio del Poder Popular para la Salud desde junio del 2014, cuando se confirmó el primer caso autóctono (16).

CHIKUNGUNYA EN ESPAÑA

En Europa en general y en España en particular se reporta anualmente numerosos casos de CHIK V en viajeros, cifra que llegó a 1450 casos en 2009 la mayoría proveniente de Latinoamérica. En España no se ha reportado transmisión autóctona que es factible, pues la misma está ligada a la importación del virus por pacientes infectados y expuestos al vector (16-17).

Recientemente se publicó en España 10 casos en viajeros provenientes del Caribe (17-18).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE CHIKUNGUNYA

La mayoría de los pacientes infectados con Chikungunya son sintomáticos (72 – 97%). *Definición de casos de acuerdo al CDC Casos típicos.* Los síntomas típicos (ver tabla) son fiebre, poliartralgias, cefalea, mialgias, dolor de espalda y erupción cutánea (13-14).

Definición de caso atípico. Un caso confirmado

de Chikungunya por exámenes de laboratorio que desarrolla síntomas diferentes a los mencionados como típicos. Las manifestaciones atípicas son: 1) Cardiovasculares incluyendo miocarditis, pericarditis, IC, arritmias, inestabilidad hemodinámica y muerte súbita. 2) Neurológicos. 3) Oculares. 4) Renales. 5) Dermatológicos. 6) Otros incluyendo discrasias sanguíneas, neumonía, insuficiencia respiratoria, hepatitis, pancreatitis, síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética, hipoadrenalismo, necrosis de la región nasal (13-16).

En el reporte más grande hasta el presente de Chikungunya la proporción de casos atípicos hospitalizados en la isla de Reunión fue 0,3% del total de infectados (11).

Definición de caso atípico severo. Se refiere a casos de Chikungunya que requieren hospitalización y mantenimiento de al menos una función vital en el curso de la enfermedad. También se refiere a todos los que mueren en el curso de la misma. Se ha reportado que de los casos atípicos un 36% fueron severos en el estudio de la isla de la Reunión, con una mortalidad de 29%. La mortalidad es 30 veces mayor en los casos atípicos severos con edad \geq 65 años.

AFECTACIÓN CARDIOVASCULAR DEL CHIKUNGUNYA

La Afectación Cardíaca del Chikungunya ha sido poco reportada. Se considera una forma atípica infrecuente de la enfermedad. Su incidencia se desconoce por falta de estudios sistemáticos. Existen relativamente pocos reportes de manifestaciones cardiovasculares que incluyen: 1- Miocarditis fulminante que puede llevar a la muerte. 2- IC. 3- Arritmias. 4- Evolución a mediano o largo plazo a cardiomiopatía dilatada. 5- Hipotensión. 6- Pericarditis. 7- Muerte Súbita.

La afectación cardíaca puede ser asintomática y de aparente evolución benigna.

En un estudio previo se informa de una serie de 277 pacientes con Chikungunya evaluados desde el punto de vista cardiovascular. A 119 pacientes (43%) se les detectó arritmias mediante el ECG y estudio

de Holter. En 34 casos la arritmia fue asintomática: La más frecuente fue la bradicardia sinusal en 87 pacientes 30%. Esta arritmia fue predominantemente transitoria, asintomática, benigna y no amerito tratamiento con marcapaso. También se observó disociación de la frecuencia cardíaca con la temperatura y bradicardia relativa con frecuencia menor de 90 por minuto con temperatura mayor de 38°C. El 9% presentó taquicardia auricular no sostenida, el 6% fibrilación auricular. De los 277 pacientes 63 tenían diagnóstico de hipertensión arterial. De ellos 25% presentaron hipotensión transitoria, a 13 se les suspendió por un tiempo el tratamiento antihipertensivo y a 12 se les redujo la dosis y/o el número de medicamento que recibía. La hipotensión ocurrió entre el día 1 y el día 15 de la fiebre. Persistió de 7 a 43 días. El ecocardiograma demostró la presencia de derrame pericárdico en 21 casos (8%) crecimiento de cavidades en 13 casos, fracción de eyección menor de 50% en 8 casos. La resonancia magnética cardíaca demostró signos sugestivos de miocarditis en 10 de los 37 casos a los que se les realizó. En el estudio de Econopoulou solo el 7% de los pacientes con Chikungunya atípica hospitalizados desarrolló arritmias, pero no se empleó holter, así que puede haber un subregistro (13-16) (Figura 1).

CHIKUNGUNYA E INSUFICIENCIA CARDÍACA

La IC ha sido reportada como la causa más frecuente de muerte en pacientes con CHIK V, representando el 23% de las muertes. En el estudio de Econopoulou y colaboradores en pacientes con Chikungunya atípica hospitalizados, 84 pacientes (13%) desarrollaron IC, de ellos el 59% tenían enfermedad cardiovascular previa (11).

En un contexto epidemiológico apropiado, en regiones tropicales o subtropicales donde el CHIK V y el Dengue son prevalentes, y se presentan en forma endémica o epidémica, o en casos de viajeros provenientes de estas zonas, la afectación cardíaca por estos arbovirus puede evolucionar a cardiomiopatía dilatada y eventualmente a IC. No se conoce el porcentaje en que esto ocurre, pero en

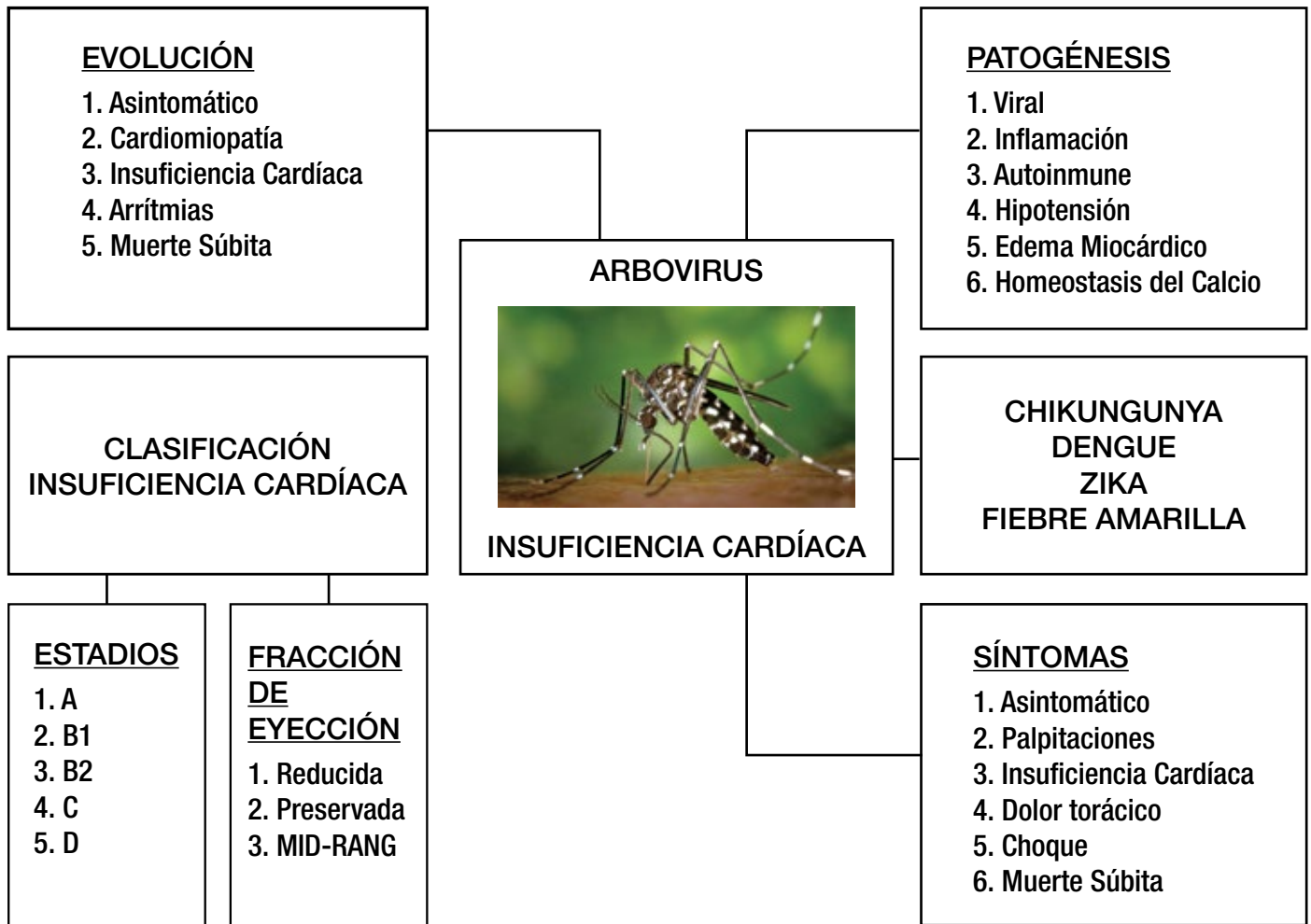


Figura 1.

ARBOVIRUS E INSUFICIENCIA CARDÍACA

varios estudios se ha sugerido que donde se presente epidemias puede esperarse un aumento en el número de casos de cardiomiopatía e IC. La persistencia de alteraciones cardíacas detectables con ECG, ecocardiograma o resonancia magnética cardíaca sugiere esta evolución (11-12).

HISTORIA NATURAL DE LA AFECTACIÓN CARDÍACA POR CHIKUNGUNYA Y DENGUE

La mayoría de los pacientes que adquieren Chikungunya o Dengue se muestran libres de evidencias de enfermedad cardíaca estructural, asintomáticos desde el punto de vista cardiovascular (CV) y ECG normal en el estadio A (ver tabla x). Al estadio B1 evolucionan pacientes que siguen siendo asintomáticos o poco sintomáticos pero pueden tener arritmias auriculares

o ventriculares infrecuentes, bradicardia sinusal y ecocardiograma con función ventricular normal y pueden tener alteraciones en la RM cardíaca como aumento del realce tardío cardíaco con gadolinium subepicardio y trastornos leves de motilidad en el ecocardiograma (3-12). En el estadio B2 se ubican aquellos que evolucionan y tienen una fracción de eyección reducida (FER) pero sin signos ni síntomas de IC (3). Puede presentarse derrame pericárdico leve en menos del 25% de los casos. También arritmias auriculares o ventriculares, bradicardia y fibrilación auricular (8-10). En los reportes iniciales a esta fase la denominaron “precongestiva” (12) Obeyesekere et al publicaron un estudio de seguimiento de 35 pacientes con afectación cardíaca por Dengue o CHIK V. Tres de ellos murieron, uno en la fase aguda y dos

en un lapso de 6 meses. Veintiséis (74%) desarrollaron cardiomiopatía con ECG anormal y cardiomegalia (12).

Los pacientes del estadio B2 pueden evolucionar al estadio C con síntomas previos o actuales de IC, FER, dilatación del ventrículo izquierdo, hipokinesia generalizada y arritmia auricular y/o ventricular, e hipotensión arterial (3). Finalmente estadio D con IC en reposo a pesar del tratamiento médico, FER, hipokinesia global e hipotensión (3, 12, 16).

En el estudio de Torres y colaboradores una serie de 4 casos de pacientes con Chikungunya atípica y letal. Tres fallecieron, todos desarrollaron hipotensión arterial y shock. Dos de ellos presentaron IC. Uno tenía la fracción de eyección preservada al ingreso y desarrollo FER severa y uno fibrilación auricular. Estos autores reportan conocer de al menos 20 casos de Chikungunya letales confirmados virológicamente (16).

FISIOPATOLOGÍA DEL DAÑO MIOCÁRDICO E IC EN PACIENTES CON CHIKUNGUNYA

No se conoce exactamente el mecanismo fisiopatológico que lleva a IC en estos pacientes. Se ha postulado los siguientes mecanismos: (11,12,16, 21)

- 1) Daño miocárdico directo por el virus.
- 2) Respuesta inflamatoria.
- 3) Respuesta autoinmune.
- 4) Enfermedad cardíaca subyacente.
- 5) Hipotensión severa.
- 6) Aumento de la permeabilidad vascular.

Un aspecto que podría intervenir es la respuesta inflamatoria y autoinmune que se produce en la Chikungunya, similar a la Artritis Reumatoide. Es conocido que los pacientes con artritis reumatoide tienen un riesgo mayor de presentar IC y cardiomiopatía. Incluso una de las causas más frecuentes de aumento de mortalidad cardiovascular aparte de la enfermedad arterial coronaria en la artritis reumatoide es la IC. Puede presentarse IC con FER o FE Preservada. Si esto explica el daño miocárdico en los pacientes con Chikungunya, está por establecerse y es solo una hipótesis que planteamos (22).

TRATAMIENTO PARA INFECCIÓN POR ARBOVIRUS Y AFECTACIÓN CARDÍACA

No existen vacunas disponibles ni medicamentos específicos para tratar la infección por *arbovirus*. El tratamiento está basado en las manifestaciones clínicas. Todo paciente con afectación cardíaca debe hospitalizarse, particularmente si desarrolla IC. Las recomendaciones para su tratamiento son basadas en las guías recientes para tratamiento de la IC. La hidratación debe ser cuidadosa y supervisada. De acuerdo al caso se debe utilizar los medicamentos sacubutril-valsartan, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), bloqueantes de receptores de angiotensina II, betabloqueantes, bloqueantes del receptor de aldosterona y de acuerdo al caso diuréticos, amiodarona, inotrópicos incluyendo eventualmente digital. Se recomienda un cuidado especial con los anticoagulantes en el caso de Dengue por la posibilidad de complicaciones hemorrágicas. En casos de fibrilación hemos preferidos los nuevos anticoagulantes orales si no están contraindicados.

DENGUE

El dengue es una enfermedad infecciosa causada por el Virus del Dengue del género *Flavivirus* que es transmitida por un mosquito de la especie *Aedes* previamente mencionado en la transmisión del Chik V. Existen 4 tipos de virus del Dengue: DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4. Cada uno de ellos crea inmunidad específica para infección por el mismo tipo (23).

TRANSMISIÓN

Las personas sintomáticas y asintomáticas son los portadores principales del virus, y los mosquitos se infectan al picarlo. El mosquito *Aedes albopictus* (Tigre) tiene una gran capacidad de hibernación, y su habilidad para guarnecerse en microhabitats son factores que propician su propagación y la extensión geográfica del Dengue (23).

IMPORTANCIA MUNDIAL DEL DENGUE

La OMS estima que el número de afectados por Dengue se encuentra entre 50 y 100 millones de perso-

nas, con un total a 500000 que amerita hospitalización. Es una dolencia presente en 100 países y una amenaza para el 40% de la población mundial (23, 24).

DENGUE EN VENEZUELA

No se han publicado cifras oficiales recientes de la incidencia de Dengue en el país. Torres y colaboradores en un estudio informan de 123.967 casos de dengue reportados en 2010, 10.203 (8%) de los cuales fueron dengue severo.

DENGUE EN ESPAÑA

En España el Dengue es un diagnóstico relativamente frecuente en viajeros que regresan de América Latina. En un estudio se informa de 61 casos en 3 años. En el año 2004 se identificó el mosquito *Aedes Albopictus* (Tigre) en Cataluña. Su presencia se ha confirmado a finales del 2010 en más de 170 municipios. Se incluyen reportes en Alicante, Murcia y Mallorca (25, 26).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La mayoría de los pacientes que se infectan de Dengue son asintomáticos o poco sintomáticos (80%) y alrededor de un 5% presentan manifestaciones severas (23, 24).

Inicialmente se clasificaba en Dengue Clásico, Dengue Hemorrágico y Dengue con Shock. Una nueva clasificación menciona 3 tipos de Dengues en Dengue con y signos claves (23, 27) (Tabla 1).

Tabla 1.
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS EN INFECCIÓN POR ARBOVIRUS

SÍNTOMA	DENGUE	CHIKUNGU-NYA	ZIKA
Fiebre	> 38°C. 4-7 días	> 38°C. 2-3 días	> 38°C. 2-3 días
Tiempo post-Infección	4-7 días	3-7 días	1/5 asintomática
Erupción	+	++	+++
Prurito	+	+	++/+++
Conjuntivitis	-	-/+	++
Mialgia	++	+	+

Artralgia	-/+	+++	+
Cefalea	++	+	+
Sangrado	++	-/+	-
Leuco and Trombocitopenia	+++	+	-

- 1) Dengue sin signos clínicos de alarma. Este tipo de cuadro se caracteriza por fiebre de más de 38°C de duración limitada (de 2 a 7 días). Hay un intenso malestar general acompañado de erupción cutánea. Generalmente se presentan dos o más de los siguientes signos o síntomas: cefalea, dolor retroorbitario u ocular, mialgias, artralgias, leucopenia (23, 27).
- 2) Dengue con signos clínicos de alarma. Se incluye uno a más de los siguientes signos o síntomas: dolor abdominal, vómitos persistentes, acumulación clínica de líquidos, sangrado no severo de mucosas, hepatomegalia, hipotensión, letargia, aumento del hematocrito junto con una disminución rápida de plaquetas (23, 27).
- 3) Dengue severo. Se incluye uno a más de los siguientes criterios que ameritan hospitalización: acumulación severa de líquidos o shock, afectación severa de órganos incluye al corazón, trastorno de conciencia, elevación de transaminasa ≥ 1000 u/l (23, 27).

AFECTACIÓN CARDÍACA EN EL DENGUE

Las manifestaciones cardiovasculares en el Dengue han sido reportadas en un rango variable desde cambios ECG transitorios asintomáticos hasta casos fatales (27).

La miocarditis es una de las principales causas de muerte en pacientes con Dengue severo. Existen pocos reportes de estudios sistemáticos de esta complicación (28).

Se ha publicado que entre un 9 y 19% de los pacientes con dengue hospitalizados tienen afectación cardíaca. En un estudio observacional de una epidemia de Dengue en China, que incluyó 1782 casos de Dengue hospitalizados se les diagnóstico miocarditis a 11%, esto en base a los criterios de la Sociedad

Europea de Cardiología en estudios ECG, ecocardiograma y determinación de enzimas cardíacas (28).

El criterio por excelencia para el diagnóstico de miocarditis que es la biopsia endomiocárdica no se utiliza, porque o no está disponible o quizás por el temor a la complicación hemorrágica. Los criterios de miocarditis de la Sociedad Europea de Cardiología combinan los síntomas, el ECG, enzimas cardíacas y estudios de imagen. El ideal es la RM cardíaca, que usualmente no está disponible en las áreas endémicas (27, 28) (Figura 1).

ALTERACIONES ECG EN EL DENGUE

Se ha recomendado que dado que la mayoría de los pacientes con miocarditis por Dengue tienen ECG anormal debería realizarse este estudio a todo paciente con Dengue especialmente con Dengue severo o con signos de alarma y si el ECG es anormal un ecocardiograma, enzimas cardíacas, Holter ECG y si está disponible RM cardíaca (27).

Las anomalías ECG incluyen bradicardia relativa (incongruente con la fiebre) o absolutas, arritmias auriculares entre ellas fibrilación auricular, arritmias ventriculares, trastornos de conducción auriculoventricular, y anomalías del segmento ST y la Onda T. El ECG es anormal entre el 29 y 81% de los pacientes (27).

DENGUE E INSUFICIENCIA CARDÍACA

La disfunción ventricular izquierda en la fase aguda del Dengue ha sido documentada en varios estudios usando diferentes métodos incluyendo Ecocardiograma y RM Cardíaca. La disfunción suele ser transitoria excepto en una minoría con una evolución fulminante, con IC aguda, hipotensión severa, shock o muerte súbita. La mayoría de los pacientes recuperan su función ventricular al final de la fase aguda (12, 27, 28).

No existen estudios de seguimiento apropiados aunque en algunos reportes se informa de evolución hacia cardiomiopatía dilatada e IC. En el estudio de la epidemia de Dengue en China el 25% de los casos de Dengue con Miocarditis desarrollo IC comparado con

0% de los que presentaron Dengue sin Miocarditis (28). En otro artículo se informa de un 45% de casos con disfunción sistólica en pacientes con Dengue y signos de alarma o severos (27).

ZIKA

El virus Zika es un *arbovirus* que pertenece a la familia de los *flavivirus*. Es un virus de RNA que está relacionado con el dengue, la fiebre amarilla y el virus del Nilo del Oeste (West Nile). La rápida y extensa diseminación epidémica de la infección por el virus Zika (ZIKV) en las Américas, ha sido considerada como el peor brote del siglo XXI. El ZIKV fue aislado por primera vez de un mono Rhesus en el bosque Zika de Uganda en 1947 (29-32).

TRANSMISIÓN

I) ZIKV se transmite principalmente por la picadura de mosquitos *Aedes* infectados, especies *aegypti* y *albopictus*. li) por transmisión materno-fetal. lii) transfusión de sangre. liii) sexualmente. liiii) transmisión ocupacional en el laboratorio. Los viajeros que regresaron con ZIKV desarrollaron síntomas hasta 6 días después de abandonar las áreas endémicas y 10 días después de los intercambios sexuales con la persona infectada (29-32).

ZIKA EN LOS ESTADOS UNIDOS

La explosiva pandemia de la ZIKV en toda América del Sur, Centroamérica y el Caribe y que amenaza potencialmente a Estados Unidos es la más reciente llegada inesperada de enfermedades virales en el Hemisferio Occidental. Para el 10 de mayo de 2017, los CDC informaron sobre 5000 casos en estados de los EEUU y sobre 36000 en territorios de los EEUU. De los casos de los Estados Unidos, el 98% está asociado con el viajero en contraste con los casos de los territorios de los Estados Unidos, donde 99 se adquieren localmente ZIKV son condiciones de notificación nacional (29-32).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Hasta el 80% de las personas infectadas con ZIKV

son asintomáticas e incluso aquellos que llegan a ser sintomáticos tienen pocas probabilidades de experimentar más de: 1- erupción maculopapular con prurito. 2- Fiebre de bajo grado. 3- Artralgia. 4- Mialgia. 5- Dolor de cabeza. 6- Conjuntivitis. La presentación severa incluye anomalías congénitas (particularmente microcefalia) en la transmisión vertical y síndrome de Guillan-Barré que causa debilidad muscular y parálisis (29-32).

MANIFESTACIÓN CARDIOVASCULAR EN ZIKA

Aunque el ZIKAV es típicamente leve y auto-limitado, los incidentes de microcefalia y el síndrome de Guillain-Barre se asociaron con el temor de una mayor propagación del virus en el mundo. Sin embargo, la investigación en la relación entre ZIKAV y la complicación cardiovascular es escasa (33-37) (Figura 1).

ZIKA, ARRITMIAS E INSUFICIENCIA CARDÍACA

González et al. reportaron una serie de 9 casos con ZIKAV basada en las pruebas de laboratorio que había exhibido manifestación cardiovascular en un estudio prospectivo multicéntrico observacional (28). Se realizaron estudios clínicos, de ECG, de laboratorio incluyendo virología, RX, ecocardiograma, Holter y resonancia magnética cardíaca. De los 9 pacientes 6 eran mujeres con edad media de 47 ± 17 años. HF estuvo presente en 6 casos, 5 con FE baja y un paciente con FE preservada, con preclampsia, y derrame pericárdico moderado a severo. La miocarditis inducida por ZIKAV fue diagnosticada con base en los siguientes criterios: i) Se detectó ARN Zika en suero con el uso inverso-transcriptasa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y anti-virus IgM específicos del virus Zika. ii) Se excluyó la posible infección simultánea, como el dengue, el chikungunya, el VIH y otros virus o infecciones parasitarias como el Chagas. iii) Se detectaron pruebas clínicas, TTE, ECG y cMRI de miocarditis. ii) Arterias coronarias normales en la angiograma de 2 pacientes (28).

En otra publicación reciente, Aletti et al informó de un caso de Zika complicado con dolor torácico,

elevación del ST en la región anteroseptal y aumento de la troponina, FE normal mediante ecocardiograma, registro Holter normal, IRMc con perfusión normal del tejido miocárdico, hipocinesia y edema (34).

En otro estudio ZIKAV se detectó en el corazón de un primate 5 días después de la infección Zika (37).

Manifestación cardiovascular de la miocarditis por Zika incluye (33-36):

- 1- IC, predominantemente con FE baja (35-36).
- 2- Arritmias auriculares incluyendo fibrilación auricular (35-36).
- 3- Arritmias ventriculares (35-36).
- 4- Disturbios de conducción intraventricular (35-36).
- 5- Pericarditis (35-36).
- 6- Dolor torácico y cambios en el ECG que imitan el infarto de miocardio (34) (Figura 1).

PATOGÉNESIS

La relación entre el ZIKA V y las enfermedades cardiovasculares no se ha establecido. Las diferentes posibilidades incluyen.

- 1) Acción viral directa sobre el corazón (33-37).
- 2) Otra posibilidad podría ser una exagerada respuesta inflamatoria-inmune del huésped (33-37).
- 3) Existen factores genéticos que aumentan la susceptibilidad a desarrollar miocarditis viral aguda potencialmente mortal en pacientes previamente sanos. Defectos recesivos silenciosos del miocardio pueden predisponer a la insuficiencia cardíaca aguda presentando como miocarditis aguda, notablemente después de la infección de arbovirus (38).
- 4) En otras miocarditis por Arbovirus, la hipertensión arterial, la cardiopatía, la diabetes, la edad avanzada se consideraron un factor de riesgo para desarrollar afectación cardíaca (11,12).
- 5) En un estudio en ratón muestra que si el animal tiene anticuerpos de dengue o Virus del Nilo Occidental, puede provocar una infección ZIKV más severa. Si esto sucede en los seres humanos siguen siendo demostrar (39) (Tabla 2).

TABLA 2

HALLAZGOS CARDÍACOS EN INFECCIÓN POR ARBOVIRUS

	Dengue	Chikungunya	Zika
Miocarditis	+	++	+
Pericarditis	+	+	+
Cardiomiopatía e IC	+	+/++	+
Bradicardia	++	++	-
Arritmia auricular y ventricular	+	++	+
ECG anormal	+/++	+	+

CASOS LETALES

Se ha descrito el potencial letal del Zika agudo. En estos casos, la enfermedad anterior subyacente puede haber contribuido con resultados letales. En los informes los pacientes presentaron deterioro clínico rápido con hemorragia y choque séptico y exagerada respuesta inflamatoria aguda e innata con pronunciada coagulopatía. Aunque los autores no mencionaron la manifestación cardiovascular, un paciente desarrolló bradicardia irreversible y otro, ritmo cardíaco irregular y un tercer paciente con enzimas cardíacas elevadas y ECG no diagnóstico de isquemia miocárdica aguda (40).

CONCLUSIONES

La mayoría de las enfermedades tropicales están incluidas dentro de las enfermedades desatendidas u olvidadas. Ellas son infecciones por virus, bacterias o parásitos más prevalentes en regiones tropicales. Como consecuencia de los cambios climáticos, deforestación, inmigración y aumento de los viajes internacionales, ahora es un problema global que afecta más de un billón y mata más de un millón de personas al año, con gran poder incapacitante. Muchas de ellas afectan el corazón y producen IC. La infección por *arbovirus* es transmitida por mosquitos de la especie *Aedes*. Pueden afectar hasta un 40% de la población mundial y pueden producir arritmias,

cardiomiopatías, insuficiencia cardíaca y muerte súbita.

Entre las enfermedades por arbovirus tenemos la fiebre por Chikungunya que suele no ser una enfermedad letal, pero hasta el 40% de los infectados pueden desarrollar manifestaciones cardíacas y la IC es la primera causa de muerte por esta enfermedad. En el caso del Dengue, el 45% de los pacientes con Dengue y signos de alarma o severo pueden desarrollar disfunción sistólica ventricular izquierda. De los pacientes con Dengue y Miocarditis un 25% aproximadamente desarrollan IC comparado con el 0% de los pacientes con Dengue sin Miocarditis.

Hasta el presente no existen reportes de la afectación cardíaca por Zika. Nosotros presentamos por primera vez una serie de 9 casos con manifestaciones cardiovasculares por Zika. En 6 casos se presentó IC, 5 con FE reducida y uno con FE preservada con embarazo, preeclampsia y derrame pericárdico moderado a severo.

La importancia de esta revisión es un llamado a los médicos a estar conscientes con la posibilidad de afectación cardíaca en pacientes con estas infecciones por *arbovirus*. Este conocimiento puede ayudar a establecer un diagnóstico precoz y una estrategia para mitigar las complicaciones.

REFERENCIAS

- 1.-MOOLANI Y, BULCHMAN G, HOTEZ P. *Neglected Tropical Diseases as Hidden Causes of Cardiovascular Disease. Plos* 2012; 1:6.
- 2.- CDC. *Neglected Tropical disease* 2016. 24/7. www.cdc.gov/globalhealth/ntd/index.htm.
- 3.- PONIKOWSKI P, VOORS A, ANKER S, BUENO H, CLELAND J, COATS J, FALK V, GONZALEZ-JUA-NATEY JR, et al. *2016 ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. Eur Heart J.* 2016; 37:2129-2200.
- 4.- MENDOZA I, MARQUES J. *Enfermedad de Chagas. Evaluación clínica de la cardiopatía chagásica aguda y crónica. En García-Fernández M, López-Vélez R, Marqués J, Mendoza I. Cardio Tropical. 1º edition. Madrid-Spain. CTO Editorial. 2014.*
- 5.- KRISTENSEN SL, MARTINEZ F, JHUND PS, ARANGO J. et al. *Geographic variations in the PARADIGM-HF heart failure trial. Eur Heart J.* 2016.
- 6.- BLAIR JE, ZANNAD F, KONSTAM MA et al. *Continental*

- differences in clinical characteristics, management, and outcomes in patients hospitalized with worsening heart failure results from the EVEREST (Efficacy of Vasopressin Antagonism in Heart Failure: Outcome Study with Tolvaptan) program. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 1640-1648.
- 7.- HOWLETT JG, EZEKOWITZ JA, PODDER M et al. Global variation in quality of care among patients hospitalized with acute heart failure in an international trial: findings from the acute study clinical effectiveness of nesiritide in decompensated heart failure (ASCEND-HF). *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2013; 6: 534-542.
 - 8.- MENDOZA I, MORR I, MENDOZA I et al. A New Arrhythmic Threat to America. *Chikungunya Myocarditis. Circulation* 2015; 132: A 12496
 - 9.- MENDOZA I, MORR I, MENDOZA I et al. Chikungunya Myocarditis: An Emerging Threat to America. *JACC* 2015; 65: 10SA946
 - 10.- GONZÁLEZ K, MENDOZA I, MORR I, MORR C, MENDOZA-BRITTO I, MEZA Y, FINIZOLA V, MARQUES J. La triada de la Miocarditis por Chikungunya. Una Nueva Amenaza para Europa y el Mundo. *Rev Española Cardiol* 2016; 7008-7.
 - 11.- ECONOPOULOU A, DOMINGUEZ M, B HELLYNE, D SIS-SOK´ et al. Atypical Chikungunya infection: Clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during de 2005-2006 outbreak on Reunión. *Epidemiol infec* 2009; 137: 534-541.
 - 12.- OBEYESEKERE I, HERMON Y. Myocarditis after arbovirus infections (Dengue and Chikungunya fever). *British Heart Journal* 1972; 34:821-827.
 - 13.- CDC. Chikungunya. Information for emerging and zoonotic infection disease.
 - 14.- CDC. Information of Health-providers 2016. National Center for the emerging and zoonotic diseases 2016.
 - 15.- PAHO/OMS. Número de casos reportados de Chikungunya en países o territorios de las Américas 2016 (por semana) SE 37 G septiembre. 2016. SE 37.
 - 16.- TORRES J, CORDOVAL L, CASTRO J, RODRÍGUEZ L, SARAVIA V, ARVELAEZ J, RIOS-FABRA A, LONGHI M, MARCANO M. Chikungunya fever: A typical and lethal cases in the western hemisphere. A Venezuela experience. *ID cases*. 2015; 2: 6-10.
 - 17.- REQUENA A, GARCÍA C, ALDOSORO E et al. Cases of Chikungunya virus infection in travelers returning to Spain for Haiti or Dominican Republic. April-June 2014 *Eurosurveillance* 2014; 19:1-5
 - 18.- COLLANTES F, DELACOUR S, ALARCON-ELBAL P et al. Review of Ten-Years presence of *Aedes Alpopictus* in Spain. 2004-2014 known distribution and public Health concerns. *Parasites Vectors* 2015; 8:655.
 - 19.- SIMÓN F, PAULE P, OLIVER M. Case Report: Chikungunya virus-induced Myopericarditis: Toward an increase of Dilated Cardiomyopathy in countries with epidemics. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78 (2): 212-213.
 - 20.- MIRABEL M, VIGNAUX B, LEBON P, LEGMANN P, WEBER S, MEUNE C. Acute Myocarditis due to Chikungunya virus assessed by contrast-enhanced MRI. *International J Cardiol* 2007; 121:7-8.
 - 21.- SCHATZ O, ALBERT M. Biology and Pathogenesis of Chikungunya Virus. *Nature Review Microbiology* . 2010; 8:491-500.
 - 22.- MINER J, AW H, FO, TAFFNER S, MALKOVA O, et al. Chikungunya viral arthritis in the United States. *Arthritis Rheumatoid*. 2015; 67: 1214-1220.
 - 23.- OMS. Dengue. Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. [Who/htm/nto/den/2005](http://who/htm/nto/den/2005).
 - 24.- TORRES JR, ECHEZURIA L, FERNANDEZ M, RÍSQUEZ A. Long-term trends in the epidemiology and disease burden of pediatric dengue in Venezuela. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2015, 4:288-9.
 - 25.- MUÑOZ J, PUENTE S, LÓPEZ-VÉLEZ R, DOMINGO C, RUIZ J et al. Estudio Clínico Epidemiológico del Dengue importado en España. *Med Clin* 2008; 131:18-21.
 - 26.- COLLANTES F, DELACOUR S, ALARCON-ELBAL P et al. Review of Ten-Years presence of *Aedes Alpopictus* in Spain. 2004-2014 known distribution and public Health concerns. *Parasites Vectors* 2015; 8:655.
 - 27.- YACOUB S, WERTHEIM H, SIMMONS CP, SCRETON G, WILLS B. Cardiovascular manifestations of the emerging dengue pandemic. *Nat. Rev. Cardiol* 2014; 11: 335-345
 - 28.- LI Y1, HU Z, HUANG Y, LI J, HONG W, QIN Z, TONG Y, LI J, LV M, LI M, ZHENG X, HU J, HUA J, ZHANG F, XU DL. Characterization of the Myocarditis during the worst outbreak of dengue infection in China.
 - 29.- FAUCI A, MORENS D. Zika virus in the America. Yet another arbovirus threat. *N Engl J Med* 2016; 374:601-604.
 - 30.- ATIF M, AZEEM M, REHAN S et al. Zika virus disease. A current review of the literature. *Infection* 2016; 44: 695-705.
 - 31.- CDC. Zika virus. 2016 Case counts in the US. www.cdc.gov/zika/reporting 2016.
 - 32.- PAIXAO E, BARRETO F, TEXEIRA M, et al. History, epidemiology and clinical manifestations of Zika. A systematic review *AJPH* 2016; 106:606-612.
 - 33.- MINHAS A, NAYAB A, IYER S, NARMEEN M, FATIMA K, KHAN M, CONSTANTIN J. Association of ZIKA virus with myocarditis, Heart Failure, and arrhythmias: A literature review. 2017; 9 (6): 1399-44.
 - 34.- ALETTI M, LOCOULES S, KANZUGA V, SOLER C, MAQUART M. Transient myocarditis associated with acute ZIKA virus infection. *Clin Infect Dis* 2017; 64: 678-79.
 - 35.- GONZALEZ K, MENDOZA I, MORR J, MENDOZA-B I, MISTICCHIO F, MEZA Y, FINIZOLA V, CHAZZN G, MARQUES J. Myocarditis, Heart Failure and Arrhythmie in patients with Zika. *JACC* 2017; 69 issuell: 90.
 - 36.- MENDOZA I, GONZALEZ K, MENDOZA-B I, MORR I, ALLISON T, MISTICCHIO F, MEZA Y, FINIZOLA V. First report of Heart Failure due to Zika Myocarditis. *Eur J Heart Failure*. 2017; 19:23.
 - 37.- LI Y, DONG H, HUANG X et al. Characterization of a 2016 Clinical Isolate of Zika Virus in non-human primates. *EB is Medicine* 2016; 12:170.
 - 38.- BELKAYA S, KONTEROVICH A, BYUN M et al. Autozomal recessive cardiomyopathy and acute myocarditis. *J Am*

Coll Cardiol 2017; 69: 1653-1665.

39.- COHEN J. *Dengue May Bring out the worst in Zika* *Sciens* 2017; 355:136

40.- ZONNEVELD R, ROOSBLAD J, WILLEN J, VREDEN S, CO-DRINGTEN J. *Three atypical lethal case associated with acute Zika virus infection in Suriname. IS cases 2016*; 5: 49-53.

Enfermedad de Chagas: un diagnóstico olvidado de serias consecuencias

**Belkisyolé Alarcón De Noya¹,
Luciano Mauriello¹,
Arturo Muñoz-Calderón¹,
Zoraida Díaz-Bello¹,
Milagros Aponte¹,
Eyleen Moronta¹,
Paola Fratarolli²,
Yerly Mendoza¹,
Jefferson Muñoz¹,
Sara Pérez¹,
Laurelys Vasquez¹,
Cecilia Colmenares^{1,2},
Raiza Ruiz-Guevara²**

¹ Universidad Central de Venezuela,
Facultad de Medicina, Instituto de Medicina
Tropical "Dr. Félix Pifano C.",
Sección de Inmunología.

² Escuela de Medicina "Luis Razetti",
Facultad de Medicina, UCV.
belkisuole@gmail.com

RESUMEN

Para el Instituto de Medicina Tropical, desde su fundación hace 70 años, la Enfermedad de Chagas (ECh) ha sido motivo de investigaciones pioneras realizadas por Félix Pifano y Alberto Maekelt, en el área de la epidemiología y el diagnóstico destacándose los aportes en diagnóstico serológico, la elaboración de antígeno de *Trypanosoma cruzi* y la evaluación de la transmisión en áreas rurales. En la Sección de Inmunología (SI) se realizan varias técnicas para el diagnóstico parasitológico, inmunológico y molecular de la ECh en sus fases aguda y crónica. Suman 244 casos agudos evaluados en la SI desde 2007 cuando se describe la primera microepidemia de transmisión oral para Venezuela y la más numerosa en Latinoamérica. La detección simultánea de parásitos o su ADN en sangre, y de anticuerpos específicos en toda la población expuesta facilita el diagnóstico temprano para tratar los casos de manera inmediata evitando consecuencias fatales. En relación a los casos crónicos, la afluencia promedio de usuarios en el período estudiado (2013-2016) es de 879 personas/año resultando entre 11-15% los positivos al diagnóstico. Estos se detectan principalmente en personas "picadas por chipos", en cardiopatas y en el grupo mayor de 50 años en quienes la positividad es del 25% de los usuarios, diagnóstico tardío cuando el beneficio del tratamiento anti-parasitario es prácticamente nulo. La data de los pacientes crónicos no aporta indicación de transmisión en grupos vulnerables como niños y embarazadas, pues el número de usuarios es muy bajo. Es necesario incorporar el diagnóstico de la ECh en protocolos de rutina varios síndromes clínicos (fiebre prolongada, derrame pericárdico), en pacientes inmunosuprimidos, embarazadas, niños, conscriptos, programas de trasplantes, entre otras. Es urgente considerar la encuesta nacional de serología de ECh en el grupo etario de 5 a 20 años.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas; serología; tratamiento; casos agudos; casos crónicos; Instituto de Medicina Tropical, UCV.; Venezuela; Tripanosomiasis.

CHAGAS DISEASE: A FORGOTTEN DIAGNOSIS OF SERIOUS CONSEQUENCES

ABSTRACT

For the Institute of Tropical Medicine, since its foundation 70 years ago, Chagas Disease (ChD) has been the subject of pioneering research carried out by Félix Pifano and Alberto Maekelt, in the area of epidemiology and diagnosis,

highlighting the contributions in serological diagnosis, the preparation of *Trypanosoma cruzi* antigen and the evaluation of transmission in rural areas. Several techniques for the parasitological, immunological and molecular diagnosis of ChD in its acute and chronic phases are carried out in the Immunology Section (IS). There are 244 acute cases evaluated in the IS since 2007 when the first oral transmission microepidemic was described in Venezuela, the largest in Latin America. The simultaneous detection of parasites or their DNA in blood, and specific antibodies throughout the exposed population facilitates early diagnosis to treat cases immediately avoiding fatal consequences. In relation to chronic cases, the average influx of users in the period studied (2013-2016) was 879 persons / year, resulting in 11-15% positive diagnosis. These are detected mainly in people "bitten by chipos", in heart disease and in the group older than 50 years in whom positivity is 25%, late diagnosis when they cannot be benefited by anti-parasitic treatment. The data of chronic patients does not provide an indication of transmission in vulnerable groups such as children and pregnant women because the number of users is very low. It is necessary to incorporate the diagnosis of ChD into routine protocols of various clinical syndromes (prolonged fever, pericardial effusion), immunosuppressed patients, pregnant women, children, conscripts, transplant programs, etc. It is urgent to consider the national survey of serology of ChD in the age group of 5 to 20 years.

Keywords: Chagas Disease; serology; treatment; acute cases; chronic cases; Tropical Medicine Institute; Venezuela.

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Chagas (ECh) es una zoonosis parasitaria que puede afectar al humano. Su agente causal es el protozooario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, endémica en América donde es transmitida por varios géneros de triatomos hematófagos. Los mecanismos de infección de la ECh se dividen en dos grandes grupos: uno en el cual está involucrado el vector y otro en los cuales no es indispensable la participación del mismo. La transmisión vectorial es exclusiva de países donde habita el insecto y las condiciones climáticas y sociales que permiten su existencia. De manera habitual las personas adquieren la ECh cuando son picados por el triatomo y las heces del mismo contentivas de tripomastigotes metacíclicos (formas parasitarias de diseminación altamente infectantes), contaminan la herida producida por la picadura o las mucosas (Rassi et al. 2010). En ocasiones, animales y humanos ingieren bebidas o alimentos contaminados con las heces infecta-

das de los triatomos (Coura, 2006) o mediante las secreciones anales de didélfidos infectados con *T. cruzi* (Deane et al. 1984). En el segundo grupo de transmisión, el vector no se encuentra directamente involucrado como la que ocurre por accidentes en el laboratorio por la manipulación de material infectante con muestras biológicas o mamíferos infectados (Herwaldt 2001; Colmenares et al. 2015) y la transmisión hombre-hombre a través de transfusiones sanguíneas (Bern et al. 2011), transplacentaria (Carlier & Truyens. 2010) y por trasplantes de órganos (Favaloro et al. 2015).

En el vertebrado, el parásito se multiplica por fisión binaria intracelularmente en forma de amastigotes y el mecanismo de acción patógena se centra en la destrucción celular una a una pudiendo afectar casi todos los tejidos del hombre, siendo el corazón el principal órgano blanco de la fisiopatología de la enfermedad (Rassi et al. 2010). Aproximadamente el 30% de las personas infectadas desarrollan la fase aguda de la enfermedad con manifestaciones clínicas de intensidad variable caracterizada por fiebre alta, edemas facial o en miembros inferiores, rash, hepatomegalia, miocarditis, derrame pericárdico y gran postración. En pacientes infectados vectorialmente con puerta de entrada cutánea se puede apreciar el Chagoma de inoculación en piel y el complejo oftalmoganglionar denominado "signo de Romana" (Prata, 2001). De no sobrevenir un desenlace fatal, de mayor frecuencia cuando la transmisión es oral (Noya et al. 2015), la fase sintomática se apaga progresivamente y el paciente pasa a la fase crónica. El 70% de los pacientes en fase crónica no desarrolla la enfermedad o presentan mínimos cambios electrocardiográficos, de hecho se encuentran asintomáticos. Esta fase se denomina indeterminada también llamada ECh crónica asintomática. El resto de los pacientes en fase crónica (30%) transita progresivamente por los estadios caracterizados por Kuschner (1985) hacia la miocardiopatía e insuficiencia cardíaca con cardiomegalia y arritmia de variable intensidad (Viotti & Vigliano. 2015).

Los estudios pioneros en Venezuela se deben en

especial a José Francisco Torrealba, quien desde el año 1932 inició estudios en el estado Guárico (Torrealba, 1935) e introdujo el xenodiagnóstico; mientras que Félix Pifano (1941) creó la base para los estudios epidemiológicos y clínicos en el país a través de sus trabajos publicados como el realizado en el estado Yaracuy. Ambos autores venezolanos resaltan su magnitud como problema de salud pública y social en nuestro país, así como la importancia de la pobreza y del "rancho" de techo de palma y paredes de bahareque en el mantenimiento de esta zoonosis.

En el Instituto de Medicina Tropical (IMT) de la Universidad Central de Venezuela (UCV), Alberto Maekelt (1960) pone a punto su protocolo para la preparación de antígenos, el cual todavía es utilizado en el país, y Pifano (1960) publicó las primeras cifras nacionales de prevalencia, que en algunas localidades rurales llegaba hasta el 45%, estimándose en 500.000 de 7.000.000 el número de venezolanos infectados por *T. cruzi*, con tasas de miocardiopatía de 50% en personas infectadas y de 20% en la población rural total.

Maekelt, en la década del 50 detectó 12% de seropositivos en donantes de sangre en el estado Carabobo (Maekelt, 1959). Pocos años después, se establecería que de 3,5 a 5% de los hemodonadores en Venezuela eran portadores de anticuerpos a *T. cruzi* (Pifano et al. 1961). Al comprobar en Venezuela la transmisión de *T. cruzi* por transfusiones (Salazar et al. 1962), la División de Endemias Rurales, conjuntamente con el IMT de la UCV emprendieron un estudio nacional de seroprevalencia para comprobar la transmisión de *T. cruzi* por transfusiones, empleando la Reacción de Fijación de Complemento en bancos de sangre y otros centros asistenciales. La seroprevalencia global se estableció en 6% en 152.487 muestras examinadas (Guerrero et al. 1965).

El Dr. Alberto Maekelt fundó la Sección de Inmunología (SI) en el IMT, estableciendo las bases del diagnóstico con la producción del antígeno soluble de epimastigotes de *T. cruzi* a gran escala, abasteciendo las dependencias del Ministerio de la Salud y de los Bancos de Sangre nacionales para el diagnóstico de

la ECh por Hemaglutinación Indirecta e Inmunofluorescencia durante 43 años, y después por ELISA a partir del año 1998 (Díaz-Bello et al. 2008). Esta responsabilidad se extiende hasta la actualidad, ya no con la amplitud de esos años pero si con el prestigio heredado de la responsabilidad y profesionalismo de los sucesivos integrantes de dicha Sección. En el 70 aniversario de la fundación del Instituto de Medicina Tropical, la SI-IMT hace un homenaje a sus fundadores en las personas de los Dres. Félix Pifano y Alberto Maekelt, quienes hicieron grandes y pioneros aportes en el conocimiento de la Enfermedad de Chagas en Venezuela (Figura 1).

Figura 1



Dr. Félix Pifano

Dr. Alberto Maekelt

La SI-IMT ha tenido una participación protagónica en los brotes de ECh aguda por transmisión oral y ha divulgado su conocimiento en publicaciones, conferencias, programas de radio y televisión siendo muy satisfactorio que algunos brotes hayan sido identificados por otros grupos médicos del país. Sin embargo, es nuestra permanente preocupación concientizar a los servicios de salud sobre la presencia de la ECh no sólo en fase aguda, la cual tiene la grave consecuencia de ser eventualmente letal de no diagnosticarse y tratarse oportunamente, sino también el reconocimiento de la fase crónica, insospechada por los médicos incluyendo especialistas, quienes no se plantean el diagnóstico de la ECh de entrada en pacientes con manifestaciones cardiológicas insipientes u otras evidentes de miocardiopatía chagásica

añadiendo años sin tratamiento anti-parasitario a los ya acumulados por la dinámica de evolución silente de esta patología. El presente artículo tiene como objetivo comunicar algunas experiencias del trabajo de la SI-IMT en la década 2007-2016 relativa a los casos agudos y algunos datos de la rutina de la consulta externa del período 2013-2016, a fin de conocer datos epidemiológicos, reforzar el criterio diagnóstico y aportar recomendaciones útiles al Programa Nacional de Control de la Enfermedad de Chagas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población en estudio: Consideramos como población los solicitantes de diagnóstico en la Consulta Externa del IMT. De este grupo se rescataron las historias en físico de 3517 personas desde el año 2013 al 2016 y los resultados de laboratorio de 1441 usuarios del año 2012. De allí que para el año 2012 sólo se dispone del dato de prevalencia más no de los datos demográficos. Lamentablemente, este estudio no pudo ser mayor por la sustracción de computadores y respaldos ocurridos a la SI durante el año 2016. La segunda población en estudio es la relativa a los casos agudos, los cuales no están incluidos en la casuística anterior. Como su nombre lo indica, estos pacientes se encuentran en situación de emergencia, son la mayoría referidos con otra impresión diagnóstica. Estos pacientes no ingresan en la rutina de la Consulta Externa y el abordaje diagnóstico es diferente.

Registro de ingreso: Al solicitar el diagnóstico de ECh se llena una pequeña historia con la identificación, sexo, edad, procedencia, motivo de consulta y teléfonos. Los pacientes acuden al IMT de manera voluntaria, por haber sido picados por triatominos, por resultar positivos en Banco de Sangre o referidos por el médico tratante.

Diagnóstico de rutina: Atendiendo las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se deben realizar dos pruebas de diagnóstico con fundamento diferente de manera indistinta. Para el diagnóstico de rutina se realiza el Ensayo Inmuno-Enzimático (ELISA) y Hemaglutinación Indirecta (HI

o Aglutinación Directa (AD). Adicionalmente, en la actualidad se practica la confirmación del diagnóstico utilizando técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en ingles).

Ensayo Inmuno-Enzimático (ELISA): Partiendo del método de Voller et al. (1976) se practicaron modificaciones para estandarizar el ELISA como sigue. El antígeno se fijó a la fase sólida (placas de poliestireno MaxiSorp NUNC) a una concentración final de 1 µg/50µl en PBS ph 7,2. Se agrega por duplicado 50ml de los sueros, diluidos 1/50 en solución de lavado (SL) PBS pH 7.2-Tween 20 al 0,05% con leche descremada (LD) al 5% y se incuba a 37°C por 40 min en cámara húmeda. Las placas se lavan 4 veces con SL en lavador automático TECAN y luego se agrega 50ml de la anti-IgG humana conjugada a fosfatasa alcalina diluida 1/500 en SL-LD y se incuba a 37°C por 40 min en cámara húmeda. Transcurrido el tiempo se realizan 4 nuevos lavados con SL y se agrega 50ml del substrato para-nitrofenilfosfato, diluido en buffer dietanolamina pH 9.6 (1 mg/ml) y se incuba a 37°C por 10 min. Para detener la reacción se añade 50ml de NaOH 1N y se realiza la lectura de absorbancia (Abs) a 405 nm en un lector de placas ELISA TECAN Spectra Classic. Se fijó el punto de corte por el promedio de la densidad óptica más 2 desviaciones estándar de 100 sueros de pacientes con resultados de ELISA-IgG negativos. Valores de Abs menores a 0.200 se consideran negativos y mayores a 0.230 positivos. Los resultados con valores entre estas dos cifras se repiten o se toma una nueva muestra al paciente.

Hemaglutinación Indirecta: Glóbulos rojos de carnero fueron tratados con ácido tánico y sensibilizados con antígenos de epimastigotes de *T. cruzi*. Los glóbulos rojos tanizados y sensibilizados al 1%, fueron añadidos a diluciones seriadas de los sueros, agitados y dejados en reposo durante 16 horas a temperatura ambiente hasta la lectura de los resultados (Díaz-Bello et al. 2008).

Cultivo agar-sangre: Dos ml de sangre se cultivaron en medio bifásico y revisados periódicamente por al menos 3 meses (WHO, 2002).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

Para la extracción de ADN se utilizaron 5 ml de sangre total con EDTA como anticoagulante mezclado con igual volumen de 6M Guanidina HCl /0,2M EDTA (Sturm et al. 1989). La reacción de amplificación se dirigió a la detección de un fragmento de 330 pares de base (pb) perteneciente al ADN del minicírculo del kinetoplasto de *T. cruzi* (Schijman et al. 2003).

Abordaje del paciente con resultado positivo al inmunodiagnóstico:

Se les refiere a la consulta de Cardiología del IMT cuya especialidad es el manejo clínico de la ECh y se le da cita en nuestra consulta clínica para evaluar la pertinencia de administrar tratamiento anti-parasitario.

Abordaje del paciente agudo:

Cuando la notificación es del interior del país, se solicita el envío de tres tubos: tapa roja, tapa morada (EDTA) y tapa azul (Citrato de Sodio), para la serología (determinación de IgM e IgG específicas por ELISA), Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y cultivo/inoculación en ratón, respectivamente. Si el paciente está hospitalizado en la región capital, nos trasladamos para conocer la historia, examinar al paciente y tomar las muestras.

Tratamiento: Dependiendo de la disponibilidad se le administra benznidazol (6 mg/kg/día por 60 días) y onifurtimox (8 mg/kg/día por 90 días). Se le da tratamiento programado a cualquier persona con serología positiva por dos métodos a quien se le solicita hematología, química sanguínea, electrocardiograma y Rx de tórax. El seguimiento inicial es quincenal, advirtiéndole de los efectos colaterales y con consentimiento informado firmado por el paciente o su custodio. En caso agudo se le indica de inmediato y se hace seguimiento semanal, también con consentimiento escrito. En general, el tratamiento debería ser ofrecido a los adultos hasta los 50 años pero se evita en pacientes con cardiopatía avanzada (WHO, 2002).

RESULTADOS

Casos agudos de los brotes orales: Proviene de los brotes de transmisión oral ocurridos desde el año 2007. Desde entonces se registran 14 brotes de ECh de transmisión oral en Venezuela (Alarcón de Noya et al. 2015), de los cuales la SI-IMT ha participado en nueve (Tabla 1A). Se contabilizan 244 casos

Localidad	Fechas	Pacientes (n)	Adultos (n)	Niños (n)	Mortal. n(%)
Chacao, Caracas, DC	Diciembre 2007	103	26	77	1(1)
San José, Caracas, DC	Mayo 2008	3	2	1	0
Chichiriviche, Vargas	Marzo 2009	89	9	80	5(5,6)
Antímano, Caracas, DC	Mayo 2010	22	5	17	1(4,5)
Coche, Caracas, DC	Marzo 2012	4	4	0	0
Mirimire, Falcón	Junio 2013	8	8	0	1(12,5)
El Guapo, Miranda	Febrero 2014	3	2	1	0
San Cristóbal, Táchira	Julio 2014	5	4	1	0
Guarenas, Miranda	Marzo 2015	4	3	1	1(25)
Yaguapita, Miranda	Julio 2015	3	3	0	0
Total		244	66 (27%)	178 (72,9%)	9 (3,7%)

Tabla 1A

Brotes de Enfermedad de Chagas de transmisión oral en Venezuela en los cuales ha participado la Sección de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical.

agudos en total distribuidos en 178 niños y 66 adultos, con 9 personas fallecidas. En la Tabla 1B se muestran los casos registrados en otros brotes orales en el país.

Dos microepidemias se registraron en escuelas públicas, la primera urbana, en el Municipio Chacao en Caracas afectó a 103 personas (Alarcón de Noya et al. 2010); y la segunda una escuela rural en Chichiriviche de la Costa, Estado Vargas afectando 88 personas (Alarcón de Noya et al. 2016). En las encuestas epidemiológicas en estas dos microepidemias, el vehículo común probable de transmisión lo constituyó un jugo

de frutas preparado artesanalmente, que para el caso de Chacao se evidenció una relación estadísticamente significativa entre la ingesta del jugo de guayaba y la serología positiva (Alarcón de Noya et al. 2010). El abordaje diagnóstico y los resultados encontrados en situación de emergencia en Chacao fue publicado en detalle (Alarcón de Noya et al. 2012). En la Tabla 2 se comparan los estudios de laboratorio en la población expuesta y en infectados por *T. cruzi* en las dos microepidemias escolares atendidas por la SI-IMT, Chacao 2007 y Chichiriviche de la Costa 2009.

Localidad	Fechas	Pacientes (n)	Adultos (n)	Niños (n)	Mortal. n (%)
Rubio, Táchira	Noviembre 2010	7	4	3	1(14,3)
El Bordo, Mérida	Noviembre 2012	5	2	3	1(20)
La Macarena, Mérida	Junio 2015	12	9	3	3(25)
San Cristóbal, Táchira	Mayo 2016	5	2	3	0
Total		29	17 (58,6%)	12 (41,3%)	4 (13,8%)

Tabla 1B

Brotos de Enfermedad de Chagas de transmisión oral en Venezuela diagnosticados por otras dependencias diferentes al Instituto de Medicina Tropical.

Variables		Chacao	Chichiriviche
Pacientes	Infectados/Evaluados	103/1000 (10,3%)	88/441 (20%)
	Niños	77 (74,8%)	79 (89,8%)
	Adultos	26 (25,2%)	9 (10,2%)
Pruebas inmunológicas	ELISA IgG (+)	103/103 (100%)	86/88 (97,7%)
	ELISA IgM (+)	90/103 (87,4%)	87/88 (98,9%)
	HAI (+)	99/103 (96,1%)	85/88 (96,6%)
Pruebas parasitológicas y moleculares	Cultivo (+)	7/43 (16,3%)	51/67 (76,1%)
	PCR (+)	35/44 (79,5%)	40/50 (80%)

Tabla 2

Comparación de los resultados de laboratorio obtenidos en las dos microepidemias escolares de infección oral por *Trypanosoma cruzi*, Chacao 2007 y Chichiriviche de la Costa 2009 en Venezuela.

Casos de la Consulta Externa: El número total de pacientes evaluados en la Consulta Externa de la SI-IMT en el quinquenio 2012-2016 fue de 4958. Sin embargo, solo se logró obtener los datos demográficos de 3517 personas para el período 2013-2016. El motivo de la solicitud del examen de laboratorio es muy variado tal como puede apreciarse en la Tabla 3 en la cual se muestran los motivos de consulta distribuidos por año durante el periodo 2013 al 2016. Destacan la picadura del vector, poseer antecedentes

epidemiológicos (familiares con ECh, proceder de área endémica), serología positiva anterior (generalmente en bancos de sangre) y el descarte. Este último renglón incluye aspirantes a ingresar en el ejercicio militar, pre-empleo en algunas empresas, algunos pacientes inmunosuprimidos, entre otras. Por otra parte, llama la atención las pocas solicitudes en embarazadas, en pacientes con VIH y en personas en programa de trasplantes, tanto a los donantes como a los receptores.

Motivo de consulta	Total de pacientes			
	2013	2014	2015	2016
ACV	3	2	3	24
Adenomegalia	2	1	1	0
Antecedente epidemiológico	31	89	31	20
Arritmia y bloqueos	32	10	28	20
Cardiomegalia	16	2	19	18
Cardiopatía (otras)	32	4	22	30
Cefalea	3	3	2	7
Cirugía	3	4	8	11
Control	5	5	13	14
Derrame pericárdico	2	0	3	1
Descarte (milicia, pre-empleo)	24	16	162	53
Dolor en el pecho	12	14	51	63
Donante de sangre	2	0	3	1
Edema	2	2	3	2
Embarazo	15	12	12	19
Hepatoesplenomegalia	3	3	1	1
Hipertensión arterial	29	54	20	27
Infección por VIH/SIDA	5	13	7	1
Picada de chipo	91	78	157	167
Pre-operatorio	1	1	0	3
Serología anterior positiva	34	39	19	9
Síndrome febril	17	16	8	5
Trasplante	9	2	7	11

Tabla 3

Motivo de consulta de los usuarios solicitantes de diagnóstico de Enfermedad de Chagas en la Sección de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical, UCV, Caracas, Venezuela, 2013-2016

Datos demográficos: La distribución por sexo en 3517 personas solicitantes fue de 51% en mujeres y 49% en varones. La procedencia de los usuarios para el período 2013-2016 se ilustra en la Figura 3, donde destacan las solicitudes de personas provenientes del Estado Vargas. Sin embargo, cuando se analiza la procedencia de las personas infectadas, estas provienen en su mayoría de Caracas y el Estado Miranda (Figura 4).

La prevalencia promedio de infección por *T. cruzi* para el quinquenio 2012-2016 se ubica en 12,4%, siendo del 6,5% de positividad en 1441 personas atendidas en el año 2012. A partir de entonces se observa una disminución de solicitantes, pero una mayor frecuencia de casos diagnosticados ubicándose la prevalencia entre 11,7 y 15,4% para el período 2013-2016.

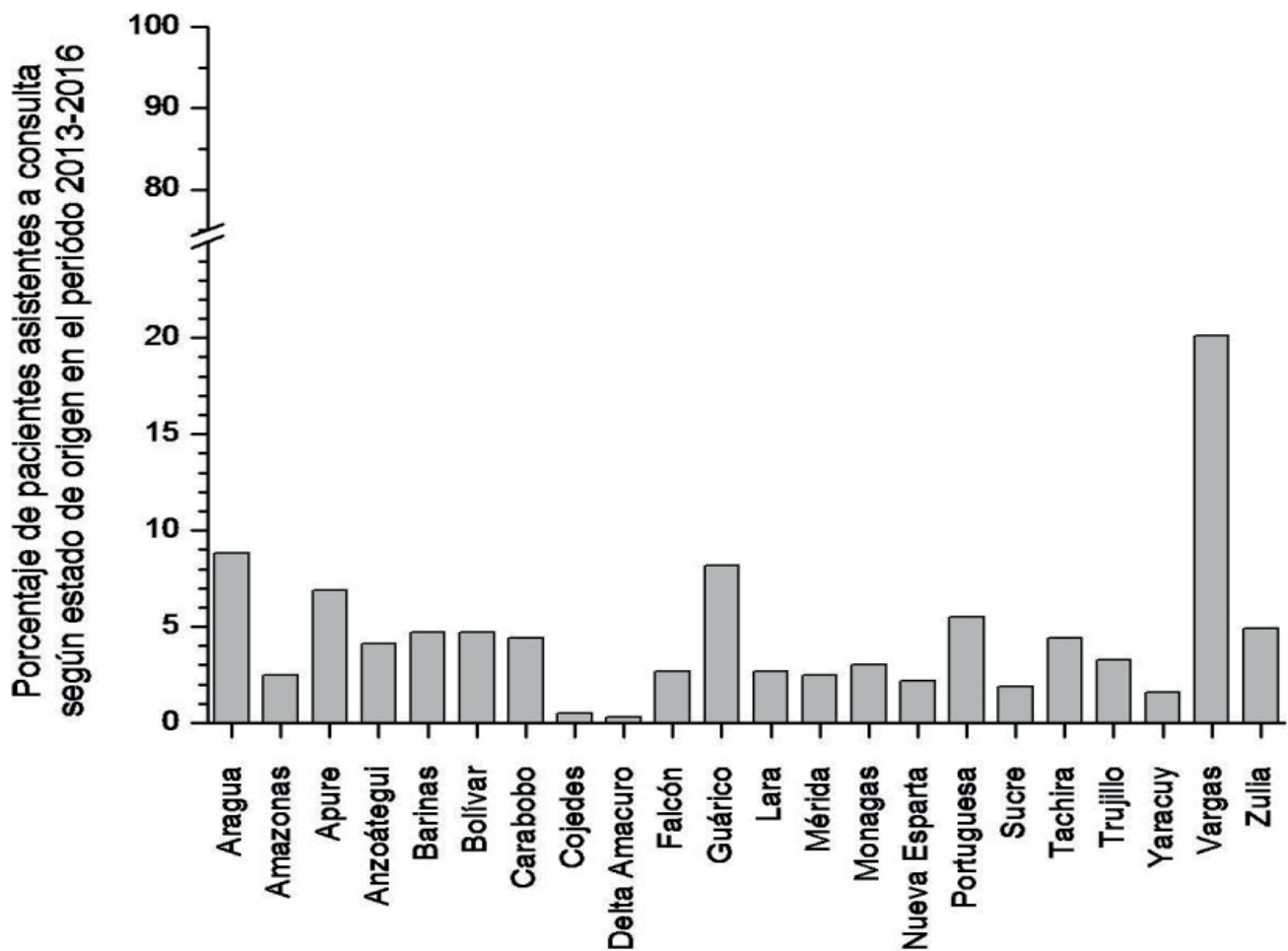


Figura 3

Distribución de acuerdo al estado de procedencia de los usuarios solicitantes de diagnóstico de Enfermedad de Chagas en la Sección de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical, Caracas, Venezuela, 2013-2016.

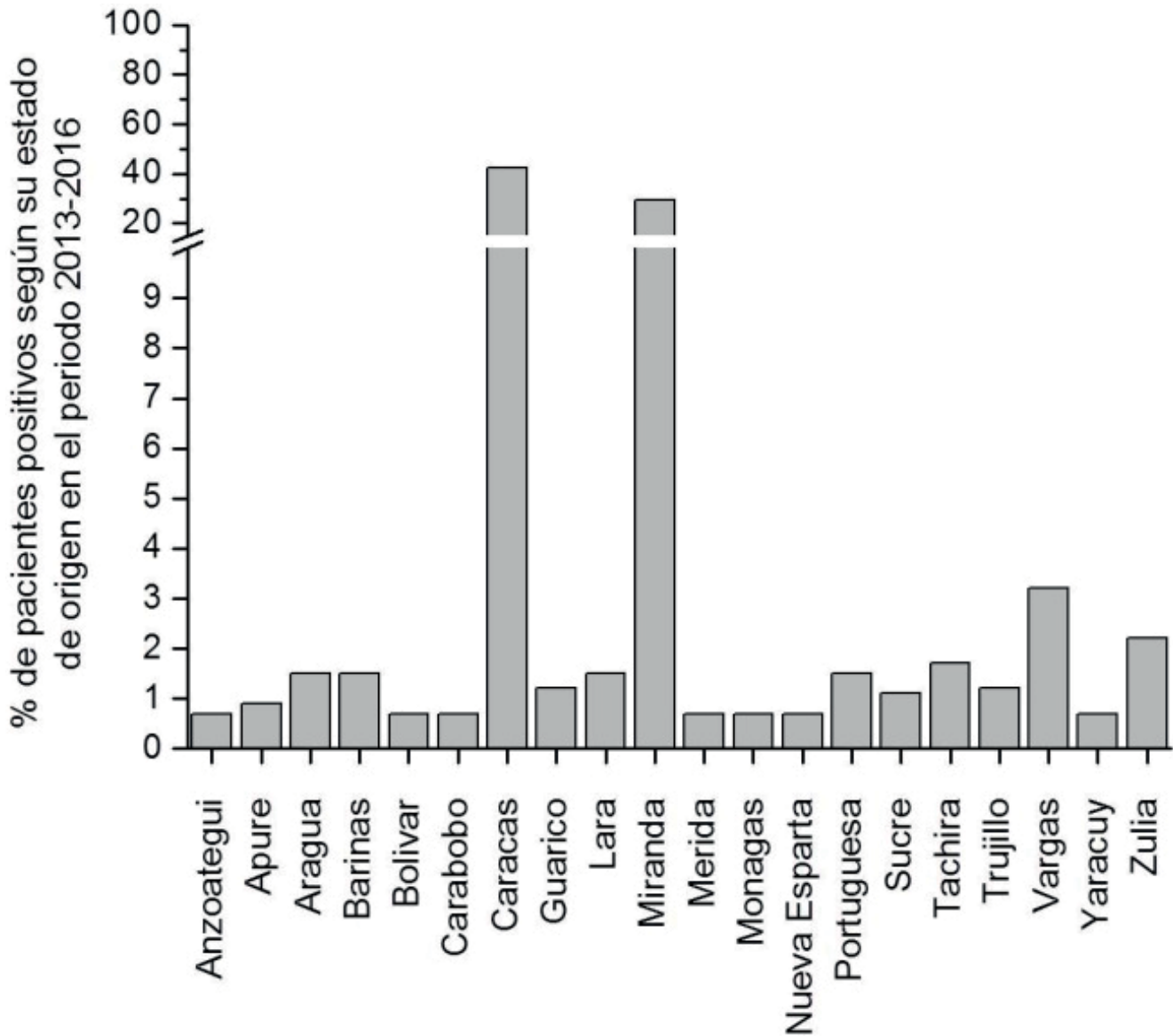


Figura 4

Distribución de acuerdo al estado de procedencia de los pacientes infectados con *Trypanosoma cruzi* en la Sección de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical, Caracas, Venezuela, 2013-2016.

La Tabla 4 recoge la información general relativa al número de usuarios, número de positivos en la serología en dos pruebas de diagnóstico diferentes y su distribución por grupo etario para el período 2013-2016. Se aprecia la poca afluencia de niños y mayor positividad (de 21 a 29%) en el grupo etario > de 50 años.

Pacientes tratados con medicamentos anti-*Trypanosoma cruzi*: Se nos presentan las dos situaciones de la ECh: el tratamiento en fase aguda y el tratamiento de los pacientes en fase crónica. La

Tabla 5 muestra el número total de personas tratados en la SI-IMT. Deben descontarse 21 personas tratadas en el brote de Chacao a quienes se les administró tratamiento como casos probables por vínculo epidemiológico pero no se les demostró infección por *T. cruzi*, por lo que el número de pacientes en fase aguda demostrada tratados es de 242. El total de pacientes diagnosticados por año contrasta con el número de los pacientes tratados, especialmente en lo que se refiere al tratamiento de pacientes crónicos.

Grupo etario	2013		2014		2015		2016	
	Total de pacientes	Positivos IgG específica anti-T.cruzi	Total de pacientes	Positivos IgG específica anti-T.cruzi	Total de pacientes	Positivos IgG específica anti-T.cruzi	Total de pacientes	Positivos IgG específica anti-T.cruzi
<1 año	3	0	17	1	7	2	5	0
1 a 10 años	74	0	76	2	60	0	34	0
11 a 20 años	96	1	98	5	90	1	79	1
21 a 30 años	130	6	139	6	138	5	75	3
31 a 40 años	98	9	111	4	129	8	90	7
41 a 50 años	134	11	134	16	115	13	85	6
>50 años	398	117	388	100	371	78	343	86
Total	933	144 (15,4%)	963	134 (13,9%)	910	107 (11,7%)	711	103 (14,4%)

Tabla 4

Distribución por edad de los solicitantes de diagnóstico de Enfermedad de Chagas e infectados en la Sección de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical, UCV, Caracas, Venezuela, 2013-2016.

AÑO	CASOS AGUDOS		CRÓNICOS
	PROBABLES Y CONFIRMADOS	CONFIRMADOS	
2007	121	100	12
2008	3	3	37
2009	88	84	40
2010	25	21	24
2011	0	0	29
2012	4	4	16
2013	8	8	18
2014	9	8	13
2015	5	5	15
2016	0	0	14
Total	263	233	218

Tabla 5

Personas tratadas con anti-parasitarios para *Trypanosoma cruzi* en la Sección de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical, UCV, Caracas, Venezuela, 2013-2016.

DISCUSIÓN

Existen varias formas de llegar al diagnóstico de la ECh siendo las más frecuentes a través de los bancos de sangre donde se examina un reducido sector de la población, en el cual el donante no necesariamente se entera del resultado de los exámenes practicados a su donación y el descarte en personas con cardiopatía

(cardiomegalia o arritmias). Tampoco se sospecha en casos agudos no asociados a la presencia del vector, constituyéndose los casos agudos de transmisión oral en un elemento de reciente descubrimiento en la epidemiología de la ECh en Venezuela. La inexistencia del despistaje obligatorio de infección por *T. cruzi* (por ejemplo en embarazadas, niños, certificados médicos) contribuye al desconocimiento de la situación actual de la transmisión de *T. cruzi*. De aquí nuestra permanente preocupación por concientizar a los servicios de salud sobre la existencia de casos agudos de alta letalidad debido a la infección oral por *T. cruzi* y a la presencia de la fase crónica asintomática de la ECh. En el primer caso, el diagnóstico es responsabilidad de los servicios médicos de emergencia y en el segundo caso, el diagnóstico temprano sólo es posible por la práctica de la serología en programas de vigilancia epidemiológica a nivel nacional con filtros de diagnóstico, por ejemplo al entrar en la primaria, al terminar el sexto grado, al ingresar a la universidad, en embarazadas y en los certificados de salud en los exámenes de pre-empleo en toda la población.

Para diagnosticar la ECh en sus diferentes presentaciones clínicas hay que sospecharla, de aquí que es necesaria la incorporación de este diagnóstico en los protocolos del síndrome febril prolongado de causa desconocida, en el síndrome edematoso, en

el hepatoesplénico, en conjuntivitis, en síndrome ganglionar, en pacientes con VIH-SIDA, en trasplantes, entre otros. No todas las personas que se infectan se enferman, y no todas las personas que adquieren la enfermedad desarrollan la fase aguda. Los pacientes en su mayoría, pasan a la fase crónica inaparente, asintomática sin mayores daños aparentes detectables por los exámenes de rutina. En este punto, es importante destacar que la forma clínica de presentación de la ECh en su fase aguda (cuando se presenta) es muy diferente a la fase crónica y por otra parte, la forma aguda por el mecanismo de infección transcutánea es diferente a la infección por vía oral.

Mantenemos que el diagnóstico de la fase aguda en líneas generales es casual, accidental y por tanto inesperado. No se plantea como diagnóstico de primera impresión diagnóstica, a menos que se encuentre vinculado con otros casos agudos ya diagnosticados. Por otra parte, el diagnóstico confirmado de la ECh producto de un despistaje por motivos laborales, por donación de sangre o por vinculación con un pariente infectado, es siempre una sorpresa tanto para el paciente como para el médico.

Los brotes de ECh de transmisión oral nos presentan una nueva realidad epidemiológica (Alarcón de Noya & Noya. 2015) ya que estamos frente a la diseminación y domiciliación de una plaga de triatominos hematófagos con una especie frecuentemente reportada en el país y registrada en la región capital como es *Panstrongylus geniculatus*, vector que además se encuentra infectado en el 75% de los ejemplares examinados en el IMT (Carrasco et al. 2014). Desde 2007 se han reportado 14 episodios de ECh de transmisión oral en el territorio nacional con mortalidad promedio de 5% (Alarcón de Noya et al. 2015), y hasta de 25% en el brote de Mérida 2015 (Áñez et al. 2016). Han sucedido uno ó dos brotes anuales desde 2007 y en septiembre 2017 se diagnosticó en Colombia, la infección aguda por *T. cruzi* en dos niños fallecidos provenientes de Táriba, Estado Táchira. La ocurrencia de transmisión oral se ha repetido varias veces a nivel central (región capital, Estados Vargas y Miranda) y en el occidente del país en los

Estados Falcón, Mérida y Táchira. Como quiera que *P. geniculatus* está ampliamente distribuido en todo el territorio nacional, los brotes de transmisión oral y los casos agudos transcutáneos pueden aparecer en cualquier estado donde exista la presencia de triatominos hematófagos. La fase aguda de ECh es difícil de diagnosticar, no por los exámenes de laboratorio sino porque la ECh no se encuentra en los protocolos clínicos habituales y puede confundirse con las arbovirosis, infección urinaria, paludismo y otras infecciosas.

La aplicación simultánea del inmunodiagnóstico por ELISA para la detección de anticuerpos específicos IgM e IgG fue la clave para la detección de los casos agudos en la población expuesta. Los ensayos parasitológicos y moleculares sólo se pudieron realizar en un segmento de la población infectada pues de entrada se requería del diagnóstico del caso confirmado para la inmediata administración de tratamiento anti-parasitario. Con la experiencia de la primera microepidemia (Chacao), los resultados para la detección del parásito en la población afectada de Chichiriviche fueron más efectivos. El diagnóstico de laboratorio debe ser abordado con todas las pruebas de diagnóstico posible, no sólo para la determinación de los anticuerpos específicos sino también para la demostración del parásito. El tratamiento anti-parasitario, solamente expedido por las Direcciones de Salud Ambiental del Ministerio Popular para la Salud, debe ser administrado inmediatamente posterior al diagnóstico en los casos comprobados y en aquellos sintomáticos vinculados epidemiológicamente. La evolución suele ser rápida y puede presentarse un desenlace fatal por derrame pericárdico severo y arritmia.

La motivación para solicitar el diagnóstico es variable. En los datos de la consulta externa del IMT, la más frecuente es la picadura de chipo seguida por “descarte”. En este ítem se incluyen aquellas personas con resultado positivo en banco de sangre. Este motivo está mal registrado pues dependiendo del entrevistador cuando una persona tiene un resultado positivo en banco de sangre lo puede incluir en

“descarte, antecedentes epidemiológicos, serología anterior positiva o donante de sangre”. La afluencia de niños, embarazadas y personas jóvenes es baja, por lo tanto una de nuestras recomendaciones es la incorporación del despistaje de la ECh de rutina en grupos bajo riesgo como niños, embarazadas, conscriptos, pre-empleo, en quienes el tratamiento anti-parasitario tiene indicación.

En relación con las embarazadas, el despistaje de la ECh debería estar incluido en las pruebas de infecciones del embarazo que pueden comprometer al feto (TORCH) por el solo hecho de ser un país endémico de ECh. En este sentido, hemos considerado proponer las siglas TORCHCh en la cual Ch representaría “Chagas”. No obstante, esta iniciativa requiere de una decisión política más que académica. Venezuela fue el primer país donde se detectó la transmisión congénita de la infección por *T. cruzi* (Dao, 1949). Desde entonces las notificaciones de transmisión vertical se reducen a tres casos más (Gavaller, 1953; Suárez et al. 2010; Alarcón de Noya et al. 2017), los dos últimos ocurridos durante la fase aguda de la ECh transmitida oralmente demostrándose la presencia del parásito en los órganos fetales (Alarcón de Noya et al. 2017; Suárez et al. 2010). La presencia tan extendida del vector en el país y la presencia del ciclo urbano de *T. cruzi* en ciudades como Caracas (Herrera, 2014) son motivos suficientes para practicar la serología de la ECh en la embarazada venezolana independientemente de su lugar de procedencia. Si bien la administración de medicamentos anti-*T. cruzi* está contraindicada durante el embarazo, la positividad en una embarazada advierte al médico de los riesgos a los cuales puede exponerse al feto y su obligatoriedad de descarta un caso congénito. El tratamiento de mujeres en edad fértil ha disminuido considerablemente la aparición de casos congénitos (Sosa-Estani et al. 2009).

La fase crónica puede ser silente en el 70% de los casos crónicos ó puede ser sintomática aun en personas jóvenes quienes evolucionan rápidamente a la miocardiopatía chagásica caracterizada por cardiomegalia y arritmias (Viotti & Vigliano. 2015). En las dos circunstancias, el diagnóstico siempre es tardío, ya

que la infección ha ocurrido generalmente en la niñez y el paciente ha evolucionado silenciosamente a la cronicidad sin recibir tratamiento el cual es de menor eficiencia durante la fase crónica de la enfermedad. Nuestro criterio es administrar tratamiento específico a aquellas personas que lo puedan tolerar y quienes aún no se encuentran en fases terminales (Kuschnir II y III). En el período evaluado 2013-2016, la afluencia de personas menores de 20 años fue muy baja y el porcentaje de positividad es más frecuente en personas mayores de 50 años lógicamente porque son referidas por cardiólogos cuando la ECh ya muestra todas sus características clínicas.

En diez años hemos administrado tratamiento antiparasitario a un poco más de casos agudos (242) que de casos crónicos (218). De los casos agudos tratados, 233 corresponden a personas infectadas por vía oral. Los pacientes de los brotes orales no están incluidos en los casos diagnosticados en la Consulta Externa. El número de casos crónicos tratados contrasta con el número de diagnosticados siendo su rango de 12 a 40 pacientes por año en los diez años revisados. Estas cifras corresponden parcialmente al número de pacientes diagnosticados menores de 50 años a quienes convocamos de manera insistente para administrarles tratamiento anti-parasitario. Los pacientes con infección confirmada por *T. cruzi* mayores de 50 años, generalmente ya han progresado a Kuschnir II o III y no reciben tratamiento. No obstante, evaluamos las condiciones del paciente y los beneficios. En otras palabras, la frecuencia del diagnóstico de la ECh es más numerosa en pacientes mayores cuando ya es muy poco o ninguno, el beneficio del tratamiento anti-parasitario.

RECOMENDACIONES

1. Reactivar y fortalecer el Programa de Control de la Enfermedad de Chagas.
2. Restringir el uso de bebidas artesanales en colegios, sustituyéndolos por productos pasteurizados.
3. Control sanitario de expendedores de bebidas artesanales.

4. Incluir la práctica del despistaje de la ECh en los exámenes de la embarazada.
5. Realizar cortes poblacionales de diagnóstico en escolares, al ingresar, al egreso del 6 grado y al egreso del bachillerato.
6. Incluir el diagnóstico de ECh en revisiones de pre-emplero, exámenes médicos de conscriptos, universitarios, entre otros.
7. Practicar el diagnóstico de la ECh en protocolos de VIH, trasplantes (de cualquier órgano), estudios de fiebre prolongada, en inmunosuprimidos o en personas con tratamientos con esteroides, en cardiopatías agudas y crónicas de cualquier edad.
8. Control de calidad del diagnóstico de la ECh en bancos de sangre.
9. Plantearse la encuesta nacional de Enfermedad de Chagas en toda la población de 5 a 20 años con los grupos de salud del Ministerio y de las universidades y centros de investigación.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a los Profesores Alexis Mendoza y Consuelo Ramos quienes ofrecieron un volumen completo de esta revista a fin de compilar nuestros artículos, a propósito del aniversario 70 de la fundación del Instituto de Medicina Tropical. A José Jesús Cubillán por la revisión del manuscrito.



Sección de Inmunología- IMT 2016

REFERENCIAS

- ALARCÓN DE NOYA B., PÉREZ-CHACÓN G., DÍAZ-BELLO Z., DICKSON S., MUÑOZ-CALDERÓN A., HERNÁNDEZ C., PÉREZ Y, MAURIELLO L., MORONTA E. (2017). "Description of an oral Chagas disease outbreak in Venezuela, including a vertically transmitted case". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 112: 569-571.
- ALARCÓN DE NOYA B., COLMENARES C., DÍAZ-BELLO Z., RUIZ-GUEVARA R., MEDINA K., MUÑOZ-CALDERÓN A., MAURIELLO L., CABRERA E., MONTIEL L., LOSADA S., MARTÍNEZ J., ESPINOSA R., ABATE T. (2016). "Orally-transmitted Chagas disease: Epidemiological, clinical, serological and molecular outcomes of a school microepidemic in Chichiriviche de la Costa, Venezuela" *Parasite Epidemiology and Control* <http://dx.doi.org/10.1016/j.parepi.2016.02.005>
- ALARCÓN DE NOYA B., DÍAZ-BELLO Z., COLMENARES C., RUIZ-GUEVARA R., MAURIELLO L., ZAVALA-JASPE R., SUÁREZ J.A., ABATE T., NARANJO L., PAIVA M., RIVAS L., CASTRO J., MÁRQUES J., MENDOZA I., ACQUATELLA H., TORRES J., NOYA O. (2010). "Large urban outbreak of orally-acquired acute Chagas disease, at a school in Caracas, Venezuela". *Journal of Infectious Diseases* 201 (9): 1308-1315.
- ALARCÓN DE NOYA B., DÍAZ-BELLO Z., COLMENARES C., RUIZ-GUEVARA R., MAURIELLO L., MUÑOZ-CALDERÓN A., NOYA O. (2015). "Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 110(3): 377-386.
- ALARCÓN DE NOYA B., DÍAZ-BELLO Z., COLMENARES C., ZAVALA-JASPE R., ABATE T., CONTRERAS R., LOSADA S., ARTIGAS D., MAURIELLO L., RUIZ-GUEVARA R., NOYA O. (2012). "The performance of laboratory tests in the management of a large outbreak of orally transmitted Chagas disease". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 107 (7): 893-898.
- ALARCÓN DE NOYA B., NOYA O. (2015). "An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission". *ActaTropica* 151: 94-102.
- AÑEZ N., CRISANTE G., ROJAS A., ROJAS R.O., BASTIDAS J. (2016). "A new acute oral Chagas disease outbreak in Merida, Venezuela: A comprehensive study". *International Journal of Clinical Medicine Research* 3 (1): 29-37.
- BERN C., KJOS S., YABSLEY M.J., MONTGOMERY S.P. (2011). "*Trypanosoma cruzi* and Chagas disease in the United States". *Clinical Microbiology Reviews* 24: 655-681.
- CARRIER Y., TRUYENS C. (2010). "Maternal-fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*. In: "American Trypanosomiasis, Chagas disease: one hundred years of research". Ed. J. Telleria y M.E. Tibayrenc. Elsevier, New York, NY, p. 539-581.
- CARRASCO H.J., SEGOVIA M., LONDOÑO J.C., ORTEGOZA J., RODRÍGUEZ M., MARTÍNEZ C.E. (2014). "*Panstrongylus geniculatus* and four other species of triatomine bug involved in the *Trypanosoma cruzi* enzootic cycle: high risk

- factors for Chagas' disease transmission in the Metropolitan District of Caracas, Venezuela". *Parasites and Vectors* 7: 602-617.
- COLMENARES C., ALARCÓN DE NOYA B., NOYA GONZALEZ O. (2015). "Mechanisms of infection in Chagas disease. In: "Trypanosoma cruzi as a foodborne pathogen". Ed. Belkisyolé Alarcón de Noya, Oscar Noya González & Lucy Robertson. Springer International Publishing AG Switzerland, p. 21-32.
- COURA J.R. (2006). "Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease". *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39 (4): 113-117.
- DAO L. (1949). "Otros casos de Enfermedad de Chagas en el estado Guárico (Venezuela). Formas agudas y crónicas. Observación sobre Enfermedad de Chagas congénita". *Revista de la Policlínica Caracas* 18: 107-109.
- DEANE M.P., LENZI H.L., JANSEN A. (1984). "Trypanosoma cruzi: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 79(4): 513-515.
- DÍAZ-BELLO Z., ZAVALA-JASPE R., DÍAZ-VILLALOBOS M., MAURIELLO L., MAEKELT A., ALARCÓN DE NOYA B. (2008). "Diagnóstico confirmatorio de anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi en donantes referidos por bancos de sangre en Venezuela". *Investigaciones Clínicas* 49 (2): 141-50.
- FAVALORO L., PERADEJORDI M., NAGEL C. (2015). "Enfermedad de Chagas y trasplantes de órganos en Enfermedad de Chagas. Un enfoque práctico basado en la investigación médica". Ed. Rodolfo Viotti & Carlos Vigliano. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina, p. 303-320.
- GAVALLER B. (1953). "Enfermedad de Chagas congénita. Observación anato-mopatológica en gemelos". *Boletín de la Maternidad Concepción Palacios* 4: 59-65.
- GUERRERO L., DOMINGUEZ-QUESADA M., GARCÍA-MARTÍN G., BORGES L. (1965). "Estado actual de la campaña contra la Enfermedad de Chagas en Venezuela". *Archivos Venezolanos de Medicina Tropical* 5(1): 219-265.
- HERRERA L. (2014). "Trypanosoma cruzi, the causal agent of Chagas disease: boundaries between wild and domestic cycles in Venezuela". *Frontiers in Public Health* 2:259.
- HERWALDT BL. (2001). "Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures". *Clinical Microbiology Review* 14: 659-688.
- KUSCHNIR E., SGAMMINI H., CASTRO R., EVEQUOZ C., LEDESMA R., BRUNETTO J. (1985). "Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography, in patients with chronic Chagas cardiopathy". *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 45(4): 249-256.
- MAEKELT G.A. (1959). "Contribución para el estudio de la Enfermedad de Chagas en Venezuela. Investigaciones serológicas de la Enfermedad de Chagas mediante la reacción de fijación de complemento". *Archivos Venezolanos de Medicina Tropical* 3 (1):252-271.
- MAEKELT G.A. (1960). "Die complementbindung reaction der Chagas krankheit". *Z. Trop. Med. Parasitol.* 21: 39-44.
- NOYA, O., RUIZ-GUEVARA, R., DÍAZ-BELLO, Z., ALARCÓN DE NOYA, B. (2015). *Epidemiología y clínica de la transmisión oral de Trypanosoma cruzi*. Revista Española de Epidemiología. IX Taller sobre la Enfermedad de Chagas. Avances en el conocimiento de la clínica, la fisiopatología y la inmunología. Barcelona, España. p. 23-34
- PIFANO F. (1941). "La epidemiología de la Enfermedad de Chagas en el estado Yaracuy". *Revista de Sanidad y Asistencia Social* 6: 303-310
- PIFANO F. (1960). "Algunos aspectos de la Enfermedad de Chagas en Venezuela". *Archivos Venezolanos de Medicina Tropical y Parasitología Médica* 3: 73-99.
- PIFANO F., MAEKELT A.G., ANSELMI A., DÍAZ-VÁSQUEZ A., GUERRERO L., GARCÍA-MARTIN C., GAMBOA J., TONELLI L. (1961). "Estado actual de la Enfermedad de Chagas en Venezuela. II Evaluación de los métodos diagnóstico empleados en las encuestas epidemiológicas de la Enfermedad de Chagas". *Revista Venezolana de Sanidad y Asistencia Social* 26: 17-24
- PRATA A. (2001). "Clinical and epidemiological aspects of Chagas' disease". *Lancet Infectious Diseases* 1: 92-100.
- RASSI JR A., RASSI A., MARIN-NETO J.A. (2010). "Chagas disease". *Lancet* 375 (9723): 1388-1402.
- SALAZAR J., ARENDS T.E., MAEKELT A. (1962). "Comprobación en Venezuela de la transmisión del *Schizotrypanum cruzi* por transfusión de sangre". *Archivos Venezolanos de Medicina Tropical* 4 (2): 355-364.
- SCHIJMAN A.G., ALTICHEH J., BURGOS J.M., BIANCARDI M., BISIO M., LEVIN M.J., FREILIJ H. (2003). "Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52 (3): 441-449.
- SOSA-ESTANI S., CURA E. VELÁSQUEZ E., YAMPOTIS C., SEGURA E.L. (2009). "Etiological treatment of young woman infected with *Trypanosoma cruzi*, and prevention of congenital transmission". *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42 (5): 484-487.
- STURM N., DEGRAVE W., MOREL C., SIMPSON L. (1989). "Sensitive detection and schizodeme classification of *T. cruzi* cells by amplification of kinetoplastid minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease". *Molecular and Biochemical Parasitology* 33 (3): 205-214.
- SUÁREZ J., DE SUÁREZ C.B., ALARCÓN DE NOYA B., ESPINOSA R., CHIURILLO M.A., VILLARROEL P.A, MARTÍN F., PAIVA M., DÍAZ-BELLO Z., VALDERRAMA E., ESTRADA D., VIVAS E. (2010). "Enfermedad de Chagas sistémico en fase aguda por transmisión oral: diagnóstico integral de un caso autopsiado". *Gaceta Médica de Caracas* 118 (3): 212-222.
- TORREALBA J.F. (1935). "La maladie de Chagas au Venezuela. Decouverte et Recherches dans la Région de Zaraza. Etat de Guárico". *Investigaciones sobre la Enfermedad de Chagas en San Juan de los Morros. Estado Guárico, Venezuela. Otras Notas Científicas. Recopilación. Vargas. Caracas, Venezuela. Fascículo VII: 203-243.*
- VIOTTI R, VIGLIANO C. (2015). "Presentación Clínica y Etapas en "Enfermedad de Chagas. Un enfoque práctico basado en la investigación médica". Ed. Rodolfo Viotti y

Carlos Vigliano. *Editorial Médica Panamericana*. Buenos Aires, Argentina, p. 129-139.

WHO (2002). "Control of Chagas disease: report of a WHO expert committee". *WHO Technical Report Series 905*:1-109.

Emergencia del virus Zika en Latinoamérica, aprendiendo en el camino

JAIME R TORRES R¹

¹Universidad Central de Venezuela.
Instituto de Medicina Tropical
"Dr. Félix Pifano C."
torresj@email.com

RESUMEN

La emergencia del Zika con carácter epidémico en el continente americano ha creado situaciones inéditas desde el punto de vista epidemiológico, obligando a los sistemas de salud regionales a enfrentar desafíos para los cuales no estaban completamente preparados y a improvisar decisiones para copar con una difícil situación de gran impacto en la población afectada. El análisis de la experiencia vivida puede servir de aprendizaje para afrontar potenciales futuras situaciones epidémicas con agentes virales transmitidos por vectores urbanos.

Palabras Clave: Zika; complicaciones clínicas; preparación; desafíos

EMERGENCE OF ZIKA VIRUS IN LATIN AMERICA. LEARNING ON THE FLY

ABSTRACT

The emergence of the zika fever as a large epidemic affecting most of the Americas has created new situations from the epidemiological point of view, forcing regional health systems to face challenges for which they were not fully prepared and improvise decisions to cope with a difficult situation of great impact on the affected population. The analysis of such experience might serve as a learning point to deal with eventual epidemic situations due to other viral agents transmitted by urban vectors in the future.

Keywords: Zika; clinical complications; preparedness; challenges

Los desafíos de la salud pública global han cambiado dramáticamente en el último siglo. Producto de las tendencias epidemiológicas y demográficas, las enfermedades crónicas no transmisibles han desplazado a las enfermedades infecciosas como primera causa de morbi-mortalidad. Aun así, situaciones como la pandemia de H1N1 (2009) y la epidemia de Ébola (2014-2015) han puesto en evidencia la persistencia de las enfermedades infecciosas como un importante problema de salud pública, y la necesidad de una respuesta global frente a patógenos emergentes, revelando igualmente la amenaza de la re-emergencia de infecciones que se creían bajo control, en medio de profundas carencias en salud en los países en vías de desarrollo. Con el advenimiento reciente de la epidemia de Zika en Lati-

noamérica, se han evidenciado los profundos desafíos que implica enfrentarse a escenarios de incertidumbre en salud pública, si bien nuestra región ha sido más diligente y autónoma en sus decisiones en parte debido a algunos avances de sus sistemas sanitarios.

Ciertamente, la inequidad social, el rápido crecimiento urbano no planificado, la inequidad en el acceso a sistemas efectivos de aprovisionamiento de agua potable y las migraciones humanas en países en vías de desarrollo han sido factores determinantes en la persistencia e incremento en el continente tanto de la presencia del mosquito *Aedes aegypti* como del virus del Dengue durante las últimas décadas (Kraemer et al. 2015). Esta situación, ahora facilita la introducción de otras infecciones transmitidas por el mismo vector como lo son Chikungunya, Zika y potencialmente de número importante de virus en el futuro.

Aunque el virus del Zika (ZIKV) fue identificado en Uganda en 1947, solo casos esporádicos fueron reportados en Asia y África en las décadas posteriores (Dick et al. 1952). Se considera que la reciente epidemia de Zika que nos afecta se inició en 2007 en la Micronesia, luego se expandió a la Polinesia Francesa en 2013, y a partir de allí pasó a Latinoamérica, empezando en Brasil a finales de 2014, desde donde se extendió rápidamente a la mayor parte de los países de los otros países de la región (cita 3; Campos et al. 2015). No obstante, a diferencia de los virus Dengue (DENV) y Chikungunya (CHIKV), los cuales se asocian con una letalidad significativa y en el caso del segundo, con una alta tasa de ataque clínico, el ZIKV ha representado una situación mucho más compleja y de un innegable gran impacto poblacional debido en parte a su asociación con microcefalia y otras graves lesiones congénitas, además de complicaciones postinfecciosas como el síndrome de Guillain-Barré (Staples et al. 2016; WHO. 2016). Adicionalmente, es posible que un número significativo de las infecciones observadas en los países afectados sean adquiridas por vía sexual y no vectorial, dificultando aún más el control y prevención de la infección (MMRW. 2017).

Las razones subyacentes para la propagación mundial observada del ZIKV no han sido aclaradas

totalmente, destaca lo poco que entendemos aún sobre la difusión mundial de flavivirus y otras enfermedades transmitidas por vectores. Las hipótesis actualmente bajo consideración incluyen posibilidades tan diversas como la evolución adaptativa del ZIKV que permitiría una mayor infectividad para los vectores urbanos de especies de *Aedes*, o alternatively, una evolución adaptativa en el huésped humano que conduciría a niveles más altos de viremia que a su vez facilitaría tanto la transmisión por los mosquitos como el riesgo de transmisión fetal transplacentaria.

No menos importante parece ser la introducción de ZIKV en poblaciones sin exposición previa, impulsada por el incremento de los viajes internacionales, expansión de los centros urbanos tropicales, áreas y abundantes poblaciones de mosquitos susceptibles.

El hemisferio occidental ha enfrentado a una situación epidemiológica sin precedentes con la cocirculación generalizada de los virus del Dengue, Chikungunya y Zika, tres arbovirus de importancia en salud pública. La simultánea emergencia y reemergencia de estos tres agentes plantea nuevos retos tanto para los médicos como para las autoridades de salud.

Las características clínicas sobrepuestas entre las enfermedades causadas por ZIKV, DENV y CHIKV, así como la posible reactividad cruzada entre DENV, ZIKV y otros flavivirus cuando se utilizan los métodos inmunológicos para la detección de IgM, dificultan el diagnóstico confiable de la enfermedad en áreas con circulación activa de ambos virus (Waggoner y Pinsky. 2016). Esta situación se complica aún más debido a la posibilidad de coinfecciones con cualquier combinación de ellos en el humano (Waggoner y Pinsky. 2016; Zambrano et al. 2016), y la documentación experimental de la infección dual en mosquitos (Nuckols et al. 2015).

Debido a la alta posibilidad de reactividad cruzada entre DENV y ZIKV en los inmunoensayos para la detección de IgM y de IgG, en las Américas el diagnóstico diferencial mediante detección de ARN viral es fundamental para identificar al agente causante de estas infecciones en este contexto (Cabral-Castro et al. 2016). Sin embargo, el uso de tecnologías de

diagnóstico más asequibles para países en desarrollo, tales como la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) anidada, puede plantear un riesgo mayor de resultados falsos positivos en comparación con la PCR en tiempo real; por lo tanto, algunos resultados requeriría confirmación por otras técnicas validadas como RT-PCR o secuenciación viral (Cabral-Castro et al. 2016; Calvo et al. 2016).

La detección cualitativa simultánea y la diferenciación del ARN de ZIKV, DENV y CHIKV en el suero humano o en líquido cefalorraquídeo, y la detección cualitativa del ARN del ZIKV en muestras de orina y líquido amniótico (colectadas junto con muestras de suero del mismo paciente) puede lograrse mediante la técnica de rRT-PCR (Waggoner J.J., Pinsky B.A. 2016).

Una particularidad interesante del ZIKV es su capacidad de transmitirse sexualmente, además la posibilidad de transmisión transplacentaria y perinatal durante el parto y posiblemente, por transfusión sanguínea (Besnard et al. 2013-2014; Musso et al. 2013-2014). La primera evidencia de transmisión sexual fue sugerida en 2011 y más tarde confirmada por varios informes (Foy et al. 2011; Musso et al. 2015; D'Ortenzio et al. 2016; Hills et al. 2016). Aunque en solamente pocos casos los pacientes involucrados experimentaron hematospermia, como evidencian los casos publicados por Foy (Foy et al. 2011) y Musso (Musso et al. 2015); los reportes paralelos de Torres (Torres et al. 2016), y Huits (Huits et al. 2016) confirman e indican que la microhematospermia puede ser un evento relativamente común. De hecho, en la serie de casos (Huits et al. 2016), de los cuatro pacientes convalecientes de infección reciente por ZIKV seguidos prospectivamente para evaluar la cinética del virus en semen, uno experimentó hematospermia patente asintomática y otros tres microhematospermia; adicionalmente, los cuatro casos publicados por Torres (Torres et al. 2016), presentaron microhematospermia asintomática por períodos prolongados, todo lo cual sugiere que los hombres con infección aguda pueden desarrollar cambios inflamatorios en el tracto urogenital que jugarían un papel potencial en la presencia y persistencia del virus en este

compartimiento corporal, con niveles de carga viral superiores a los concurrentes en el suero (Huits et al. 2016). Ningún otro arbovirus ha demostrado ninguna asociación con hematospermia o ha sido encontrado en el semen. Por otra parte, la demostración de ZIKV infeccioso en la orina, junto con la detección de ARN de ZIKV en la orina incluso después de la viremia, podría ser consistente con replicación de ZIKV en el tracto urinario (Atkinson et al. 2016; Foy et al. 2011; Reusken et al. 2016). Debe destacarse que al menos dos instancias de transmisión sexual de un portador asintomático de ZIKV en semen han sido reportadas (Fréour et al. 2016).

Aunque la picadura de mosquito representa sin lugar a dudas el principal modo de transmisión de Zika, la baja viremia observada en muchos pacientes y la rápida difusión dentro y entre países de algunas regiones como las Américas, apoya el papel de otros modos de transmisión, tales como las relaciones sexuales, que podrían contribuir a su diseminación (Atkinson et al. 2016; Brooks et al. 2016; Fréour et al. 2016; Huits et al. 2016; Lazear y Diamond. 2016; Reusken et al. 2016). Como resulta difícil identificar y caracterizar los casos de infección por transmisión sexual infección por el virus Zika en áreas que experimentan intensas transmisión autóctona vectorial del ZIKV, la mayor parte de los reportes de transmisión sexual se originan en zonas donde no ocurre transmisión autóctona lo que permite oportunidades únicas e importantes para aprender sobre este modo emergente de transmisión.

La situación de relativo aislamiento inmune de los testículos puede permitir al ZIKV persistir en estos órganos por períodos prolongados, sirviendo como reservorios con potencial para permitir la transmisión sexual a personas sanas. El período de eliminación del ZIKV por el semen parece coincidieron con la duración de la espermatogénesis (69-80 días), sugiriendo la posibilidad de infección de células progenitoras del semen y la persistencia viral durante el proceso de diferenciación (Atkinson et al. 2016; Huits et al. 2016). Debe destacarse que los ratones inmunodeficientes con infección experimental por el ZIKV

muestran los niveles más altos de replicación viral en los testículos y cerebro (Rossi et al. 2016). No obstante, se requieren de más estudios dirigidos a conocer mejor los mecanismos que hacen posible la persistencia del ZIKV en el semen y el riesgo real de transmisión sexual del ZIKV.

La constatación de un prolongado riesgo potencial para la transmisión sexual, por períodos más prolongados a los inicialmente reportados, ha conducido a una revisión de las recomendaciones de prevención de transmisión sexual e infecciones en el embarazo emitidas por las autoridades de salud en diversos países (Nicastri et al. 2016).

La evidencia creciente de la asociación entre Zika y alteraciones neurológicas congénitas severas, dada principalmente por aumento en el reporte de casos de microcefalia en diversos países, llevó a la OMS a decretar una emergencia de alcance internacional el 1 de febrero de 2016 (Gulland. 2016). Aun no disponemos de suficientes estudios prospectivos que permitan precisar el riesgo exacto de transmisión vertical del ZIKV, si bien la información existente sugiere que el mismo es mayor que lo inicialmente estimado. En cerca de 1.000 embarazadas con evidencia de laboratorio de infección aguda por el ZIKV seguidas en el Registro Nacional de Zika de EEUU, que completaron sus embarazos en 2016, 10% de los recién nacidos presentaron lesiones congénitas, cifra que ascendió al 15% en aquellos cuyas madres tuvieron infección confirmada durante el primer trimestre (Honein et al. 2017).

En este escenario incierto, los ministerios de salud de los países de la región han tenido que tomar decisiones de salud pública, algunas de ellas muy controversiales, a fin de minimizar el impacto de la primera ola de la epidemia. Tal es el caso de la recomendación a las mujeres en edad reproductiva que viven en áreas de riesgo de posponer el embarazo entre 6 meses y hasta dos años. Sin embargo, este tipo de recomendación además de compleja y controversial, resulta difícil de implementar en la práctica debido a las serias limitaciones que las mujeres latinoamericanas tienen para acceder a métodos anticonceptivos

o recibir información y educación sexual (Roa. 2016). No obstante, estudios recientes de modelación epidemiológica sugieren que los esfuerzos por limitar la exposición al ZIKV durante el embarazo en áreas de alta transmisión, son muy limitados en el primer año de la epidemia; lo cual es seguido de una disminución acelerada de la exposición al virus en mujeres en edad reproductiva en los siguientes dos años, independientemente de los esfuerzos de control vectorial, debido al rápido desarrollo de inmunidad adquirida en la población, lo que a su vez haría que la infección de las embarazadas en los años siguientes sea muy improbable (Bewick et al. 2016).

Se dispone de poca información sobre el tropismo celular de ZIKV y la naturaleza de los receptores celulares que median su entrada en diferentes tejidos, así como los mecanismos de infección utilizados por el ZIKV y la activación de las vías de respuesta inmune específica del huésped provocada por el virus. En este sentido, la obra de Chen y colaboradores (2016), revelando que los fibroblastos uterinos (UF) son susceptibles a la infección por el ZIKV abre la posibilidad de que el útero juega un papel relevante en la transmisión sexual del virus (Chen et al. 2016).

Estos resultados están en concordancia con reportes anteriores y recientes en la literatura que resaltan la importancia de los fibroblastos como un tipo de célula de replicación primaria para los

flavivirus, pudiendo contribuir con una posterior diseminación (Bustos-Arriaga et al. 2011; Chen et al. 2016). La infección viral primaria de fibroblastos de la piel con el ZIKV está vinculada con una estimulación de la expresión de TLR3 mRNA y un aumento de la transcripción de RIG-I y MDA5, todos los cuales están relacionados con la respuesta inmune innata a las infecciones por virus ARN. Esto es seguido por un aumento en la expresión de interferón alfa y -beta y sus vías descendentes de activación inmune (Bustos-Arriaga et al. 2011). Se requieren investigaciones adicionales, a fin de definir la contribución exacta con la infección por el ZIKV de receptores específicos celulares en los fibroblastos y/o de eventuales factores de adherencia, su tropismo y patogénesis.

En la experiencia latinoamericana, las mujeres de edad reproductiva fueron mucho más propensas a padecer Zika que los hombres durante la epidemia, sugiriendo la posibilidad de que la transmisión sexual de hombre a mujer puede explicar esta diferencia (Coelho et al. 2016). Una salvedad a esta conclusión es el hecho de que sólo porque las estadísticas muestren una correlación evidente entre estos dos parámetros no quiere decir que necesariamente existe una relación causal subyacente. De hecho, la confirmación de al menos un caso de transmisión de la infección por ZIKV de una mujer sintomática a una pareja de sexo masculino (Davidson et al. 2016), y la detección de RNA del ZIKV en fluidos vaginales de un paciente 3 días después del inicio de los síntomas y en el moco cervical hasta 11 días (Davidson et al. 2016; Prisantemail et al. 2016), indica que las parejas de mujeres infectadas pueden adquirir ZIKV a través exposición a las secreciones vaginales o sangre menstrual durante el acto sexual. Por lo tanto, otros factores explicarían en parte por qué las mujeres en el grupo de edad sexualmente activas pueden verse más afectados (Coelho et al. 2016).

Debe destacarse que datos experimentales recientes indican que ratones hembras infectadas por vía intravaginal desarrollan una inducción respuesta inmune innata inadecuada reflejada en una mínima producción de interferón antiviral y una débil respuesta inflamatoria local, ocasionando un control disminuido de la replicación viral y una falla en la maduración de las células presentadoras de antígenos (CPA) a nivel vaginal. Otros virus ARN como el virus de la linfocoriomeningitis también afectan la inmunidad adaptativa localmente al ser inoculados intravaginalmente debido a la falta de maduración de las CPA, lo cual a su vez produce un retardo en la activación de las células CD8+ en los ganglios linfáticos regionales, que interfiere con la aparición rápida células T CD8+ efectoras en la mucosa vaginal, retardando aún más el control viral en esta órgano (Khan et al. 2016).

El Síndrome de Guillain Barré (SGB) representa un riesgo genuino en pacientes recientemente infectados con el ZIKV. Esta asociación primero fue divulgada

durante el brote de Zika en la Polinesia francesa entre 2013 y 2014 (Cao-Lormeau et al. 2016), donde el riesgo de sufrir de SGB fue 10 veces al riesgo anual en países como los EEUU (24 por 100.000 Vs. 1,8 por cada 100.000 infecciones, respectivamente). La mayoría (88%) de los casos de SGB en pacientes sintomáticos se desarrollan alrededor de 6 días después de iniciados los síntomas de la infección aguda (Cao-Lormeau et al. 2016; Dos Santos et al. 2016).

Según los datos reportados por los países de la región a la Organización Panamericana de la Salud, también se observó un significativo aumento de la incidencia de SGB en Brasil, Colombia, Venezuela y El Salvador, en asociación con la epidemia reciente de Zika en las Américas (Dos Santos et al. 2016). La mortalidad del SGB asociado al ZIKV se espera que sea mayor en aquellos entornos médicos donde las disponibilidades de dispositivos para apoyo respiratorio no son adecuadas o son escasas, como es el caso en muchos lugares de América Latina.

Cabe señalar que cambios en la incidencia de SGB en la región pudieran no estar relacionados exclusivamente a la infección por el ZIKV per se, sino también a las fluctuaciones en la incidencia de DENV u otros flavivirus que pudieran favorecer la mayor patogenicidad del mismo a través de mecanismos de reforzamiento inmunológico dependiente de antibióticos, como ha sido sugerido por estudios in vitro (Bardina et al. 2017).

En medio de la epidemia, los países deben seguir tomando decisiones basados aún en un conocimiento incompleto de los efectos de este virus a nivel tanto individual como poblacional, efectos que de hecho podrían tardar algunos años para ser completamente entendidos. Así, esta epidemia nos está enseñando, entre muchas otras cosas, que los sistemas de salud deben estar cada vez mejor preparados para enfrentar amenazas inicialmente desconocidas. La incorporación de herramientas epidemiológicas más complejas en la toma de decisiones, abre una posibilidad de poner en evidencia los escenarios más importantes a los cuales nos enfrentamos en una situación de incertidumbre.

Entre muchos desafíos, promover la generación a nivel regional de este conocimiento y su incorporación en la toma de decisiones, serán fundamentales para enfrentar esos futuros escenarios.

REFERENCIAS

- ATKINSON B., HEARN P., AFROUGH B., LUMLEY S., CARTER D., AARONS E.J., HEWSON, R (2016) Detection of Zika virus in semen *Emerg Infect Dis* 22: 940.
- BARDINA S.V., BUNDUC P., TRIPATHI S., DUEHR J., FRERE J.J., BROWN J.A., NACHBAGAUER R., FOSTER G.A., KRYSZTOF D., TORTORELLA D., STRAMER S.L., GARCÍA-SASTRE A., KRAMMER F., LIM J.K. (2017) Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting antinflavivirus immunity *Science* 356 (6334): 175-180.
- BESNARD M., LASTERE S., TEISSIER A., CAO-LORMEAU V., MUSSO D. (2013) Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia *Euro Surveill* 19: 20751.
- BEWICK S., FAGAN W.F., CALABRESE J.M., FOLASHADE A. (2016) Zika virus: Endemic versus epidemic dynamics and implications for disease spread in the Americas *Cold Spring Harbor Labs J* DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/041897>
- BROOKS R.B., CARLOS M.P., MYERS R.A., WHITE, M.G.; BOBOLENOCCI T., APLAN D., BLYTHE D., FELDMAN K.A. (2016) Likely sexual transmission of Zika virus from a man with no symptoms of infection *MMWR Morb Mortal Wkly Rep ePub*: 26 August 2016. <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6534e2>
- BUSTOS-ARRIAGA J., GARCIA-MACHORRO J., LEON-JUAREZ M., GARCIA-CORDERO J., SANTOS-ARGUMEDO L., FLORES-ROMO L., MÉNDEZ-CRUZ A.R., JUÁREZ-DELGADO F.J., CEDILLO-BARRÓN L. (2011) Activation of the innate immune response against DENV in normal non-transformed human fibroblasts *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1420. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001420>
- CABRAL-CASTRO M.J., CAVALCANTI M.G., PERALTA R.H., PERALTA J.M. (2016) Molecular and serological techniques to detect co-circulation of DENV, ZIKV and CHIKV in suspected dengue-like syndrome patients *J Clin Virol* 82: 108-111.
- CALVO E.P., SÁNCHEZ-QUETEA F., DURÁN A., SANDOVAL I., CASTELLANOS J.E. (2016) Easy and inexpensive molecular detection of dengue, chikungunya and zika viruses in febrile patients *Acta Tropica* 163: 32-37.
- CAMPOS G.S., BANDEIRA A.C., SARDI S.I. (2015) Zika virus outbreak, Bahia, Brazil *Emerg Infect Dis* 21: 1885-1886.
- CAO-LORMEAU V.M., BLAKE A., MONS S., LASTÈRE S., ROCHE C., VANHOMWEGEN J., DUB T., BAUDOIN L., TEISSIER A., LARRE P., VIAL A. L., DECAM C., CHOMET V., HALSTEAD S. K., WILLISON H.J., MUSSET L., MANUGUERRA J.C., DESPRES P., FOURNIER E., MALLET H.P., MUSSO D., FONTANET A., NEIL J., GHAWCHÉ F. (2016) Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study *The Lancet* 2016, 387: 1531–1539 DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00562-6
- CHEN J.C., WANG J., HUANG H., WEITZ S., WANG A., QIU X., BAUMEISTER M., UZGIRIS A. (2016) Infection of human uterine fibroblasts by Zika virus in vitro: Implications for viral transmission in women *Int J Infect Dis* 51: 139-140.
- COELHO F.C., DUROVNI B., SARACENI V., LEMOS C., TORRES CODEÇO C., CAMARGO S., CARVALHO L.M., BASTOS L., ARDUINI D., VILLELA D., ARMSTRONG M. (2016) Sexual transmission of Zika evidenced by higher incidence in adult women in Rio de Janeiro, Brazil *Int J Infect Dis* 51: 128-132.
- D'ORTENZIO E., MATHERON S., YAZDANPANAHI Y., DE LAMBALLERIE X., HUBERT B., PIORKOWSKI G., MAQUART M., DESCAMPS D., DAMOND F., YAZDANPANAHI Y., LEPARC-GOFFAR I. (2016) Evidence of sexual transmission of Zika virus *N Engl J Med* 374: 2195-2198.
- DAVIDSON A., SLAVINSKI S., KOMOTO K., RAKEMAN J., WEISS D. (2016) Suspected female-to-male sexual transmission of Zika virus *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65: 716-717.
- DICK G.W., KITCHEN S.F., HADDOW A.J., (1952) Zika virus. I. Isolations and serological 249 specificity *Trans R Soc Trop Med Hyg* 46: 509-520.
- DOS SANTOS T., RODRIGUEZ A., ALMIRON M., SANHUEZA A., RAMON P., DE OLIVEIRA W.K., COELHO G.E., BADARÓ R., CORTEZ J., OSPINA M., PIMENTEL R., MASIS R., HERNANDEZ F., LARA B., MONTOYA R., JUBITHANA B., MELCHOR A., ALVAREZ A., ALDIGHIERI S., DYE C., ESPINAL M.A. (2016) Zika virus and the Guillain-Barré Syndrome - case series from seven countries *N Engl J Med* 375 (16): 1598-1601.
- FOY B.D., KOBYLINSKI K.C., CHILSON FOY J.L., BLITVICH B.J., TRAVASSOS DA ROSA A., HADDOW A.D., LANCIOTTI R.S., TESH R.B. (2011) Probable nonvector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA *Emerg Infect Dis* 17: 880-882.
- FRÉOUR T., MIRALLIE S., HUBERT B., SPLINGART C., BARRIERE P., MAQUART M., LEPARC-GOFFART I. (2016) Sexual transmission of Zika virus in an entirely asymptomatic couple returning from a Zika epidemic area, France *Euro Surveill* 21(23), pii=30254
- GULLAND A. (2016) Zika virus is a global public health emergency, declares WHO *BMJ* 352: i657.
- HILLS S.L., RUSSELL K., HENNESSEY M., WILLIAMS C., OSTER A.M., FISCHER M., MEAD P. (2016) Transmission of Zika virus through sexual contact with travelers to areas of ongoing transmission - continental United States, 2016 *MMWR* 65: 215-216.
- HONEIN M.A., DAWSON A.L., PETERSEN E.E., JONES AM, LEE EH, YAZDY MM, AHMAD N, MACDONALD J, EVERT N, BINGHAM A, ELLINGTON SR, SHAPIRO-MENDOZA CK, ODUYEBO T, FINE AD, BROWN CM, SOMMER JN, GUPTA J, CAVICCHIA P, SLAVINSKI S, WHITE JL, OWEN SM, PETERSEN LR, BOYLE C, MEANEY-DELMAN D, JAMIESON DJ. US ZIKA PREGNANCY REGISTRY COLLABORATION. (2017) Birth defects among fetuses and infants of us women with evidence of possible Zika virus infection during pregnancy *JAMA* 317: 59-68.

- HUITS R.M.H.G., DE SMET B., ARIEN K.K., VAN ESBROECK M., DE JONG B.C., BOTTIEAU E., CNOPS L. Kinetics of Zika virus persistence in semen *Bull World Health Organ* 320 E-pub:06 Jul 2016, <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.16.181370>
- KHAN S., WOODRUFF E.M., TRAPECAR M., FONTAINE K.A., EZAKI A., BORBET T.C., OTT M., SANJABI S. (2016) Dampened antiviral immunity to intravaginal exposure to RNA viral pathogens allows enhanced viral replication *J Exp Med* 212;213: 2913-2929.
- KRAEMER M.U., SINKA M.E., DUDA K.A., MYLNE A.Q., SHEARER F.M., BARKER C.M., MOORE C.G., CARVALHO R.G., COELHO G.E., VAN BORTEL W., HENDRICKX G., SCHAFFNER F., ELYAZAR I.R., TENG H.J., BRADY O.J., MESSINA J.P., PIGOTT D.M., SCOTT T.W., SMITH D.L., WINT G.R., GOLDING N., HAY S.I. (2016) The global distribution of thearbovirus vectors *Aedes* *aegypti* and *Ae. Albopictus* *Elife* 2015 (4): e08347.
- LAZEAR H.M., DIAMOND M.S. (2016) Zika virus: New clinical syndromes and its emergence in the western hemisphere *J Virol* 90: 4864-4875.
- MUSSO D., NHAN T., ROBIN E., ROCHE C., BIERLAIRE D., ZISOU K., SHAN YAN A., CAO-LORMEAU V.M., BROULT J. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia. November 2013 to February 2014. *Euro Surveill* 2014, 19: 20761.
- MUSSO D., ROCHE C., ROBIN E., NHAN T., TEISSIER A., CAO-LORMEAU V.M. (2015) Potential sexual transmission of Zika virus *Emerg Infect Dis* 21: 359-361. Erratum in: *Emerg Infect Dis* 2015, 21: 552.
- NICASTRI E., CASTILLETI C., LIUZZI G., IANNETTA M., CAPOBIANCHI M.R., IPPOLITO G. (2016) Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveler returning from Haiti to Italy *Euro Surveill* 21(32).pii=30314.
- NUCKOLS J.T., HUANG Y.J., HIGGS S., MILLER A.L., PYLES R.B., SPRATT H.M., HORNE K.M., VANLANDINGHAM D.L. (2015) Evaluation of simultaneous transmission of Chikungunya virus and Dengue virus type 2 in infected *Aedes* *aegypti* and *Aedes* *albopictus* (Diptera: Culicidae) *J Med Entomol* 52: 447-455.
- PRISANT N., BUJAN L., BENICHO H., HAYOT P.H., PAVILI L., LUREL S., HERRMANN C., JANKY E., JOGUET G (2016) Zika virus in the female genital tract *The Lancet* 16: 1000-1001.
- REUSKEN C., PAS S., GEURTSVANKESSEL C., MOGLING R., VAN KAMPEN J., LANGERAK T., KOOPMANS M., VAN DER EIJK A., VAN GORP E. (2016) Longitudinal follow-up of Zika virus RNA in semen of a traveller returning from Barbados to the Netherlands with Zika virus disease *Euro Surveill* 21(23).pii=30251.
- ROA M. (2016) Zika virus outbreak: reproductive health and rights in Latin America *The Lancet* 387 (10021): 843.
- ROSSI S.L., TESH R.B., AZAR S.R., MURUATO A.E., HANLEY K.A., AUGUSTE A.J., LANGSJOEN R.M., PAESSLER S., VASILAKIS N., WEAVER S.C. (2016) Characterization of a novel murine model to study Zika virus *Am J Trop Med Hyg* 94: 1362-1369.
- STAPLES J.E., DZIUBAN E., FISCHER M., CRAGAN J.D., RASMUSSEN S.A., CANNON M.J., FREY M.T., RENQUIST C.M., LANCIOTTI R.S., MUÑOZ J.L., POWERS A.M., HONNEIN M.A., MOORE C.A. (2016) Interim Guidelines for the evaluation and testing of infants with possible congenital Zika virus infection - United States, 2016 *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65: 63-67.
- TORRES J.R., MARTINEZ N., MOROS Z. (2016) Microhematospermia in acute Zika virus infection *Int J Infect Dis* 51: 127-128.
- WAGGONER J.J., PINSKY B.A. (2016) Zika virus: diagnostics for an emerging pandemic threat *J Clin Microbiol* 54: 860-867.
- ZAMBRANO H., WAGGONER J.J., ALMEIDA C., RIVERA L., BENJAMIN J.Q., PINSKY B.A. (2016) Zika virus and Chikungunya virus coinfections: A Series of three cases from a single center in Ecuador *Am J Trop Med Hyg* 95:894-896.

Alteración histológica y del perfil proteico en la cardiotoxicidad crónica inducida por adriamicina en ratas Sprague Dawley

Rosa Maita¹,
Mirian Strauss¹,
María De Los Angeles Narváez²,
Tomás Hermoso²

¹Universidad Central de Venezuela,
Instituto de Medicina Tropical, Secc.
Biología Celular.
rcmpbiol@gmail.com

¹Universidad Central de Venezuela,
Instituto de Medicina Tropical, Secc.
Biología Celular.
mstraussve@gmail.com

²Universidad Central de Venezuela,
Instituto de Medicina Tropical,
Secc. Bioquímica de Parásitos.
tomas.hermoso@gmail.com

²Universidad Central de Venezuela,
Instituto de Medicina Tropical,
Secc. Bioquímica de Parásitos.
mansns@hotmail.com

RESUMEN

La cardiotoxicidad crónica por adriamicina, constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, asociada a la administración de este agente antineoplásico, especialmente en niños sobrevivientes al cáncer. A fin de evaluar el efecto que sobre el desarrollo ejerce la adriamicina, en este trabajo, se estudia las alteraciones histológicas y del perfil proteico de la cardiotoxicidad crónica inducida por adriamicina, administrada a ratas al final del período de lactancia. Ratas macho Sprague-Dawley, fueron distribuidas al azar (n=6) en grupos control (CON) y adriamicina (ADR). La adriamicina fue administrada (6 mg/kg p.c.) en tres subdosis (2 mg/kg p.c./u en NaCl a 0,9%, 0.1mLi.v.). Al grupo CON se le administró solución fisiológica (NaCl 0,9%, i.v. 0,1 mL). Ambos, cada tres días. A las seis semanas post-tratamiento, las ratas fueron sacrificadas. La pared ventricular izquierda, fue procesada para análisis histológico y electroforesis en dos dimensiones (EF-2D). Los resultados mostraron una respuesta diferencial entre el grupo ADR, respecto al grupo CON. A nivel histológico, en el grupo ADR, se evidenció un incremento del tejido fibroso. En el perfil proteico del grupo ADR, se observó una variación en la cantidad y abundancia relativa de los puntos proteicos. La presencia de tejido fibroso en el grupo ADR, es un indicio de daño cardíaco inducido por adriamicina. Esto es consistente con la alteración en el perfil proteico del grupo ADR, en el que se evidencia la inhibición total o parcial de algunas proteínas, así como la sobre expresión de otras. La adriamicina genera fibrosis y altera el perfil de expresión de proteínas del miocardio a las seis semanas post-tratamiento.

Palabras Clave: adriamicina; cardiotoxicidad crónica; perfil proteico; pared ventricular izquierda; fibrosis cardíaca

HISTOLOGICAL AND THE PROTEIN PROFILE ALTERATION IN CHRONIC CARDIOTOXICITY INDUCED BY ADRIAMYCIN IN RATS SPRAGUE DAWLEY

ABSTRACT

Chronic cardiotoxicity induced by adriamycin, is one of the main causes of morbidity and mortality, associated with the administration of this anti-neoplastic agent, especially in children surviving cancer. In order to evaluate the effect of adriamycin on development, in this work, the histological and protein profile alterations of the chronic cardiotoxicity induced by adriamycin, administered to rats at the end of the lactation period. Male Sprague-Dawley

rats (62g p.c.), were randomly distributed (n=6) in control (CON) and adriamycin (ADR) groups. Adriamycin was administered (6 mg / kg p.c.) in three sub-doses (2 mg / kg p.c. each in 0.9% NaCl, 0.1 mL i.v.). The CON group was administered physiological solution (NaCl 0.9%, i.v. 0.1 mL). Both, every three days. At six weeks post-treatment, the rats were sacrificed. Left ventricular wall was processed for histological and electrophoresis in two dimensions (EF-2D) analysis. Differential response between the ADR and CON groups, were evidenced. Histologically, an increase in fibrous tissue in the ADR group, was observed. In protein profile of the ADR group, a variation in the amount and relative abundance of the protein points, was observed. Fibrous tissue in the ADR group seems to be a consequence of the damage induced by adriamycin. This is consistent with the alteration in the protein profile of the ADR group, in which the total or partial inhibition of some proteins is evidenced, as well as the overexpression of others. Adriamycin generates fibrosis and alters the expression proteins profile of myocardial at six weeks post-treatment.

Keywords: adriamycin; chronic cardiotoxicity; protein profile; left ventricular wall; cardiac fibrosis.

INTRODUCCIÓN

La adriamicina se encuentra entre los primeros antibióticos de la familia de las antraciclina empleados con propósitos clínicos en la quimioterapia del cáncer (Octavia et al. col., 2012; Torres et al. 2012). Esta posee el mayor espectro de acción efectiva en el tratamiento quimioterapéutico de enfermedades neoplásicas (Octavia et al. 2012; Torres et al. 2012). No obstante, la administración crónica de la adriamicina ha estado asociada con el desarrollo de una cardiotoxicidad dosis-dependiente e irreversible, que ha limitado su empleo (Rochette et al. 2015). Esta cardiotoxicidad, constituye una de las principales causas de la morbilidad y la mortalidad asociada a la administración de este agente quimioterapéutico (Pasca et al. 2000; Torres et al. 2012), siendo la población infantil la más afectada ya que pueden padecer esta enfermedad, varios meses o años después de culminada la terapia con adriamicina (Trachtenberget al. 2011). En pacientes pediátricos, este tipo de cardiomiopatía ha estado vinculada con alteraciones en el grosor de la pared ventricular izquierda, la contractibilidad y el crecimiento miocárdico, las cuales se expresan después 6 a 7 años de culminado el tratamiento anti-neoplásico con adriamicina (Lipshultz et al. 2010) y en algunos casos después de los 15 años (Hershman et

al. 2008). El carácter irremplazable de las adriamicina debido a su gran potencialidad antineoplásica, frente a la importancia clínica de la cardiotoxicidad inducida por ella, especialmente en la población infantil, obliga a seguir ampliando y profundizando la investigación vinculada a su mecanismo de acción, a fin de encontrar un balance entre el riesgo de cardiotoxicidad y los beneficios de la eficacia antineoplásica con adriamicina. Más aún, si se considera que la quimioterapia sigue siendo en la actualidad, la solución antineoplásica de un número elevado de individuos. Con el fin de evaluar el efecto que sobre el desarrollo que ejerce la adriamicina, en este trabajo se describen, las alteraciones histológicas y proteicas de la cardiotoxicidad crónica inducida por adriamicina en ratas de la cepa Sprague Dawley, a las seis semanas post-tratamiento con adriamicina. Esta última, administrada, luego de veintiocho días de nacidas, correspondiendo con el final del período de lactancia. De esta forma, a las seis semanas post-tratamiento, que correspondería a 70 días de nacida, las mismas estarían entrando en la etapa de adulto joven (Sepgunta, 2013).

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Leica Biosystems Europa Ltd. (Peterborough, UK): Paraplast®. Riedel de Haën (Seelze, Alemania): Xilol, etanol. Sigma-Aldrich Inc. (Missouri, U.S.A.): Ácido acético. Merck Millipore (Darmstadt, Alemania): Kit de tinción de Masson-Goldner. Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA USA): Acrilamida; Bradford Protein Assay; TRIS base [(tris(hidroximetil)amino)metano]; persulfato de amonio (PSA); glicina; agarosa con azul de bromofenol; tris(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP); tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG) 7 cm, pH 5-8; aceite mineral; trozos de papel de filtro (Electrode Wicks); glicerol; iodoacetamida (IOA); Coomassie G-250; urea; anfolitos (Bio-Lyte 3/10 Ampholyte). Promega Corporation (Wisconsin, USA): Dithiothreitol (DTT), dodecil sulfato de sodio (SDS), bis-acrilamida. Merck KGaA (Darmstadt, Germany): 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS). Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, U.S.A.): Tetramethylethylenediamine (TEMED);

NaCl, KCL, Na₂HPO₄, KH₂PO₄; albúmina sérica de bovino (BSA); cóctel de inhibidores de proteasa (SigmaFAST[®] Protease Inhibitor Tablet), thiourea, azul de bromofenol, agarosa. Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, U.S.A): estándar de peso molecular (BenchMark Protein Ladder). Riedel de Haën (Seelze, Alemania): metanol, etanol y ácido acético. Thomas Scientific (Swedesboro, NJ, U.S.A.): homogeneizador Potter-Elvehjem.

Animales experimentales

Ratas macho Sprague-Dawley de 21 día de nacidas (~ 62 g, n=6), fueron adquiridas en el bioterio del Instituto de Medicina Experimental, de la Universidad Central de Venezuela (UCV). Fueron mantenidos en el cuarto de manejo y cuidado de animales de la Sección de Biología Celular del Instituto de Medicina Tropical (IMT) de la UCV, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO, 1999). A las ratas se les permitió libre acceso a la dieta estándar con Ratarina de Protinal[®], y agua filtrada *ad libitum*.

Diseño experimental

Luego de la primera semana de adaptación, las ratas fueron distribuidas al azar en dos grupos: CONTROL (CON) y ADRIAMICINA (ADR). Al grupo CON se le administró 0,1 mL de solución salina (0,9% NaCl) por la vena caudal y al grupo ADR se le administró 6 mg/kg p.c. de adriamicina, dividida en tres subdosis de 2 mg/kg p.c. en un volumen estándar de 0,1 ml de solución salina (0,9% NaCl). En ambos grupos, cada tres días. El peso corporal promedio de las ratas fue monitoreado una vez por semana. Los cambios físicos y conductuales, fueron monitoreados diariamente. Luego de 6 semanas post-tratamiento, las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical. El corazón fue colectado y pesado. Se tomaron muestras de la pared ventricular (PVI), para el análisis histológico y obtención de los perfiles proteicos. La longitud corporal, fue obtenida post-mortem.

Análisis histológico

Porciones de la PVI, previamente perfundidas

con amortiguador fosfato salino (PBS: phosphate-buffered saline, NaCl, KCL, Na₂HPO₄, KH₂PO₄) a pH 7.4; fueron deshidratadas en una batería de etanol (50 % y 80% por 45 min., 90% y 100% dos cambios por 1 h) y aclaradas con Xilol al 100 % (2 x 1h y 1 ½ h, respectivamente); para su posterior inclusión en bloques de parafina sintética (Paraplast[®]). Para realizar la caracterización histológica de la PVI, se realizaron cortes de 4 micras de las muestras incluidas, con el microtomo de rotación (Reichert-Jung: Heidelberg, Germany); y se procedió a colorearlas con el método de Tricrómico de Manson (Blandeiner et al., 2004) de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial del Kit de tinción de Masson-Goldner. Los registros digitales de las imágenes se realizaron en un microscopio invertido Microscopio invertido IX71 (Olympus Corporation: Pensilvania, U.S.A.) mediante el programa SoftImagingSystemCell software v.8.

Lisis celular y determinación de la concentración de proteínas

Las muestras de la PVI fueron perfundidas (30 mM NaCl; 4 mM KCL; 2,5 mM MgCl₂; Glucosa 18 mM, Tris 4mM), congeladas con N₂ líquido para pulverizarla y homogeneizadas con 400 µL de amortiguador de lisis (Urea 9,5 M; CHAPS 2%; DTT 1%, anfolitos 0,8%) en presencia de inhibidores de proteasas. El homogenato fue centrifugado a 16.000 g por 10 minutos (4 °C) para remover grandes fracciones celulares. El sobrenadante fue centrifugado 21.000 g por 25 minutos (4 °C). El segundo sobrenadante fue almacenado a -70°C. La determinación de la concentración de las proteínas se empleó un ensayo modificado del método de Bradford (Bradford, 1976; Thongboonkerdet al. 2006). Las densidades ópticas se determinaron en el Spectrophotometer Sunrise empleando el programa Magellan Software v 6.6 (TECAN Austria GmbH: Salzburg, Austria).

Electroforesis en dos dimensiones (E-2D)

Las tiras de IPG (7 cm, pH continuo de 5-8), fueron hidratadas, con 150 µg de proteínas previamente solubilizadas en un amortiguador de hidratación (Urea

8 M; Tiourea 2 M; CHAPS 4%; DTT 2 mM, anfolitos 0,2% y azul de bromofenol), en un volumen de 130 μ L. Luego de 15 minutos de hidratación pasiva (0V a 25 °C), se procedió a realizar una hidratación activa por 12 h (50V a 20°C) en el Protean IEF CellSystem (BIO-RAD Laboratories, Inc. (Hercules, CA USA). El isoelectroenfoco (IEF) se realizó por triplicado para cada una de la muestras, a 50 μ A por tira de IPG y una temperatura de 20 °C. El IEF Las condiciones del IEF fueron 250V por 0,5 h (lineal), 500 V por 1 h (lineal), 1000 V por 1 h (lineal), 4000 V por 1 h (lineal), 4000 V por 10.000 V: h (rápido), 500 V por 10 h (rápido). Lo anterior a 20 °C. Luego de la primera dimensión, las proteínas en las tiras de IPG fueron equilibradas con 5 mM del agente reductor, DTT; y posteriormente alquiladas con 2,5 % de IOA, empleando un amortiguador de equilibrio base (6M de Urea, 2% de SDS, 20% de Glicerol y 375 mM de Tris a pH 8.8) durante 15 minutos a 25°C. Finalmente, la separación de las proteínas en la segunda dimensión se realizó por SDS-PAGE (Laemmli, 1970), empleando geles de poliacrilamida al 12,5 % y 1,5 mm de grosor, 3° mA por gel a 25°C. Para ello se lavaron las tiras de IPG en un amortiguador de (Tris-Base 33 mM, glicina 256 mM a pH 8.3, SDS al 0.1%) y se fijaron sobre el gel de poliacrilamida con agarosa fundida al 0,5 % con trazas de azul de bromofenol. Luego de lavar los geles con agua Milli-Q por 10 minutos, las proteínas fueron fijadas (25% alcohol isopropílico, 10% ácido acético) por 15 minutos y coloreadas con Blue Silver (11, 76 % ácido fosfórico, 10% sulfato de amonio, 20 % metanol, 0,12 % de Coomassie G-250), un colorante que detecta de 5 a 10 ng de proteínas (*Candianoet* al.2004). Luego de 24 h, se procedió a decolorar en agua Milli-Q hasta alcanzar el contraste deseado, y se almacenaron en una solución al 1% de ácido acético.

Registro y análisis de los geles

Los geles fueron registrados y editados en el Molecular Imager® GS-800™ CalibratedDensitometer empleando el programa QuantityOne® 1D Analysis Software (Bio-Rad Laboratories, Inc.: Hercules, CA USA). El análisis de las imágenes fue realizado con el

programa PDQuest™Advanced 2-D Analysis Software (Bio-Rad Laboratories, Inc.: Hercules, CA USA). La densidad óptica (DO: el área de punto proteico multiplicado por la densidad del pixel) de los puntos proteicos (p.p.), será referida en el texto como abundancia relativa. La DO de cada p.p., fue normalizada con la densidad total del gel, a fin de garantizar que las variaciones en el tamaño y la intensidad de cada punto proteico entre los geles, se debiera únicamente al tratamiento y no por error experimental. Luego se evaluó la presencia, ausencia y variaciones diferenciales en la DO entre los p.p. del grupo ADR y el grupo CON.

Análisis estadístico

Las diferencias entre el peso y longitud corporal; y peso del corazón, del grupo ADR respecto al grupo CON, fueron evaluadas estadísticamente, mediante una prueba de t-Students, previa verificación del cumplimiento de los supuestos de homogeneidad de varianza, independencia de las muestras y normalidad de la población experimental (Daniel, 2002), con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0.05$).

Las diferencias estadísticamente significativas en las abundancias relativas de los puntos proteicos entre el grupo ADR y el grupo CON, fueron identificadas automáticamente por el programa PDQuest™Advanced 2-D Analysis Software, mediante la prueba *t-Student*, con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0.05$). De estas últimas, solo se consideraron en este estudio, aquellos puntos proteicos cuya abundancia relativa en el grupo ADR, presentara una variación de $\pm 1,5$ veces respecto al grupo CON. Aquellos puntos proteicos en el grupo ADR con una diferencia en su abundancia relativa superior a 1,5 veces la observada en el grupo CON y estadísticamente significativos, fueron considerados como sobreexpresión o disminución de la expresión de esas proteínas. El término de sobreexpresión se refiere en este trabajo, a un incremento en la cantidad de proteínas sobre el gel e implica tanto la síntesis de proteínas, como la presencia de fragmentos derivados de proteínas existentes por procesos proteolíticos. De ser menor a 1,5 veces, se considera inhibición de su expresión.

BIOÉTICA

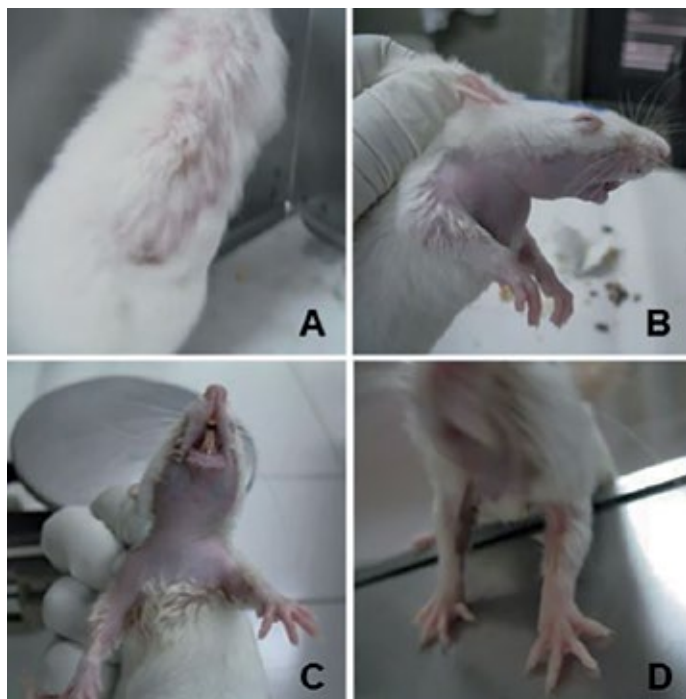
Esta investigación se realizó cumpliendo con las normas establecidas en la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 en cuanto a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y por la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio publicada por el Institute of Laboratory Animal Resources de Estados Unidos de América. De igual forma cuenta con el aval del Comité de Bioética del Instituto de Medicina en el marco del proyecto Individual del CDCH PI-09-8187-2011-I.

RESULTADOS

Parámetros morfológicos

La caracterización del modelo animal contempló una descripción de los cambios morfológicos externos que abarcó signos físicos, peso promedio corporal y longitud promedio corporal.

Figura 1

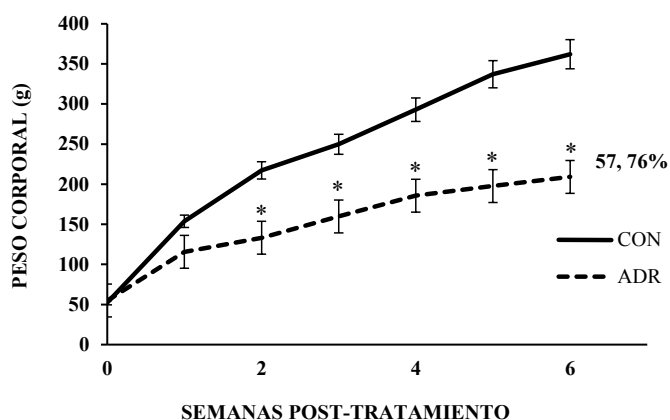


Signos físicos generales presentados por las ratas SpragueDawley en el grupo experimental ADR, a las dos y tres semanas post-tratamiento. A: Alopecia parcial en lomo superior y lateral. B-C: Alopecia total en mandíbula inferior. D: Alopecia total en abdomen inferior. ADR: adriamicina: 6 mg/Kg p.c.

Las ratas pertenecientes al grupo CON, no presentaron alteraciones en sus características morfológicas distintas a lo descrito para cada una de las etapas de crecimiento durante las seis semanas post-tratamiento. A diferencia de estas, las ratas pertenecientes al grupo ADR, presentaron alteraciones no solo en sus características morfológicas, sino conductuales.

En la segunda y tercera semana post-tratamiento, el 100% de los individuos del grupo ADR, presentó algún signo de alopecia. En el 67 % de los individuos, esta alopecia fue parcial, apenas evidente en áreas como el lomo, laterales del cuerpo y mandíbula inferior (A). En los individuos restantes, la alopecia fue total en mandíbula inferior, abarcando pecho hasta el interior de los miembros anteriores (B y C); y en abdomen, abarcando el interior de los miembros posteriores (D). Adicionalmente a la alopecia, también se observó parpados adheridos productos de la resequeidad lacrimal en aproximadamente el 16 % de los individuos; y pérdida de uno o de los dos incisivos inferiores en el 33% de los individuos del grupo ADR, luego de una inflamación sostenida en sus encías. Estos signos fueron gradualmente desapareciendo desde mediados de la tercera semana post-tratamiento hasta inicios de la quinta.

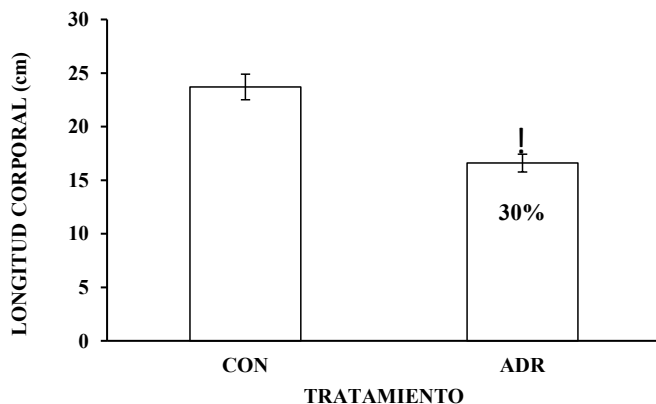
Gráfico 1



Peso corporal promedio de las ratas SpragueDawley en función de las seis semanas post-tratamiento. Se observa una disminución estadísticamente significativa en la ganancia de peso corporal del grupo ADR, respecto al del grupo CON, de 57,76% a las seis semanas. CON: control; ADR: adriamicina (6 mg/kg p.c.). Los valores están expresados como la media \pm DE p.c. de tres experimentos independientes con dos réplicas cada uno. La significancia estadística de las diferencias fue establecida por la prueba t-Students (*). Un valor $P < 0,05$ se consideró como estadísticamente significativo.

El peso corporal promedio de las ratas SpragueDawley de todos los grupos experimentales en la semana cero fue de 60 ± 3 gramos. Una vez iniciado el tratamiento, se observó un incremento diferencial y progresivo en el promedio de la ganancia de peso corporal de ambos grupos experimentales hasta la cuarta semana. El grupo CON, presentó un promedio de ganancia de peso corporal significativamente mayor respecto al grupo ADR, a partir de la segunda semana. A la sexta semana, el grupo ADR presentó una disminución en su promedio de ganancia de peso corporal del 57, 76 %, respecto al grupo CON.

Gráfico 2

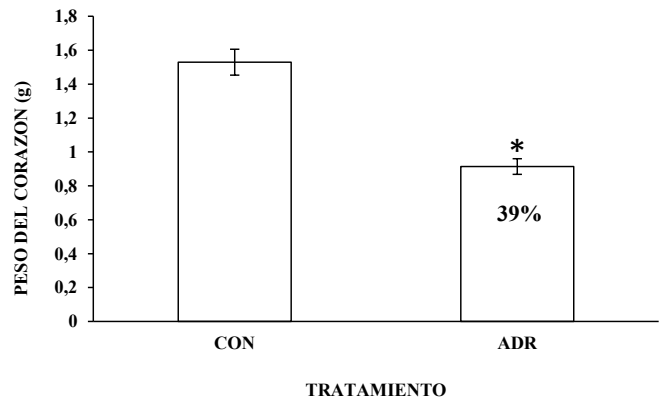


Longitud corporal promedio de las ratas SpragueDawley a las seis semanas post-tratamiento (Extremo distal de cabeza a base de cola). Se observa el porcentaje de disminución de la longitud corporal en ADR (30%), respecto al grupo CON. CON: control; ADR: adriamicina (6 mg/kg p.c.). Los valores están expresados como la media \pm DE de tres experimentos independientes con dos réplicas cada uno. La significancia estadística fue establecida por la prueba t-Students. Un valor $p < 0,05$ se consideró como estadísticamente significativo.

A las seis semanas post-tratamiento, el grupo ADR presentó una longitud corporal promedio significativamente menor que la del grupo CON, la cual fue de un 30%.

Peso promedio cardíaco

Gráfico 3



Peso promedio del corazón de ratas SpragueDawley a las seis semanas post-tratamiento. Se observa el porcentaje de disminución del peso promedio del corazón del grupo ADR (39%) respecto al grupo CON. CON: control; ADR: adriamicina (6 mg/Kg p.c.). Los valores están expresados como la media \pm DE de tres experimentos independientes con dos réplicas cada uno. La significancia estadística fue establecida por la prueba t-Students. Un valor $p < 0,05$ se consideró como estadísticamente significativo.

A las seis semanas post-tratamiento, el peso promedio del corazón del grupo ADR, fue significativamente menor que el del grupo CON. El grupo ADR presentó una disminución de peso promedio del corazón de 39%, respecto al grupo CON.

Histología de pared ventricular izquierda

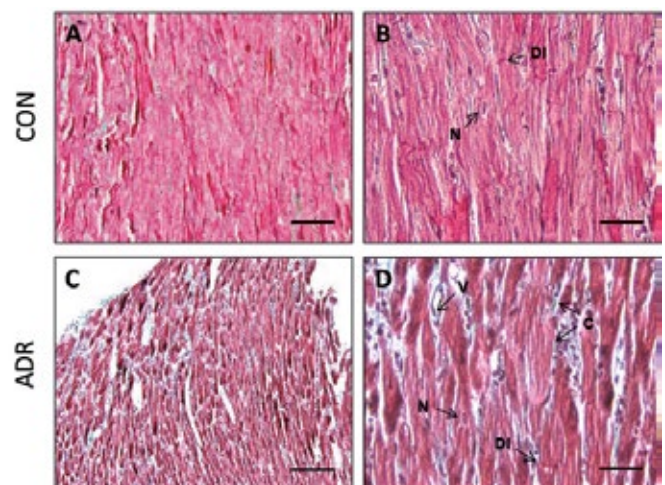


Figura 2

Micrografías ópticas de la pared ventricular izquierda del corazón de ratas Sprague Dawley a las seis semanas post-tratamiento con adriamicina (6 mg/kg p.c.) CON: A y B, ADR: C y D. N: Núcleo; DI: Disco intercalar; V: Vaso; C: Tejido conectivo. Micrografías A y C: Barra 250 μ m, 10x. Micrografías B y D: Barra 70 μ m, 40X. CON: Control; ADR: adriamicina.

Los cortes histológicos de pared ventricular izquierda fueron coloreados mediante el método de Tricrómico de Manson para diferenciar el tejido conectivo del tejido muscular (Blandenier et al. 2004). Lo anterior con el propósito de visualizar indirectamente la extensión del tejido conectivo y sus posibles alteraciones en los grupos experimentales como resultado del tratamiento. Este método colorea las fibras musculares y el citoplasma, de color rojo, los núcleos de negro, los eritrocitos de anaranjado brillante y el tejido conectivo de color verde. Es una modificación del método de Mallory (Blandenier et al. 2004).

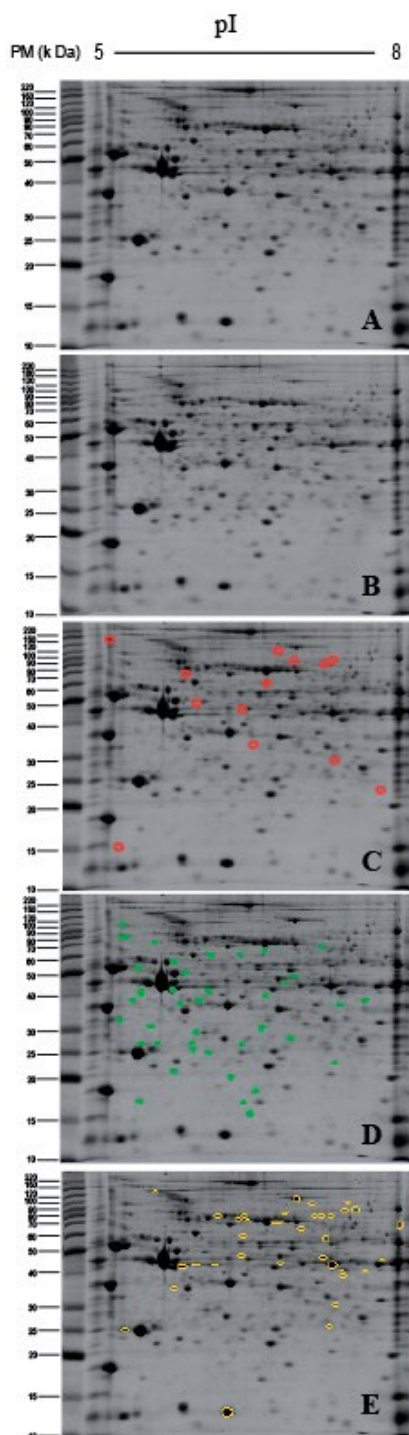
En el grupo CON (A y B), se observó la típica morfología del tejido muscular cardíaco, caracterizado por células alargadas, con uno o dos núcleos centrales ovoides, que forman columnas que se anastomosan irregularmente, revestidas por una fina capa de tejido conjuntivo. En la unión entre dos células se puede distinguir una línea oscura transversal, la cual corresponde a las áreas especializadas para la unión llamadas discos intercalares (B). A diferencia de este, el grupo ADR (C y D) presenta un incremento en el tejido conectivo que rodea las columnas de las células musculares cardíacas. Este tejido conectivo, pareciera estar principalmente conformado por un componente celular, debido a la cantidad de núcleos que se pueden visualizar entre las células musculares cardíacas.

Perfiles proteicos de la pared ventricular izquierda

En la figura 3, se observa el perfil proteico del grupo CON (A) y ADR (B). En el perfil proteico del grupo CON (C), se señalan los puntos proteicos que no pudieron ser evidenciados en el perfil proteico del grupo ADR (B; 13 p.p.). Así mismo, se señalan en el perfil proteico del grupo CON (D y E), los puntos proteicos que presentaron un cambio estadísticamente significativo ($p < 0,05$ t-Students) en su abundancia relativa (DO) de $\pm 1,5$ veces en el perfil proteico del grupo ADR (75 p.p.), respecto a la abundancia de ese mismo punto proteico en el grupo CON. En el perfil D, se observaron aquellos puntos proteicos que incrementaron significativamente su abundancia relativa

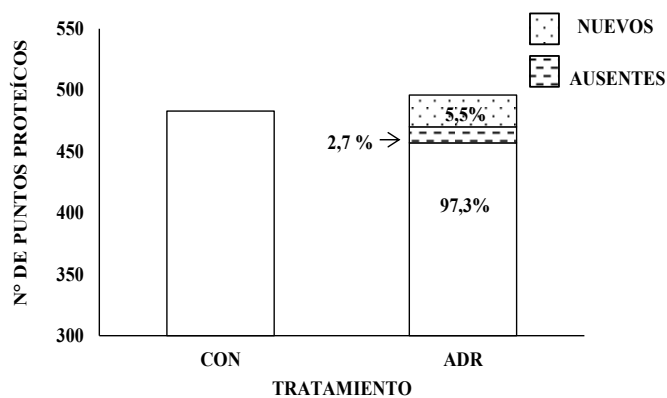
(DO $> 1,5$ veces y $p < 0,05$; D; 40 p.p.) y en E, los que disminuyeron (DO $< 1,5$ veces y $p < 0,05$; E; 35 p.p.).

Figura 3



Perfiles proteicos de la pared ventricular izquierda de corazón de rata SpragueDawley del grupo CON respecto al grupo ADR a las seis semanas post-tratamiento. A: Perfil proteico del grupo CON. B: Perfil proteico del grupo ADR. C: Perfil proteico del grupo CON, señalando en círculo, los puntos proteicos ausentes en el perfil proteico del grupo ADR, a las seis semanas post-tratamiento. D: Perfil proteico del grupo CON, señalando en círculo, los puntos proteicos, que presentaron un incremento en su abundancia relativa (DO $> 1,5$), estadísticamente significativa ($\pm 1,5$ veces; $p < 0,05$ t-Students), en el perfil proteico del grupo ADR respecto al del grupo CON. E: Perfil proteico del grupo CON, señalando en círculo, los puntos proteicos, que presentaron una reducción en su abundancia relativa (DO $< 1,5$), estadísticamente significativa ($\pm 1,5$ veces; $p < 0,05$ t-Students), en el perfil proteico del grupo ADR respecto al del grupo CON. Todas las muestras fueron procesadas por duplicado bajo las mismas condiciones: 150 μ g de proteínas, tiras de pH (IPG) de 5-8 para el isoelectroenfoco y geles de poliacrilamida de 12,5 % en la segunda dimensión. CON: control, ADR: adriamicina (6 mg/Kg p.c.).

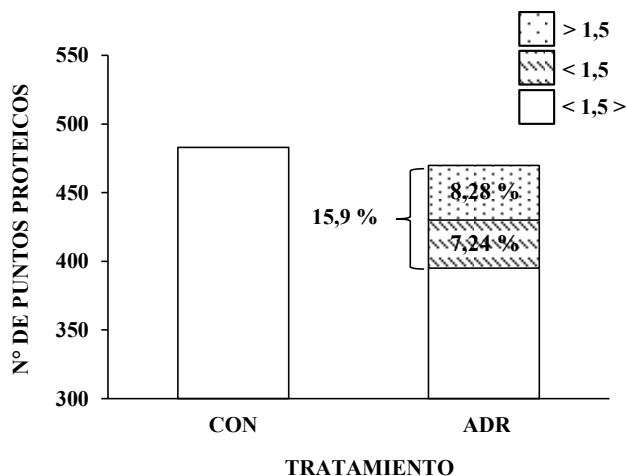
Grafico 4



Puntos proteicos nuevos y ausentes en el perfil proteico de la pared ventricular izquierda de corazón de rata SpragueDawley del grupo ADR, respecto al perfil proteico del grupo CON, a las seis semanas post-tratamiento. Del total de puntos proteicos presentes en el perfil del grupo ADR, 5,5 % (26 p.p.) correspondieron a puntos proteicos nuevos (área punteada). Del total de puntos proteicos presentes en el perfil del grupo CON, 97,3 % (470 p.p.) estuvieron presentes en el perfil del grupo ADR y 2,7% (13 p.p.), ausentes (área en rayas). CON: control, ADR: adriamicina (6 mg/Kg p.c.).

Al comparar los perfiles proteicos de ambos grupos experimentales, se encontró que del total de puntos proteicos presentes en el perfil proteico del grupo ADR, 5,5 % de estos (26 p.p.), no estaban presentes en el perfil proteico del grupo CON. Lo que representaba la presencia de puntos proteicos nuevos. No obstante, del total de puntos proteicos presentes en el grupo CON, un 97,3 de estos estuvieron presentes en el perfil del grupo ADR, lo que representaba la ausencia de 2,7 % de estos.

Gráfico 5



Puntos proteicos que presentaron una abundancia relativa diferencial, estadísticamente significativa ($\pm 1,5$ veces; $p < 0,05$ t-Students) en el perfil proteico de la pared ventricular izquierda de corazón de rata SpragueDawley del grupo ADR, respecto al perfil del grupo CON, a las seis semanas post-tratamiento. Área punteada: Porcentaje de puntos proteicos que presentaron un incremento en su abundancia relativa ($> 1,5$). Área en rayas: Porcentaje de puntos proteicos que presentaron una reducción en su abundancia relativa ($< 1,5$). Área blanca: Puntos proteicos que no presentaron cambios en su abundancia relativa ($< 1,5 >$). CON: control, ADR: adriamicina (6 mg/Kg p.c.).

Del total de puntos proteicos pertenecientes a los perfiles proteómicos del grupo tratado con adriamicina, que coincidieron con los del perfil del grupo CON, 15,9 % de estos presentaron una abundancia relativa diferencial ($\pm 1,5$ veces; $p < 0,05$ t-Students). De estos, 8,28 %, presentaron un incremento en su abundancia relativa ($> 1,5$); mientras que 7,4 % ($< 1,5$), presentaron una disminución. Esto es un reflejo de la acción que ejerce la adriamicina sobre la expresión de proteínas cardíacas, a las 6 semanas post-tratamiento.

DISCUSIÓN

El cuerpo de resultados presentados en este trabajo, en cuanto a los signos evidenciados en el grupo experimental tratado con adriamicina, respecto al control, se corresponde y son consistentes con lo publicado por Núñez y colaboradores (2006), en relación a los signos característicos asociados al tratamiento quimioterapéutico con miembros de la familia de las antraciclinas, como la adriamicina. Estos incluyeron alopecia (Fig.1), evacuaciones líquidas al inicio del tratamiento, pérdida de los incisivos, además de resequeidad lacrimal. Esto se debe a que las poblaciones celulares más afectadas por la acción de la adriamicina, son aquellas que poseen elevadas tasas de multiplicación celular, como las del folículo piloso, las del tubo digestivo, y las que forman los incisivos en el caso de los roedores. En ellas también se incluyen las células de la médula ósea y las del sistema reproductor (Núñez et al.2006). En el caso de los incisivos, en los roedores crecen continuamente durante toda la vida, a una velocidad de dos a cinco milímetros por semana, dependiendo de la especie. De allí, que al igual que con el folículo piloso, las células

generadoras de los incisivos, también tienen una alta multiplicación celular, que sumado a la carencia de raíces profundas de estos, parecen ser afectadas por la acción citostática de la adriamicina.

Adicionalmente a estos signos, también se observó en uno de los animales del grupo ADR, una inflamación en el miembro posterior denominada clínicamente como eritrodisestesia palmo-plantar (PPE), la cual ha sido descrita como una inflamación parestesia de manos y pies que aparece con la quimioterapia con 5-fluorouracilo, capecitabina, citarabina y adriamicina (Hueso et al.2008). Otros nombres incluyen eritema acral (AE), eritema palmo-plantar, síndrome mano-pie, AE peculiar y reacción de Burgdorf. Los síntomas pueden aparecer en días o meses después de la administración del agente quimioterapéutico y parece depender de la dosis y la velocidad de administración (Hueso et al.2008). Pavey y colaboradores (2015) señalan que en un inicio, el paciente experimenta un hormigueo y/o parestesias de las palmas y plantas que evoluciona en una inflamación dolorosa, simétrica, y bien-delimitada con placas rojizas, la cual sigue con la descamación de la piel como última fase del proceso de resolución de los síntomas. En nuestro caso, la inflamación del miembro posterior se mantuvo hasta las seis semanas, lo cual pareciera ser insuficiente, para que estos síntomas desaparecieran.

La pérdida de la ganancia de peso corporal progresiva, evidenciada durante las seis semanas post-administración de adriamicina (Graf. 1), que en nuestro modelo animal fue de 57,76 %, estuvo acompañada por una reducción del 30% de su longitud corporal (Graf. 2) y de un 39% del peso del corazón (Graf.3). Nuestros resultados exhiben paralelismo con los resultados de Strauss y colaboradores (1998), quien empleando ratas neonatas de la cepa SpragueDawley, observó una disminución en la ganancia de peso corporal y una reducción de la pared ventricular izquierda, a las 6 semanas post-tratamiento con 9 mg/kg p.c. de adriamicina. Estos efectos, pudieran inicialmente estar asociados, además del daño cardíaco, a daños hematológicos y sobre el tracto gastrointestinal, (Nuñez et al., 2006). Lo anterior, en cuanto a la

anemia generada, que inciden sobre su actividad y apetencia; y a la mala absorción de nutrientes, respectivamente. Ambos, afectando el desarrollo normal de nuestro modelo animal. Lo anterior, es una evidencia más de cómo los efectos tóxicos de la adriamicina pueden limitar severamente el desarrollo normal de un niño sobreviviente al cáncer. En este sentido, Lipshultz y Adams (2010) señalan que los sobrevivientes de cáncer infantil a largo plazo tratados con este agente antineoplásico, son 8 veces más susceptibles de morir de enfermedades cardiovasculares respecto a la población general, y 15 veces respecto a sus hermanos. Igualmente señalan que existen un amplio conjunto de evidencias que indican que los efectos tóxicos de adriamicina en el corazón son más frecuentes en personas muy jóvenes, particularmente en niños, donde la adriamicina induce un deterioro miocárdico que puede afectar severamente su crecimiento. Debido a ello, los niños parecieran tener un riesgo mayor para desarrollar toxicidad cardíaca y en consecuencia desarrollar cardiopatías durante la etapa adulta (Trachtenberget al.2011).

Análisis histológico

A nivel histológico, el incremento en el tejido conectivo observado en el grupo ADR, respecto al grupo CON, parece estar vinculado a una remodelación del miocardio que involucra necrosis y/o apoptosis de los cardiomiocitos, proliferación de fibroblastos y alteración no solo de los componentes del miocardio, sino de las mayores proteínas estructurales del espacio extracelular. Este incremento, es característico del tejido enfermo o necrosado, el cual es a la larga, reemplazado por tejido fibroso (Fibroblastos y fibras colágenas), que prolifera más de lo normal (Blandeiner y Montenegro, 2004; Gartner y Hiatt, 2008). En conejos adultos, tratados con adriamicina (2 mg/kg p.c. semanal), Gava y colaboradores (2013), encontraron una significativa reducción en la función sistólica, a las seis semanas, asociadas a distintas alteraciones a nivel histológico y ultraestructural. Tales alteraciones estuvieron vinculadas a necrosis y fibrosis intersticial, vacuolización y granulación

intracitoplasmática. Ivanová y colaboradores (2012), en un modelo de cardiotoxicidad crónica en ratas adultas, encontró que estas alteraciones morfológicas de los cardiomiocitos y de la función cardiaca, estaban vinculadas a un incremento en la actividad de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP: del inglés “matrixmetalloproteinases”), a las 8 semanas post-tratamiento con adriamicina. De igual forma, Polegato y colaboradores (2015), encontró en ratones adultos, que la disfunción cardiaca inducida por adriamicina, estaba relacionada a la activación de la MMP-2. Estas MMP, son responsables de degradar los componentes de la matriz extracelular por lo que tienen una importante función en la remodelación miocárdica, más aún si consideramos que en el corazón, el colágeno es la principal proteína de la matriz extracelular (D’Armiento, 2002). Basado en esto, se puede inferir que las alteraciones histológicas evidenciadas en el tejido cardíaco del grupo tratado con adriamicina, es consecuente con el desarrollo y el establecimiento de la característica cardiotoxicidad asociada a este antineoplásico (Gavaet al.2013), y como ha sido descrito en la insuficiencia cardiaca (Graham et al.2008) o de cualquier otra patología cardíaca (Spinale, 2007). Considerando que nuestro modelo animal pretende reflejar los efectos que sobre el desarrollo ejerce la adriamicina, se puede comprender, como niños sobrevivientes al cáncer, pueden presentar algún grado de cardiomiopatía en la etapa adulta, mucho tiempo después de haber culminado el tratamiento quimioterapéutico.

Análisis de los perfiles proteicos

A nivel de perfil proteico, las alteraciones observadas en el grupo tratado con adriamicina, fueron consistentes, con el efecto que sobre la expresión de proteínas ejerce este agente, como resultado de su acción citostática y citotóxica. La ausencia de puntos proteicos, así como la disminución en su abundancia relativa debida a la administración de adriamicina, pareciera estar asociada a su acción citostática. Lo anterior, debido a su capacidad para intercalarse entre los pares de bases de la cadena de ADN (Vejpongsa

et al. 2014), por lo que los procesos de replicación y de transcripción, se ven perturbados. Múltiples han sido las investigaciones que señalan el efecto que la adriamicina ejerce sobre la expresión de algunos genes (Ito et al.1990; Tokarska-Schlattner y col, 2010). Específicamente sobre la expresión de genes que codifican para músculo cardíaco, Ito y colaboradores (1990), observó que la adriamicina pareciera ejercer un efecto selectivo sobre la inhibición de estas. Empleando sistemas *in vitro* e *in vivo*, ellos observaron que la adriamicina reduce selectiva y significativamente, de un modo dosis-dependiente, la expresión de los genes sarcoméricos, α -actina, troponina I y la cadena ligera 2 de la miosina; así como también, la músculo-específica isoforma M de la enzima creatinina quinasa. Al comparar estos efectos con los generados por la actinomicina D, un inhibidor de la ARN polimerasa ADN-dependiente, no observaron tal reducción selectiva de la expresión de estos genes. A diferencia de estos, la adriamicina no afectó los transcritos de los genes que no eran músculo-específico, como lo son la enzima piruvatoquinasa, la cadena pesada de ferritina y la β -actina. Estos resultados no fueron observados en el músculo esquelético, en ninguno de los dos sistemas experimentales empleados. A nivel transcripcional, la adriamicina disminuye la expresión de phospholipasa C, una enzima crucial para la señalización del fosfoinositol y la homeostasia del calcio (Lienet al.2006). A nivel post-traducciona, las especies reactivas de oxígeno inducidas por adriamicina pueden oxidar los residuos de cisteína susceptibles de la creatinina quinasa mitocondrial, inactivando por ende su principal enzima reguladora de energía (Tokarsha-Schlattner et al.2002).

A través de análisis con microarreglos de ADN, se ha demostrado que la adriamicina puede modular la expresión de proteínas cardíacas relacionadas a la producción de energía y a su metabolismo, regulación de calcio, crecimiento celular, muerte, función citoesquelética, adhesión celular y transducción de señales (Lienet al.2006; Simunek et al.2009). De estas, las proteínas relacionadas a la producción de energía y sus vías metabólicas son de particular

importancia, debido a los grandes aportes de energía que requiere el corazón para su mantenimiento y funcionalidad (Chenet al.2007). Es por ello que la destrucción de las vías metabólicas que normalmente soportan la producción, transferencia y utilización de energía, es uno de los principales factores que contribuyen al deterioro del corazón. Chen y colaboradores (2006) a través de un análisis proteico de un modelo murino adulto de cardiotoxicidad inducida por 20 mg/kg de peso corporal de adriamicina, a las 72 horas, demostró que la fosfato triosa isomerasa, la β -enolasa y la flavoproteína de transporte de electrones ubiquinonaoxidoreductasa (ETF-QO del inglés electron-transfer flavoprotein-ubiquinone-oxidoreductase) quedan carboniladas después del tratamiento agudo con adriamicina. Las enzimas triosa fosfato isomerasa y la β -enolasa participan en la ruta glicolítica; la enzima isomerasa cataliza la interconversión entre gliceraldehído-3-fosfato y la fosfato dihidroxiacetona; y la β -enolasa cataliza la conversión de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato. La ETF-QO es una flavoproteína de transporte de electrones deshidrogenasa, es el tercer punto de entrada a la cadena de transporte de electrones. Es una enzima que acepta electrones de la flavoproteína de transferencia de electrones en la matriz mitocondrial, y utiliza estos electrones para reducir la ubiquinona (Watmough et al. 2010). En mamíferos, esta ruta metabólica es importante en la beta oxidación de ácidos grasos, el catabolismo de aminoácidos y colinas, al aceptar electrones de múltiples acetil-CoA deshidrogenasas (Watmough et al. 2010). Pereira y colaboradores (2016), en el corazón de un modelo murino adulto con cardiomiopatía crónica inducida por adriamicina, encontraron una disminución en la respiración mitocondrial debida a la pérdida de citocromo C y cardiolipina. Lo anterior, trayendo como consecuencia, la incapacidad para responder al aumento de la sobrecarga cardíaca, acelerando por ende, el envejecimiento cardíaco. Es de esperar que la inactivación de todas estas proteínas cardíacas, comprometa la producción de energía y contribuya con el deterioro de la función cardíaca observada en

sobrevivientes al tratamiento quimioterapéutico con adriamicina.

Por otra parte, la presencia de nuevos puntos proteicos, así como el incremento en la abundancia relativa de otros, pudiera estar asociada a la expresión de proteínas vinculadas a los mecanismos de restauración de la homeostasis celular. Entre ellos, las proteínas de estrés o de choque térmico (Hsp del inglés Heat Shock Proteins), las cuales constituyen uno de los sistemas endógenos de protección y restauración de la homeostasis celular, mejor conservado y caracterizado (Coronato et al.1999). La expresión de los genes que codifican para estas proteínas puede ser inducida frente a condiciones de estrés capaz de evocar tal respuesta, tal como el estrés oxidativo generado por la administración de adriamicina (Angsutararuxet al.2015; Asencio-López et al.2017). En este sentido, Kumar y colaboradores (2011), evaluando los perfiles proteicos en un modelo murino adulto de cardiomiopatía crónica por 2, 5 mg/kg de peso corporal de adriamicina, a las ocho semanas post-tratamiento, encontró que las proteínas que presentaron mayores cambios respecto al perfil proteico del grupo control, estuvieron principalmente representadas por proteínas vinculadas en la respuesta al estrés celular. Entre ellas se encuentran chaperonas moleculares, hidrolasas, oxidoreductasas, proteínas citoesqueletales, quinasas transportadores de fosfolípidos, endopeptidasas y coactivador de transcripción. Entre las chaperonas moleculares, la Hsp25, fue una de las proteínas sobreexpresadas. El incremento de la expresión de esta chaperona, si bien ha sido vinculada a procesos de cardioprotección (Strauss et al.1998; Linet al.2015), otros lo vinculan al daño cardíaco por inducción de apoptosis (Dohkeet al.2006; Vedamet al.2010). Otro ejemplo lo constituye, la enzima nuclear Poli(ADP-Ribosa) polimerasa-1 (PARP-1), también conocida como poli(ADP-ribosa) sintetasa y poli (ADP-ribosa) transferasa. PARP-1, es una proteína muy conservada en la escala filogenética, que participa activamente en los procesos de reparación de rupturas del ADN, simples y dobles. PARP-1 se activa principalmente en

respuesta a daños en el ADN inducidos por diferentes agentes genotóxicos como la adriamicina, induciendo necrosis (Shinet al.2017).

En este sentido, los cambios selectivos en la expresión de los genes que ejerce la adriamicina sobre los cardiomiocitos, pudieran explicar las alteraciones en el perfil proteico, histológicas y biométricas, observadas en el grupo tratado con adriamicina. Tales alteraciones, son las que pudieran incidir, directamente o indirectamente, en el desarrollo normal de los niños sobrevivientes al cáncer.

CONCLUSIÓN

Las alteraciones en las características biométricas, asociadas a la administración de la adriamicina, es un reflejo del efecto adverso, que ejerce este antineoplásico en el desarrollo normal de nuestro modelo animal. De igual forma, el incremento en el tejido fibroso asociado a la administración de la adriamicina, es consecuente con el establecimiento de un modelo de cardiotoxicidad, como resultado de procesos de remodelación miocárdica producto de la acción citostática y citotóxica, que ejerce este agente, sobre la expresión de las proteínas cardiacas.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (C.D.C.H., proyecto N° 09-8187-2011) de la Universidad Central de Venezuela y a Proyecto LOCTI-UCV 2010. A Marianela Rodríguez y al Dr. Marco Álvarez por su apoyo en el análisis histológico.

REFERENCIAS

ANGSUTARARUX P, LUANPITPONG S, ISSARAGRISIL S. (2015). *Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity: Overview of the Roles of Oxidative Stress*. *Oxid Med Cell Longev*.1-13.

ASENSIO-LÓPEZ MC, SOLER F, PASCUAL-FIGAL D, FERNÁNDEZ-BELDA F, LAX A., (2017). *Doxorubicin-induced oxidative stress: The protective effect of nicorandil on HL-1 cardiomyocytes*. *PLoSOne*.12(2): 1-21.

BLANDEINER C, MONTENEGRO E., (2004). *Coloraciones del tejido conjuntivo*. En: *Compendio de Coloraciones Histológicas*. 1ª Edición. Ediciones BOD. Banco Universal, Venezuela: Ed. Monfort, C.A. p. 71-85.

BRADFORD M., (1976). *A Rapid and Sensitive Method for the*

Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem*, 1976; 72: 248-54.

CANDIANO G, BRUSCHI M, MUSANTE L, SANTUCCI L, GHIGGERI GM, CARNEMOLLA B, ORECCHIA P, ZARDI L, RIGHETTI PG., (2004). *Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis*. *Electrophoresis*. 25: 1327 - 33.

CHEN Y, DAOSUKHO C, OPII WO, TURNER DM, PIERCE WM, KLEIN JB, VORE M, BUTTERFIELD DA, ST CLAIR DK., (2006). *Redox proteomic identification of oxidized cardiac proteins in Adriamycin-treated mice*. *Free Rad Biol Med*. 41: 1470-77.

CHEN Y, JUNGSUWADEE P, VORE M, BUTTERFIELD DA, ST CLAIR DK. (2007). *Collateral damage in cancer chemotherapy: oxidative stress in nontargeted tissues*. *Mol Interv*. 7: 147-56.

CORONATO S, GIROLAMO WD, SALAS M, SPINELLI O, LAGUENS G. *Biología de las proteínas del shock térmico*. *Medicina* .59: 477-86.

DANIEL WW., (2007). *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud*. 4ta Edición. Editorial Limusa, México, DF. p. 756.

D'ARMIENTO J. (2002). *Matrix metalloproteinase disruption of the extracellular matrix and cardiac dysfunction*. *Trends Cardiovasc Med*. 12(3): 97-101.

DOHKE T, WADA A, ISONO T, FUJII M, YAMAMOTO T, TSUTAMOTO T, HORIE M. *Proteomic analysis reveals significant alternations of cardiac small heat shock protein expression in congestive heart failure*. *J Card Fail*. 12: 77-84.

GARTNER LP, HIATT JL., (2008). *Matriz extracelular*. En: *Texto y Atlas de Histología*. 3ª Edición. McGraw-Hill Interamericana, SA; México. p. 69-83.

GAVA FN, ZACCHÉ E, ORTIZ EM, CHAMPION T, BANDARRA MB, VASCONCELOS RO, BARBOSA JC, CAMACHO AA., (2013). *Doxorubicin induced dilated cardiomyopathy in a rabbit model: an update*. *Res Vet Sci*. 94: 115-21.

GRAHAM HK, HORN M, TRAFFORD AW. (2008). *Extracellular matrix profiles in the progression to heart failure*. *Acta Physiol*. 194: 3-21.

HERSHMAN DL, MCBRIDE RB, EISENBERGER A, TSAI WY, GRANN VR, JACOBSON JS. (2008). *Doxorubicin, cardiac risk factors, and cardiac toxicity in elderly patients with diffuse B-cell non-Hodgkin's lymphoma*. *J Clin Oncol*. 26(19): 3159-65

HUESO L, SANMARTÍN O, NAGORE E, BOTELLA-ESTRADA R, REQUENA C, LLOMBART B, SERRA-GUILLÉN C, ALFARO-RUBIO A, GUILLÉN C. (2008). *Eritema acral inducido por quimioterapia: estudio clínico e histopatológico de 44 casos*. *Actas Dermosifiliogr*. 99:281-90.

ITO H, MILLER SC, BILLINGHAM ME, AKIMOTO H, TORTI SV, WADE R, GAHLMANN R, LYONS G, KEDES L, TORTI FM., (1990). *Doxorubicin selectively inhibits muscle gene expression in cardiac muscle cells in vivo and in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87: 4275-9.

IVANOVÁ M, DOVINOVA J, OKRUHLICOVA KOVA M, VLKOVICOVA J, BARANČIK M. (2012). *Activation of myocardial and circulating* *Pharmacol Sin*. 33: 459-69.

- KUMAR SN, KONOREV EA, AGGARWAL D, KALYANARAMAN BJ. (2011). Analysis of proteome changes in doxorubicin-treated adult rat cardiomyocyte. *Proteomics*. 74: 683-97.
- LAEMMLI UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat*. 227: 680-85.
- LIEN YC, NOEL T, LIU H, STROMBERG AJ, CHEN KC, ST CLAIR DK. (2009). Phospholipase c-delta 1 is a critical target for tumor necrosis factor receptor-mediated protection against Adriamycin-induced cardiac injury. *Cancer Res*. 69: 4329-38.
- LIN AC, LIAO CW, LIN SW, HUANG CY, LIOU CJ, LAI YS., (2015). Canine heat shock protein 27 promotes proliferation, migration, and doxorubicin resistance in the canine cell line DTK-F. *Vet J*. 205(2): 254-62.
- LIPSHULTZ SE, ADAMS MJ. (2010). Cardiotoxicity after childhood cancer: beginning with the end in mind. *J Clin Oncol*. 28(8): 1276-81.
- NUÑEZ IC, ARRIETA EE, LISART FF, SILVA AG, CUTILLAS JM, ARENAS MO, CABRERA EP., (2006). Doxorubicina. En: *Citostáticos: Guía de Utilización*. Sociedad Española de Farmacéuticos de hospitales. 4ª Edición Electrónica. Madrid, España: RAÍZ, TG., S.L. p. 109-116. [Libro en internet] [Acceso 21 de noviembre del 2017]. Disponible en: <http://www.sefh.es/libro/Wyeth/pdf/libro.pdf>.
- OCTAVIA Y, TOCCHETTI CG, GABRIELSON KL, JANSSENS S, CRIJNS HJ, MOENS AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol*. 2012; 52: 1213-25. Review
- PASCA A.J., PEREIRO G., MANSILLA S., LASTRI H., (2000). Toxicidad miocárdica por antraciclinas. *RevFedArgCardiol*. 29: 319-25.
- PAVEY RA, KAMBIL SM, BHAT RM. (2015). Dermatological adverse reactions to cancer chemotherapy. *Indian J DermatolVenereolLeprol*. 81:434. [serial online] 2015 [Acceso 21 de noviembre del 2017]; Disponible en: <http://www.ijdul.com/text.asp?2015/81/4/434/159950>
- PEREIRA GC, PEREIRA SP, TAVARES LC, CARVALHO FS, MAGALHÃES-NOVAIS S, BARBOSA IA, SANTOS MS, BJORK J, MORENO AJ, WALLACE KB, OLIVEIRA PJ., (2016). Cardiac cytochrome c and cardiolipin depletion during anthracycline-induced chronic depression of mitochondrial function. *Mitochondrion*. 30: 95-104.
- POLEGATO BF, MINICUCCI MF, AZEVEDO PS, CARVALHO RF, CHIUSO-MINICUCCI F, PEREIRA EJ, PAIVA SA, ZORNOFF LA, OKOSHI MP, MATSUBARA BB, MATSUBARA LS., (2015). Acute doxorubicin-induced cardiotoxicity is associated with matrix metalloproteinase-2 alterations in rats. *Cell PhysiolBiochem*. 35(5): 1924-33.
- ROCHETTE L, GUENANCIA C, GUDJONCIK A, HACHET O, ZELLER M, COTTIN Y, VERGELY C., (2015). Anthracyclines/trastuzumab: new aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci*. 36(6):326-48.
- SENGUPTA P., (2013). The laboratory rat: Relating its age with human's. *Int J Prev Med*. 4:624-30.
- SHIN HJ, KWON HK, LEE JH, GUI X, ACHEK A, KIM JH, CHOI S. Doxorubicin-induced necrosis is mediated by poly-(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) but is independent of p53. *Sci Rep*. 5:15798.
- SIMÚNEK T, STĚRBA M, POPELOVÁ O, ADAMCOVÁ M, HRDINA R, GERSL V. (2009). Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep.*; 61:154-71.
- SPINALE FG. (2007). Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev*. 87: 1285-342.
- STRAUSS M, ANSELMINI G, HERMOSO T, TEJERO F. (1998). Carnitine promotes heat shock protein synthesis in adriamycin-induced cardiomyopathy in neonatal rat experimental model. *J Mol Cell Cardiol*. 30: 2319-25.
- THONGBOONKERD V, KANLAYA R, SINCHAIKUL S, PARICHATIKANOND P, CHEN ST, MALASIT P., (2006). Proteomic identification of altered proteins in skeletal muscle during chronic potassium depletion: Implications for hypokalemic myopathy. *J Proteome Res*. 5(12): 3326-35.
- TOKARSKA-SCHLATTNER M, LUCCHINETTI E, ZAUGG M, KAY L, GRATIA S, GUZUN R, SAKS V, SCHLATTNER U., (2010). Early effects of doxorubicin in perfused heart: transcriptional profiling reveals inhibition of cellular stress response genes. *Am J PhysiolRegulIntegr Comp Physiol*. 298: R1075-88.
- TOKARSKA-SCHLATTNER M, WALLIMANN T, SCHLATTNER U. (2002). Multiple interference of anthracyclines with mitochondrial creatine kinases: preferential damage of the cardiac isoenzyme and its implications for drug cardiotoxicity. *MolPharmacol*. 61: 516-23.
- TORRES VM, SIMIC VD. (2012). Doxorubicin-Induced Oxidative Injury of Cardiomyocytes – Do We Have Right Strategies for Prevention? In: *Cardiotoxicity of Oncologic Treatments*, Chapt. 5, Ed Prof. Manuela Fiuza. 194pp.
- TRACHTENBERG BH, LANDY DC, FRANCO VI, HENKEL JM, PEARSON EJ, MILLER TL, LIPSHULTZ SE., (2011). Anthracycline-associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *PediatrCardiol*. 32(3):342-53.
- TRACHTENBERG BH, LANDY DC, FRANCO VI, HENKEL JM, PEARSON EJ, MILLER TL, LIPSHULTZ SE., (2011). Anthracycline-associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *PediatrCardiol*. 32: 342-53.
- VEDAM K1, NISHIJIMA Y, DRUHAN LJ, KHAN M, MOLDOVAN NI, ZWEIER JL, ILANGOVAN G. Role of heat shock factor-1 activation in the doxorubicin-induced heart failure in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 298(6): H1832-41.
- VEJPONGSA P, YEH ET. (2014). Topoisomerase 2β: a promising molecular target for primary prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity. *ClinPharmacolTher*. 95: 45-52.
- WATMOUGH NJ1, FRERMAN FE., (2010). The electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductases. *Biochim-BiophysActa*. 1797 (12):1910-6.

Malaria. Eficacia terapéutica de medicamentos contra *plasmodium vivax* y *plasmodium falciparum* Estado Bolívar, Venezuela 2017

Rubén A. Vallenilla¹
José L. Cáceres².

¹ Instituto de Salud Pública
del Estado Bolívar
rubenbikes@hotmail.com

² Universidad de Carabobo.
Departamento de Salud Pública
caceresgarciajl@gmail.com

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la eficacia terapéutica in vivo, de los medicamentos antimaláricos de primera línea, fueron estudiadas 80 personas: 40 diagnosticadas con *Plasmodium vivax*, a quienes se aplicó tratamiento con Cloroquina+Primaquina durante 14 días, y 40 infectadas a *Plasmodium falciparum*, tratadas con Artemeter/Lumefantrina + Primaquina, durante 4 días. 51 pacientes (63,8%) fueron del sexo masculino y 29 pacientes (36,3%) del femenino, de edades entre 11 y 76 años. El mayor grupo etario fue el de 20-29 años (28,8%). Los mineros ocuparon el primer lugar entre los infectados (31,3%). Fue utilizado el "Protocolo genérico para estudios in vivo de eficacia de los medicamentos antimaláricos en las Américas", con seguimiento de 28 días. La respuesta clínica y parasitológica adecuada del grupo fue de 66,3%, siendo 40% para Cloroquina+Primaquina, y 92,5% para Artemeter/Lumefantrina; con 22,5% de fracaso terapéutico precoz, 22,5% de fracaso tardío al tratamiento y 15% de fracaso parasitológico tardío en Cloroquina+Primaquina, y 2,5%, 5%, 0, respectivamente para Artemeter/Lumefantrina. El valor de la respuesta clínica y parasitológica adecuada para *P. falciparum* fue aceptable, mientras que para *P. vivax* hace imperiosa la necesidad de buscar una combinación sustituta, con mayor eficacia, creando y manteniendo un sistema de vigilancia farmacológica para cualquier medicamento en el área de estudio.

Palabras clave: Malaria; Eficacia terapéutica; malaria; medicamentos; *Plasmodium vivax*; *Plasmodium falciparum*.

MALARIA.THERAPEUTIC EFFICACY OF FIRST-LINE MEDICINES AGAINST *PLASMODIUM VIVAX* AND *PLASMODIUM FALCIPARUM* BOLÍVAR STATE, VENEZUELA 2017.

ABSTRACT

In order to evaluate the in vivo therapeutic efficacy of first-line antimalarial drugs, 40 people diagnosed with *Plasmodium vivax* were studied, who were treated with Chloroquine + Primaquine for 14 days and 40 infected with *Plasmodium falciparum*, treated with Artemeter/Lumefantrine + Primaquine, for 4 days. 51 patients (63.8%) were male and 29 patients (36.3%) female, aged between 11 and 76 years. The largest age group was 20-29 years (28.8%). The miners occupy the first place among the infected (31.3%). The "Generic protocol for in vivo studies of efficacy of antimalarial drugs in the Americas" was

used, with a 28-day follow-up. The adequate clinical and parasitological response of the group was 66.3%, being 40% for Chloroquine+Primaquine, and 92.5% for Artemeter/Lumefantrine; with 22.5% of early therapeutic failure, 22.5% of late failure to treatment and 15% of late parasitological failure in Chloroquine + Primaquine, and 2.5%, 5%, 0, respectively, for Artemeter/ Lumefantrine. The value of the adequate clinical and parasitological response for *P. falciparum* was acceptable, while for *P. vivax* it is imperative that a substitute combination be sought, with greater efficacy, maintaining continuous monitoring for any combination in the study area

Keywords: Malaria; Therapeutic efficacy; malaria; drugs; *Plasmodium vivax*; *Plasmodium falciparum*.

INTRODUCCIÓN

Entre las enfermedades parasitarias, el paludismo o malaria es la más importante si se tiene en cuenta el número de individuos que enferman anualmente y el impacto socio-económico que representa (Machado, 2011). En 2016, se estimó una incidencia de 216 millones de casos de paludismo en todo el mundo, la mayoría registrados en África, Asia Sudoriental y el Mediterráneo Oriental. De los 91 países que informaron casos de paludismo autóctono en el año, 15 de ellos, todos en el África Subsahariana, contabilizaron 80% de la carga mundial de paludismo. Se estima que la tasa de incidencia del paludismo disminuyó en 18% a nivel mundial, de 76 a 63 casos por cada un mil habitantes en riesgo, entre 2010 y 2016. A pesar de estas reducciones, entre 2014 y 2016 la tendencia en la incidencia de casos se incrementó sustancialmente en las Américas, y marginalmente en las regiones de Asia Sudoriental, Pacífico Occidental y África (OMS, 2017).

El reto propuesto por la Asamblea Mundial de la Salud dentro del programa “Hacer Retroceder la Malaria” (RBM), era disminuir para el año 2015, hasta 75%, el número de casos de malaria registrados en el año 2000, y reducir las muertes a casi cero. Como resultado, 57 países y territorios redujeron la incidencia de casos de la enfermedad disminuir para el año 2015, hasta 75% (OMS, 2016).

Igualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS), en su “Informe Mundial 2015 sobre el Paludismo”, señaló que 106 países y territorios presentaron transmisión activa de la enfermedad en el año 2000, mientras que a finales de 2015 hubo 95.

También informó que el número de casos se redujo de aproximadamente 262 millones a nivel mundial el año 2000, a 214 millones en 2015, un descenso de 18%. A su vez, las muertes por paludismo disminuyeron en el período, de 839.000 a 438.000, un descenso de 48%, indicando además, que la mayoría de los casos y muertes reportados en 2015 ocurrieron en la Región Africana (88%), seguida por la Región de Asia Sudoriental. Se estimó también, que la incidencia por paludismo que tiene en cuenta el crecimiento demográfico, disminuyó 37% a nivel mundial entre el 2000 y 2015 y la tasa de mortalidad disminuyó 60%, por lo cual se alcanzó la meta “6C” del componente paludismo de los Objetivos del Milenio” (OMS, 2016).

En el caso de Venezuela, el reto a cumplir, era pasar de los 30.234 casos en 2000 a 7.559 casos en 2015 (Cáceres, 2013). Sin embargo, para este último año la incidencia malárica fue de 136.402 casos, lo cual significó un aumento de 451,2% con referencia al año 2000.

Para el año 2016, según el “Boletín” de la Semana Epidemiológica 52, publicado por el Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS), fueron diagnosticados en Venezuela, 240.613 casos, que representaron un aumento de 76,4% respecto al período homólogo del año anterior. La Incidencia Parasitaria Anual (IPA) del país fue 21,7 casos por cada un mil habitantes, el Índice Anual de Exámenes de Sangre (IAES), fue 7,7% y el Índice de Láminas Positivas acumulativo (ILP) fue 28,5%.

Según el origen de infección, correspondieron al estado Bolívar 177.619 casos originados en su territorio, cifra que ubicó al estado por catorceavo año consecutivo en el primer lugar de la incidencia malárica, representando 73,8% de los casos del país y un aumento de 70.766 (66,2%) de la casuística respecto al año 2015. Junto con los estados: Amazonas (10,4%), Sucre (8,7%), Delta Amacuro (3,9%), Monagas (2,1%) y Zulia (0,7%), originaron 99,6% de la incidencia de la enfermedad.

La fórmula parasitaria de los diagnósticos maláricos en el estado fue: 69,1% a *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), 25,8% a *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*),

y 5,1% de infecciones mixtas (*P. vivax* + *P. falciparum*). De sus 11 municipios, 10 municipios del estado Bolívar son de alta incidencia malarica y son productores de la enfermedad, destacándose el municipio Sifontes, el cual aportó en el período, 102.543 casos, que representaron 57,7% de la frecuencia de la malaria en el estado y 42,6% de la incidencia nacional. La parroquia San Isidro del municipio Sifontes, concentró 78.450 casos de la enfermedad, producidos en 264 lugares, en su mayoría campamentos mineros, representando 76,5% de las infecciones del municipio, 44,2% del estado y 32,6% del país.

Como es conocido, la problemática de la incidencia malarica mundial es de origen multicausal, en la que actúan como factores importantes las deficiencias administrativas, logísticas y económicas del programa control, actividades no supervisadas, ausencia de toma de decisiones, análisis situacional inexistente, problemas políticos, la variabilidad del clima, resistencia de los vectores a los insecticidas, problemas de acceso al programa, coberturas diagnósticas deficientes, tratamientos incompletos y resistencia a las drogas antimaláricas.

Entre los últimos factores, un problema que ha aumentado con el tiempo en el programa antimalárico venezolano, es el aparente diagnóstico de casos recidivantes. Durante el año 2016, fueron registrados sólo en el municipio Sifontes, 53.072 recaídas (reaparición de parasitemia asexual en malaria por *Plasmodium vivax* derivada de formas hepáticas persistentes), y 2.758 recrudescencias (reaparición de parasitemia asexual a *Plasmodium falciparum*), para ambas clasificaciones, en los 30 días siguientes a la fecha de culminación del tratamiento inicial.

Es importante mencionar, que esta incidencia denominada por el programa "caso anterior", por considerar que se trata del caso diagnosticado inicialmente a la persona (que no se cura luego de ser tratado), no son sumados en la estadística del municipio, hallándose cifras no publicadas, semejantes a la incidencia o "caso nuevo". Dichos casos podrían tener como causas: inadecuada dosificación del tratamiento (dosificación no acorde con el peso), baja

adherencia al tratamiento (tratamiento no terminado o incompleto), error de diagnóstico (error de especie o infección mixta), o resistencia a los medicamentos administrados o suministrados por el programa de malaria, el objetivo primordial del tratamiento antimalárico consiste en lograr la eliminación rápida y completa del plasmodio de la sangre del paciente, para prevenir que el paludismo no complicado evolucione hacia la enfermedad grave, la defunción o la infección crónica, que produce la anemia relacionada con el paludismo. Desde una perspectiva de Salud Pública, el tratamiento se administra para reducir la transmisión de la infección a otras personas mediante la reducción del reservorio infeccioso y para prevenir el surgimiento y la propagación de la resistencia a los medicamentos antipalúdicos (OMS, 2016).

Desde cuando el *P. falciparum* resistente a la Cloroquina fue reportado por primera vez en Tailandia (1959) y Colombia (1961), la resistencia a las drogas antipalúdicas se volvió uno de los más importantes problemas en el control de la enfermedad en los años recientes. Varias cepas de *P. falciparum* muestran ahora resistencia a todas las drogas antipalúdicas comúnmente usadas, excepto a la Artemisinina y sus derivados (Wilson et al. 2006).

La OMS ha definido la resistencia a los medicamentos antimaláricos, como la capacidad de una cepa parasitaria de sobrevivir y/o multiplicarse a pesar de la administración y absorción de una droga dada a dosis iguales o mayores que aquellas usualmente recomendadas, pero dentro de los límites de tolerancia del sujeto (WHO, 2006), y a fines de los años noventa del siglo pasado, el sistema de vigilancia de RAVREDA-AMI consistió en la evaluación de la eficacia terapéutica de los antimaláricos mediante la aplicación de un protocolo estandarizado, basado en sus recomendaciones, a una muestra de pacientes que acudieran en búsqueda de atención, en los puntos de diagnóstico de malaria del sistema de salud, identificados como sitios centinela (SC) (OPS, 2017).

Aunque una parte de la historia de la malaria corresponde a un extenso capítulo de éxitos y fracasos terapéuticos con diversos medicamentos que fueron

presentados en el momento de su descubrimiento como la solución milagrosa y que pocos años más tarde se vio que no lograron cumplir las expectativas, en la primera década del siglo XXI, la OMS decidió cambiar los lineamientos del tratamiento del paludismo a *Plasmodium falciparum*, mediante la introducción de Combinaciones Terapéuticas con Derivados de la Artemisinina (CTDA), como una estrategia para retrasar la aparición de la resistencia (Sebbag, 2011).

Los tratamientos señalados que combinan dos principios activos con diferentes mecanismos de acción, son los más eficaces en este momento. Actualmente, la OMS recomienda cinco tratamientos combinados basados en la Artemisinina para combatir el paludismo por *Plasmodium falciparum*. La elección de uno u otro deberá realizarse en función de los resultados de los estudios de eficacia terapéutica contra las cepas locales de *P. falciparum*. Cerca de 95% de los países considerados endémicos para malaria por *Plasmodium falciparum*, en 2009, habían adoptado como política nacional la administración de las CTDA (OMS, 2016).

Al presente, las combinaciones basadas en la Artemisinina, constituyen la piedra angular de las pautas terapéuticas recomendadas contra el paludismo por *Plasmodium falciparum* y como tal, es necesario preservar su eficacia. La OMS recomienda a los programas de lucha contra el paludismo, controlar periódicamente la eficacia de los medicamentos antipalúdicos en uso, para comprobar que los tratamientos seleccionados continúen siendo eficaces. En zonas con baja transmisión se añadirá al tratamiento antipalúdico una dosis baja y única de Primaquina, a fin de reducir la transmisión de la infección. No son necesarias pruebas de detección del déficit de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD), dado que las dosis bajas y únicas de Primaquina son eficaces para bloquear la transmisión, pero tienen pocas probabilidades de producir toxicidad grave en pacientes con cualquier variante del déficit de G6PD (OMS, 2016).

En Venezuela, hace más de 10 años el MPPS, teniendo en cuenta que mediante la combinación de antimaláricos con diferentes mecanismos de acción

se puede prevenir o retardar la aparición de resistencia, y con el fin de garantizar altas tasas de curación a través de la adherencia a regímenes con dosis correctas de medicamentos, propuso como política el uso de Cloroquina + Primaquina para el tratamiento de malaria por *Plasmodium vivax* y años más tarde, Artemeter/ Lumefantrina + Primaquina, para *Plasmodium falciparum* en todo el territorio nacional.

Dado el aumento de los casos de malaria, el hecho que los medicamentos no hayan sido evaluados por más de 8 años, y la cantidad de personas que no se curan con el tratamiento de elección, o infecciones maláricas reportadas como "caso anterior", hizo necesario determinar el grado de eficacia de las pautas terapéuticas antimaláricas establecidas por el MPPS, aplicando los instrumentos recomendados por la OMS.

METODOLOGÍA.

Fue realizado un estudio descriptivo de campo, experimental, sobre la eficacia terapéutica de los medicamentos antimaláricos de primera línea: Cloroquina + Primaquina para *Plasmodium vivax*, y Artemeter/Lumefantrina + Primaquina para *Plasmodium falciparum*, en el estado Bolívar, Venezuela.

La población estuvo conformada por pacientes procedentes del municipio Sifontes, quienes acudieron al puesto de diagnóstico CD-36 en Ciudad Bolívar, con sintomatología de malaria entre junio y septiembre de 2017. La muestra fue calculada con base en 45.000 habitantes del área minera del municipio, una IPA de 700/1000, mínimo valor aceptable 60%, nivel de significancia 95%, poder de 80%, para un total de 80 personas, las cuales fueron seleccionadas mediante muestreo no probabilístico (40 por *P. vivax* y 40 por *P. falciparum*).

Como criterios de inclusión, se observaron: pacientes entre 6 meses y 80 años de edad, infección única por *P. falciparum* o *P. vivax*, recuento de parasitemia mayor de 250 y menor de 50.000 formas asexuales/ml, disponibilidad de asistir a los seguimientos durante 28 días y aceptar participar en el estudio mediante la firma de consentimiento informado. Fueron excluidas las embarazadas o mujeres lactando

(se practicó prueba de embarazo a mujeres en edad fértil), pacientes con signos de peligro o de malaria grave, enfermedad crónica subyacente (cardíaca, renal, hepática o malnutrición), y presencia de enfermedad concomitante que requiriese tratamiento adicional con medicamentos de efecto antimalárico.

PROCEDIMIENTOS, TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

La investigación fue concebida según las pautas del “Protocolo genérico para estudios *in vivo* de eficacia de los medicamentos antimaláricos en las Américas”, utilizado por la “Red Amazónica de Vigilancia de la Resistencia a los Antimaláricos (RAVREDA), aportado por la Organización Panamericana de la Salud. (WHO, 1996).

Todo paciente febril que acudió al puesto de diagnóstico en Ciudad Bolívar, se le practicó una gota gruesa. Al paciente con gota gruesa positiva para *P. vivax* o *P. falciparum*, se le comunicaban los objetivos del estudio, en qué consistía y se le invitaba a participar en el mismo. A los que estuvieron de acuerdo en participar, se le solicitó la lectura y posterior firma del formulario de consentimiento informado.

PROCEDIMIENTO DE INGRESO.

Una vez observados los criterios de inclusión y exclusión, y firmado el consentimiento informado se procedió de la siguiente manera:

- Se completó una Ficha Clínica, para cada paciente, que detallaba la información demográfica (nombre, edad, sexo, peso, ocupación, lugar de residencia, lugar de trabajo, parroquia, municipio, antecedentes de malaria) y clínica actual (fiebre, escalofrío, dolor de cabeza, dolor abdominal, dolor de espalda, vómito, diarrea, náuseas, debilidad, inapetencia, cambios en color de la orina, diagnóstico de gota gruesa, fecha, especie parasitaria, número de parásitos asexuados, gametocitos, tratamiento).
- Se midió el peso corporal usando balanza mecánica y la temperatura axilar con termómetro electrónico.
- Se repitió el examen de gota gruesa al sujeto

para verificar la presencia del parásito y se realizó el cálculo de la densidad parasitaria.

- Gota gruesa: las gotas gruesas, teñidas con Giemsa fueron examinadas a una magnificación de 1.000X para identificar las especies de parásito y determinar el nivel de parasitemia. La densidad parasitaria fue calculada contando el número de parásitos asexuados (usando un contador manual), contra 200 leucocitos en la gota gruesa, basándose en que existirían de 6.000 a 8.000 glóbulos blancos por μL de sangre. La densidad parasitaria por microlitro se calculó usando la fórmula: densidad parasitaria/ μL = número de parásitos contados \times 8.000/número de leucocitos contados.

TERAPIA ANTIMALÁRICA.

El medicamento fue obtenido del Programa Antimalárico de la Dirección de Salud Ambiental del MPPS, en el estado Bolívar. Las dosis fueron administradas bajo supervisión del personal de la investigación y se observó al paciente por 30 minutos.

TRATAMIENTO PARA INFECCIONES DE MALARIA NO COMPLICADA.

Infección por *Plasmodium vivax*: combinación de Cloroquina + Primaquina:

Cloroquina: Dosis total: 25 mg base por kg. peso para administrar en tres (3) días.

Primaquina: Dosis total: 3,5 mg base por kg peso, para administrar en catorce (14) días consecutivos, a razón de 0,25 mg /Kg/Peso por 14 días.

Infección por *Plasmodium falciparum* no complicada: Se indica como pauta terapéutica de primera línea para infecciones por *P. falciparum* la combinación de Artemeter/Lumefantrina y Primaquina.

Artemeter/Lumefantrina: Tableta combinada 20mg/120mg. Administración establecida con relación al peso del paciente durante 3 días continuos, cada 12 horas. Contraindicado en menores de 10 kg, embarazadas y lactantes.

Primaquina: Dosis total: 0,75 mg base por kg peso, en dosis única administrada el día cuatro (4) del tratamiento. Contraindicado en menores de 10 kg,

embarazadas y lactantes (MPPS, 2015).

Proceso de seguimiento: a los pacientes que recibieron cualquiera de las dos combinaciones de tratamiento, se les pidió regresar los días: 1, 2, 3, 7, 14, 21 y 28. En su defecto, el paciente fue ubicado en su sitio de residencia.

Seguridad de los pacientes: Para evaluar la tolerabilidad del medicamento, fueron registrados los efectos secundarios reportados por los pacientes de manera espontánea, sin preguntar por ellos específicamente para evitar inducir algún tipo de respuesta.

Pérdida del seguimiento: Se consideró como pérdida, cuando a pesar de esfuerzos razonables del equipo de investigación, un paciente no pudo ser encontrado para su seguimiento. También correspondió a los pacientes que se ausentaron del área de estudio y perdieron una o más de las visitas de seguimiento.

RETIRO DEL ESTUDIO.

El retiro del estudio fue voluntario, cuando el paciente decidía no participar más en el mismo. A continuación se presentan los criterios utilizados como retiro de paciente:

1. Retiro del consentimiento.
2. Falla para completar el tratamiento.
3. Vómito persistente durante el tratamiento.
4. Efectos adversos severos (erupción en la piel o cualquier reacción alérgica severa. No se eliminaron los pacientes con prurito).
5. Ocurrencia durante el seguimiento de una enfermedad concomitante que interferiría con una clara clasificación de la respuesta.
6. Necesidad o recepción de una transfusión sanguínea.
7. Detección de otra especie de malaria durante el seguimiento.
8. Administración de antimaláricos por otra parte o auto-medicación.
9. Falla para atender los controles acordados.
10. Inclusión equivocada del paciente, por fuera de los criterios de inclusión/exclusión.
11. Malaria severa el Día 1.

12. Mala clasificación de un paciente por error de laboratorio (parasitemia) que lleve a la administración de tratamiento de rescate.

VALORACIÓN DEL PROTOCOLO.

La valoración del protocolo ocurre cuando un paciente es removido del estudio por alguna causa que no permite una adecuada interpretación de la respuesta al tratamiento. Por ejemplo cuando ocurre un error en la dosificación del medicamento, cuando se detecta una infección mixta durante el seguimiento o cuando se reporta el uso de otro antimalárico durante el seguimiento.

ANÁLISIS DE DATOS.

Para el manejo y análisis de datos fue utilizado el programa Epi Info. Fue calculado el número y proporción de pacientes con respuesta de (FTP) (Clo+Pri), (FTP) (Art/Lum+Pri), (FCT) (Clo+Pri), (FCT) (Art/Lum+Pri), (FPT) (Clo+Pri), (FPT) (Art/Lum+Pri), y (RCPA) (Clo+Pri) y (RCPA) (Art/Lum+Pri), tal como fue definido.

Fueron evaluados los posibles factores de riesgo para observar su grado de asociación, calculando OR, su intervalo de confianza (IC 95%), además de la significancia estadística ($X^2 \geq 3,84$, valor de $p < 0,05\%$), de las variables (edad, terapia antimalárica anterior, densidad parasitaria inicial, etc.) buscando su asociación con la probabilidad de fracasos terapéuticos y tiempo hasta el fracaso terapéutico.

INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Al terminar el estudio (Día 28), o antes, si los pacientes experimentaron fracaso terapéutico, el personal del estudio les informó verbalmente sobre el resultado de su tratamiento.

CONSIDERACIONES ÉTICAS.

El trabajo de investigación cumplió con las normas establecidas según con la declaración de Helsinki, enmendada en 1983. Se solicitó el consentimiento informado a los pacientes, previa explicación del estudio, catalogándolo como de riesgo mínimo. Los medicamentos administrados forman parte de las pautas terapéuticas utilizados por el Programa anti-

malárico Nacional del MPPS.

La evaluación de resultados se realizó según el Protocolo genérico para estudios *in vivo* de eficacia de los medicamentos antimaláricos en las Américas (OPS 2017), y la evaluación de eficacia, según los resultados clínicos y parasitológicos de la manera siguiente: (Tabla 1).

		Tratamiento	
Diagnóstico Establecido		Cloroquina mas Primaquina (Clo+Pri) para <i>P. vivax</i> .	Artemeter/Lumenfantrina mas Primaquina (Art/Lum+Pri) para <i>P. falciparum</i> .
Fracaso Terapéutico Precoz (FTP).		<ul style="list-style-type: none"> • Desarrollo de signos de peligro o malaria grave los Días 1, 2 ó 3 en presencia de parásitos asexuados. • Densidad parasitaria del Día 2: > densidad parasitaria que el Día 0, sin tener en cuenta la presencia de fiebre. • Densidad parasitaria del Día 3: > 25% de la densidad parasitaria del Día 0. • Presencia de parásitos asexuados el Día 3 con temperatura axilar > 37,5 °C. 	
Fracaso al tratamiento tardío (FTT).	Fracaso Clínico Tardío (FCT).	<ul style="list-style-type: none"> • Desarrollo de signos de peligro o malaria grave el Día 4 o posteriormente con presencia de parasitemia, sin haber reunido previamente los criterios de FTP. • Aparición de parasitemia con una temperatura axilar > 37,5 °C (o historia de fiebre) entre los Días 4 y 14 (o 28, en estudios de 28 días) inclusive, sin haber reunido anteriormente los criterios de FTP. 	
	Fracaso Parasitológico Tardío (FPT).	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia de parasitemia con una temperatura axilar < 37,5 °C. entre los Días 7 y 28 inclusive, sin haber reunido anteriormente los criterios de FTP o FCT. 	
Respuesta Clínica y Parasitológica Adecuada (RCPA).		<ul style="list-style-type: none"> • Ausencia de parasitemia el Día 14, (21 y 28 para las pruebas de 28 días), sin haber reunido previamente los criterios de FTP, FCT o FPT. 	

Tabla 1
Protocolo genérico para estudios *in vivo* de eficacia de los medicamentos antimaláricos.

RESULTADOS

Con el objetivo de evaluar la eficacia terapéutica *in vivo*, de los medicamentos antimaláricos de primera línea en Venezuela, fueron estudiadas 80 personas: 40 diagnosticadas positivas a *Plasmodium vivax*, a las cuales se les aplicó tratamiento con Cloroquina + Primaquina durante 14 días, y 40 infectadas a *Plasmodium falciparum*, a quienes se les administró tratamiento con Artemeter/Lumefantrina + Primaquina, durante 4 días.

Del total de participantes, 51(63,8%) fueron del sexo masculino y 29(36,3%) del femenino. Las edades estuvieron comprendidas entre los 11 y 76 años, con un promedio de 34 años. El grupo etario con mayor número de participantes fue el de 20 a 29 años (28,8%). Entre los 20 y 39 años se concentraron 56,1% de los pacientes (Tabla 2).

Género	n	%
Masculino	51	63,7
Femenino	29	36,3
Total	80	100
Grupo Etario	n	%
10 – 19	9	11,3
20 – 29	23	28,7
30 - 39	22	27,4
40 – 49	13	16,2
50 – 59	11	13,8
60 – 69	1	1,3
70 – 79	1	1,3
Total	80	100

Tabla 2
Género y grupo etario de pacientes.

En las áreas mineras del estado Bolívar se puede encontrar toda clase de ocupaciones entre las personas que allí conviven, y cada una es libre de laborar en lo que esté capacitado o desee desarrollar. De allí, que los infectados presentan diversidad de trabajos u ocupaciones. Los mineros se ubicaron en el primer lugar entre los infectados (31,3%), seguidos de los comerciantes con 25% (Tabla 3).

Ocupación	n	%
Minero	25	31,3
Comerciante	20	25,0
Ama de casa	11	13,7
Estudiante	8	10,0
Obrero	3	3,7
Cocinera	3	3,7
Desempleado	3	3,7
Mecánico	2	2,5
Maestro	2	2,5
Técnico	1	1,3
Cofer	1	1,3
Secretaria	1	1,3
Total	80	100

Tabla 3
Ocupación de los pacientes tratados.

Fue evidente la alta Incidencia entre los pacientes estudiados. Sólo 9(16,1%) de ellos, eran primo-infección. En promedio, los participantes fueron diagnosticados con malaria 2 veces el último año, presentándose pacientes quienes refirieron hasta 20 y 30 episodios de la enfermedad en su vida.

La fiebre, la cefalea y el escalofrío, fueron los signos y síntomas con mayor presencia entre los infectados. Todos presentaron las dos primeras manifestaciones y 95% la tercera (Tabla 4).

Signos y síntomas	n	%
Fiebre	80	100
Cefalea	80	100
Escalofrío	76	95
Debilidad	76	95
Vómito	19	24
Dolor abdominal	16	20
Lumbalgia	16	20
Diarrea	14	18
Inapetencia	13	16
Cambio color orina	11	13
Náusea	10	13
Otro síntoma	8	10

Tabla 4
Signos y síntomas de los pacientes.

El día del diagnóstico inicial de malaria de los pacientes en estudio o día “cero”, se observaron las siguientes características parasitológicas: 52(65%) presentaron parásitos asexuados y 43(53,8%) tenían gametocitos.

El día “uno”, después de recibir la primera dosis del tratamiento, 10 pacientes se encontraron positivos (9 a *P. vivax* y 1 a *P. falciparum*), 50% de ellos con 10 a 50 parásitos asexuados y todos con presencia de gametocitos.

El día “dos”, hubo 8 positivos a *P. vivax*, de los cuales 5(62,5%) presentaban parásitos asexuados, y todos portadores de gametocitos.

El día “tres”, fueron diagnosticados 3 pacientes con infección a *P. vivax*, todos con gametocitos y 2(66,7%) presentaron parásitos asexuados, registran-

do 7 pacientes con Fracaso Terapéutico Precoz (FTP) (Tabla 5).

Para el día “siete” del tratamiento, 6(8,6%) de los pacientes resultaron positivos (5 a *P. vivax* y 1 a *P. falciparum*. 5 presentaron gametocitos y los 6 tenían menos de 10 parásitos asexuados. En total, para el día “siete”, 10 pacientes presentaban FTP (Tabla 5).

El día “catorce”, 4 pacientes estaban positivos a *Plasmodium* (3 a *P. vivax* y 1 a *P. falciparum*), con menos de 10 parásitos asexuados y 3 de ellos con gametocitos. Para este día 11 pacientes presentaban FTP y 5 con Fracaso Tardío al Tratamiento (FTT) (Tabla 5).

Veintiún días después de iniciado el tratamiento, otros 4 pacientes resultaron positivos a *P. vivax*, 2

con menos de 10 parásitos asexuados y dos entre 10 y 50 parásitos. Todos presentaron gametocitos. 13 pacientes fueron declarados FTP y 7 FTT (Tabla 5).

En el último día de control o día “veintiocho”, fueron 3 los pacientes diagnosticados con *P. vivax*, 2(66,7%) con parásitos asexuados y todos con gametocitos. Para la fecha, había 14 pacientes con FTP, 8 con FTT y 2 con Fracaso Parasitológico Tardío (FPT) (Tabla 5).

Por otra parte, la Respuesta Clínica y Parasitológica Adecuada (RCPA), de los medicamentos al final de la evaluación fue de 66,3%, siendo 40% para Cloroquina + Primaquina en el caso de *P. vivax*, y 92,5% para Artemeter + Lumefantrina para *P. falciparum* (Tabla 6).

	DÍA 0		DÍA 1		DÍA 2		DÍA 3		DÍA 7		DÍA 14		DÍA 21		DÍA 28		
	n	%	n	%	n	%	N	%	N	%	n	%	n	%	n	%	
Resultado Positivo	80	100	10	12,5	8	10,3	3	4,1	6	8,6	4	6,3	4	6,7	3	5,4	
<i>P. vivax</i>	40	50	9	90	8	100	3	100	5	83,3	3	75	4	100	3	100	
<i>P. falciparum</i>	40	50	1	10	0	0	0	0	1	16,7	1	25	0	0	0	0	
Parásitos asexuados	<10	52	65	4	40	3	37,5	0	--	6	100	4	100	2	50	1	33,3
	10–50	17	21,3	5	50	0	0	2	66,7	0	0	0	0	2	50	2	66,7
	>50	11	13,8	1	10	5	62,5	1	33,3	0	0	0	0	0	0	0	0
Gametocitos	43	53,8	10	12,5	8	100	3	100	5	83,3	3	75	4	100	3	100	
Tto (Clo+Pri)	40	50	40	50	40	50	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
Tto (Art/Lum+Pri)	40	50	40	50	40	50	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
Primaquina	--	--	--	--	--	--	80	100	40	50	40	50	--	--	--	--	
FTP	--	--	--	--	--	--	7	--	10	--	11	--	13	--	14	--	
FTT	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	5	--	7	--	8	--	
FPT	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	2	--	

Tto (Clo+Pri): Tratamiento con Cloroquina más Primaquina.

Tto (Art/Lum+Pri): Tratamiento con Artemeter/Lumefantrina más Primaquina.

FPP: Fracaso Parasitológico Precoz, FTT: Fracaso Terapéutico Tardío, FPT: Fracaso Parasitológico Tardío.

Tabla 5

Resultados por día de pacientes que recibieron tratamiento antimalarico de primera línea.

Dieciséis pacientes con infección a *P. vivax* tuvieron Respuesta Clínica y Parasitológica Adecuada al tratamiento: 11 hombres y 5 mujeres entre 17 y 50 años de edad, 9 habían presentado malaria anteriormente, 35,7% de los comerciantes y 36,4% de los mineros. Entre los infectados con *P. falciparum* sólo 3 pacientes no registraron Respuesta Clínica y Parasitológica Adecuada al tratamiento: 2 mujeres, 1 hombre, entre 31 y 55 años, 1 minero, dos amas de casa (Tabla 6).

El fracaso terapéutico precoz (FTP) o desarrollo de signos de peligro o malaria grave los tres primeros días del tratamiento, alcanzó 22,5% para Cloroquina + Primaquina, y 2,5% para Artemeter + Lumefantrina (Tabla 5). Fue observado fracaso tardío al tratamiento (FTT) o aparición de parasitemia con temperatura axilar $>37,5$ °C. (historia de fiebre), entre los Días 4 y 28 inclusive sin haber reunido anteriormente los crite-

rios de FTP. Para Cloroquina + Primaquina 22,5%, y para Artemeter + Lumefantrina, 5% (Tabla 6).

El fracaso parasitológico tardío (FPT), o presencia de parasitemia con temperatura axilar $<37,5$ °C, entre los días 7 y 28 inclusive, sin haber reunido anteriormente los criterios de FTP o FCT, se evidenció en 15% de los pacientes tratados con Cloroquina + Primaquina (Tabla 6).

También, en búsqueda de factores asociados a Respuesta Clínica y Parasitológica Adecuada, fueron analizadas las variables demográficas y los signos y síntomas de los pacientes. Diez variables presentaron asociación, 5 predisponentes y 5 protectoras, pero ninguna evidenció significancia estadística. Poseer un peso mayor a 70 kg, tiene 89% más probabilidad de curarse de la infección que los de peso menor, sin significancia estadística (Tabla 7).

SIGNOS Y SÍNTOMAS	<i>Plasmodium vivax</i>		<i>Plasmodium falciparum</i>		Total	
	n	%	n	%	n	%
Desarrollo de signos de peligro o malaria grave los Días 1, 2 ó 3.	1	2,5	1	2,5	2	2,5
Densidad parasitaria del Día 2: $>$ densidad parasitaria del Día 1 sin tener en cuenta la presencia de fiebre.	5	12,5	0	0	5	6,3
Densidad parasitaria del Día 3: $>$ 25% de la densidad parasitaria del Día 1.	2	5	0	0	2	2,5
Presencia de parásitos asexuados el Día 3 con temperatura axilar $>$ 37,5 °C.	1	2,5	0	0	1	1,25
FTP: Sumatoria de los anteriores	9	22,5	1	2,5	10	12,5
FTT: Aparición de parasitemia con temperatura axilar $>37,5$ °C. (o historia de fiebre) entre los Días 4 y 28 inclusive, sin haber reunido anteriormente los criterios de FTP.	9	22,5	2	5	11	13,7
FPT: Presencia de parasitemia con temperatura axilar $<37,5$ °C, entre los Días 7 y 28 inclusive, sin haber reunido anteriormente los criterios de FTP o FCT.	6	15	0	0	6	7,5
RCPA: Ausencia de parasitemia los días 14, 21 y 28, sin haber reunido previamente los criterios de FTP, FCT o FPT.	16	40	37	92,5	53	66,3

Tabla 6

Fracasos y Respuesta Clínica y Parasitológica Adecuada de los pacientes.

DISCUSIÓN

La malaria ha afectado desde su descubrimiento a grandes masas poblacionales en el mundo, causando innumerables defunciones. En los últimos 15 años, en Venezuela la enfermedad ha mostrado un notable incremento en su incidencia y mortalidad debido entre otras causas, a la emergencia económica y social del país, que propicia la ocupación laboral de gran cantidad de personas en áreas endémicas de la enfermedad.

Variable	OR	IC	χ^2	P
Ser masculino	0,91	0,19 – 4,43	0,04	0,83
Ser femenina	1,10	0,22 – 5,43	0,04	0,83
Edad < 30 años	0,92	0,21 – 3,95	0,04	0,83
Peso < 60 kg.	1,10	0,23 – 5,36	0,04	0,83
Peso > 70 kg.	1,89	0,42 – 8,76	0,37	0,54
Peso < 70 kg.	0,53	0,11 – 2,40	0,37	0,54
Ser comerciante	0,76	0,16 – 3,50	0,00	0,94
Ser minero	1,10	0,23 – 5,36	0,04	0,83
Malaria antes	1,09	0,25 – 4,76	0,04	0,83
Vomitarse en Tto	0,92	0,19 – 4,43	0,04	0,83

Tabla 7
Factores asociados a Respuesta Clínica y Parasitológica Adecuada.

Aunque el problema de la resistencia a las drogas está presente en todas las zonas endémicas de paludismo en el mundo, las áreas reconocidas actualmente como más seriamente afectadas, son la península de Indochina y la región del Amazonas en Suramérica (WHO, 2005) (Snow, 2005).

Según estudios, varios mecanismos han sido valorados para explicar los cambios ocurridos en la sensibilidad a las drogas antipalúdicas: adaptaciones fisiológicas debidas a cambios no genéticos, selección de las células droga-resistentes previamente existentes en una población mixta bajo la acción de la droga (selección de mutantes), mutación espontánea y mutación de genes extranucleares (OPS, 2006).

En nuestro caso, la Respuesta Clínica y Para-

sitológica Adecuada de 92,5% del *Plasmodium falciparum* a la combinación Artemeter/lumefantrina, se puede considerar alta, sin embargo, confirma cierta falla terapéutica ya reseñada.

De acuerdo a las experiencias de Rojas (2010), en Colombia desde el año 2006 hasta la fecha, se está utilizando la combinación terapéutica Artemeter/Lumefantrina en áreas con alta transmisión de malaria, con adecuada respuesta terapéutica y pocas fallas al tratamiento. En el departamento del Chocó, Colombia, el resultado mostró después del seguimiento estándar de 28 días, con el tratamiento Artemeter/Lumefantrina una tasa de curación ajustada por reacción de cadena de polimerasa (PCR) de 99% (IC95% 97-99,9), consistente con la mayoría de estudios realizados en la región amazónica desde 2003, según datos de la Red Amazónica de Vigilancia de la Resistencia a Antimaláricos.

En dichos estudios, fue evaluada la eficacia de la combinación Artemeter/Lumefantrina con resultados de fallas terapéuticas inferiores a 5%: en Brasil (0%), Ecuador (0%), Venezuela (0%), Guyana (1,7%) y en Suriname se observan los porcentajes de falla terapéutica más elevados de la región entre 1,9% y 4,5%, la mayoría de fallas tardías, lo cual no se traduce necesariamente en resistencia a la combinación, sin descartar problemas de absorción de la Lumefantrina, o la posibilidad de reinfección (OPS, 2005).

Por su parte, Ferreira et al. (2008), reportaron una disminución significativa de la sensibilidad *in vitro* al Artemeter del *P. falciparum* en aislamientos de la Guyana Francesa en la frontera con Brasil, sin embargo, la misma no fue acompañada de un incremento en las fallas terapéuticas.

En Tanzania y Burundi, donde se evaluó la eficacia de Artemeter/Lumefantrine (AL) vs Artesunato + Amodiaquina (AQ+AS), al día 28 hubo menor número de fallas con AL en Tanzania (AL= 29%, AQ+AS=51%; RR 0,56, 95% CI 0,48 – 0,66). El día 14, hubo pocas fallas parasitológicas tanto en Tanzania (AL= 1,3%, AQ+AS 13%), como en Burundi (AL=0,7%, AQ+AS= 4,6%; RR 0,15, 95% IC 0,02-1,21). Igualmente, la carga de gametocitos para el día 14 fue significativamente

baja en ambos estudios (Martensson et al. 2005).

También, en una revisión sistemática de Cochrane, de 50 estudios evaluando la eficacia de las cinco CTDA, de primera línea más utilizadas en el mundo, se observaron algunos estudios donde reportan fallas terapéuticas superiores a 10% en todas las combinaciones (Sinclair et al. 2009).

En Camboya, fue realizado un estudio con 190 pacientes de los cuales 55 fueron tratados con Artemeter/Lumefantrina, en los que se encontró una tasa de curación de 71,1%. Encontraron que las fallas terapéuticas para este tratamiento están relacionadas con las concentraciones plasmáticas de Lumefantrina, las cuales se garantizan, siempre y cuando, el medicamento se suministre con suplemento alimenticio graso (Denis et al. 2006).

Un estudio multicéntrico realizado en África, evidenció que la respuesta clínica y parasitológica adecuada fue de 95,5% para Artemeter/Lumefantrina, mientras que en Nigeria se observaron tasas de curación para Artemeter/Lumefantrina de 100% ($p = 0.66$), datos corregidos con PCR (Falade et al. 2008).

Por otra parte, la alta proporción de pacientes con gametocitos el día “cero” (53,8%), observada en nuestro estudio, especialmente en infecciones a *P. vivax*, evidencia dificultad para el acceso a los servicios de salud, sea por demora al acudir a un centro diagnóstico, o su indisponibilidad, lo cual evita un diagnóstico precoz y un tratamiento oportuno de los pacientes con malaria. Luego, la presencia de los mismos hasta el día 28, reflejaría la problemática existente con los tratamientos.

En Colombia, 30% de los pacientes tratados con Artemeter/Lumefantrina y 35% del grupo de Amodiaquina + Artesunato tenían gametocitos al día 0, sin embargo, en ninguno de los tratamientos se observaron gametocitos después del segundo día (Rojas, 2010).

En Burundi se reportaron gametocitos al día 7; encontrándose menor cantidad en el grupo Artemeter/Lumefantrina con un RR 0,68 (IC95% 0,33-1,41) (Ndayiragije, 2004).

Según lo descrito por Sutherland et al. (2005),

las combinaciones terapéuticas con derivados de Artemisinina, han logrado una disminución en los gametocitos de forma tan significativa, que se ha logrado una disminución en la transmisión del parásito al mosquito y podrían minimizar la transmisión de parásitos resistentes.

Para el desarrollo de resistencia a la Artemisinina, es importante la eficacia del otro medicamento que hace parte de la combinación y otros factores que aún no están siendo estudiados. En la Guyana Francesa, Jambou et al. (2005), también reportaron una disminución de la actividad *in vitro* del Artemeter en la frontera con Brasil, esto debido a una mutación en el sitio blanco de acción de las Artemisininas, lo cual generó gran preocupación en la región y la necesidad de un monitoreo continuo de la eficacia de las combinaciones, sin observar a la fecha un incremento en las fallas terapéuticas.

Sin embargo, desde el año 2009, existe la preocupación creciente por la aparición de resistencia a los derivados de la Artemisinina en la frontera de Tailandia y Camboya, donde históricamente ha aparecido la resistencia a los medicamentos antimaláricos. Esta resistencia se traduce en prolongación en el tiempo de eliminación de los parásitos, lo cual reduce la respuesta terapéutica (Dondorp et al. 2009).

En cuanto al tratamiento combinado con Cloroquina + Primaquina, el mismo suele ser el indicado para la cura radical de las infecciones por *P. vivax*. La Cloroquina actúa sobre las formas sanguíneas asexuales y las formas sexuales inmaduras del parásito, mientras que la Primaquina posee actividad gametocida y esquizontocida tisular (Bergonzoli et al. 2000).

No obstante, el tratamiento con Cloroquina + Primaquina para las infecciones a *P. vivax*, produjo una Respuesta Clínica y Parasitológica Adecuada de sólo 40%, considerada una eficacia “muy baja” para un área de tan alta endemicidad, más si la comparamos con el estudio de Krudsood et al. (2007), quienes reportaron que la Cloroquina sigue siendo el fármaco de elección para el tratamiento del *Plasmodium vivax* en Tailandia, al reportar 100% de curación en 51 pacientes tratados, muy distante del porcentaje

alcanzado en nuestro estudio.

De acuerdo a lo observado, el principal fallo en la administración de la combinación de Cloroquina + Primaquina se presentó por el Fracaso Terapéutico Tardío, donde la parasitemia reapareció con una temperatura axilar mayor de 37,5 °C, entre los días 4 y 28. En muy pocos casos se desarrollaron signos de peligro con la administración de la combinación Cloroquina + Primaquina en los días 1, 2 o 3.

En Bolivia, una evaluación *in vivo* de la eficacia de la Cloroquina para el tratamiento de la malaria por *Plasmodium vivax*, en el Departamento de Tarija, incluyó 61 pacientes entre 5 y 59 años de edad. Todos recibieron una dosis total de Cloroquina de 25 mg/Kg en 3 días. De acuerdo al protocolo estandarizado de la OPS/OMS, los pacientes fueron seguidos por 28 días, completando el seguimiento de 60 pacientes. No se presentaron recurrencias de la parasitemia o manifestaciones clínicas después del tercer día de tratamiento, lo cual mostró 100% de sensibilidad de *Plasmodium vivax* al medicamento (Martínez et al. 2009).

También en Bolivia, fue evaluada la eficacia terapéutica de la Cloroquina como tratamiento de malaria no complicada por *P. vivax* en Riberalta, Guayaramerín y Yacuiba, en pacientes entre 5 y 59 años. Se suministró Cloroquina (25 mg/kg en tres días), y se hizo seguimiento por 28 días, midiendo los niveles de Cloroquina en sangre y desetilcloroquina, el día dos y el día de registro de reaparición de parasitemia. Se estudiaron 223 pacientes. Las medias de densidad parasitaria (formas asexuadas) del día 0 en Riberalta fueron de 6.147, en Guayaramerín, 4.251, y en Yacuiba, 5.214 parásitos/μl de sangre. Mientras en Yacuiba no se presentaron fracasos terapéuticos, en Riberalta ocurrieron en 6,2% y en Guayaramerín 10% (Añez et al. 2012).

En otro orden de ideas, algunas de las variables demográficas, los signos y los síntomas, presentaron asociación con la Respuesta Clínica y Parasitológica Adecuada, sin significancia estadística, mientras que en un estudio realizado en Costa Rica, no se encontró ninguna variable (edad, peso, talla, sexo, consumo de tabaco y alcohol, escolaridad y parasitemia), que

afectara la eficacia, lo que permitió concluir que los posibles factores de confusión estuvieron homogéneamente distribuidos entre los diferentes grupos (Bergonzoli et al. 2000).

Finalmente, el valor de la Respuesta Clínica y Parasitológica Adecuada para *P. falciparum* (92,5%), de la combinación Artemeter/ Lumefantrina podría ser aceptable, mientras que la respuesta de la Cloroquina + Primaquina a *P. vivax* (40%), hace pensar en la necesidad de buscar una combinación sustituta, con mayor eficacia, en razón a la recomendación de las guías recientes de tratamiento antimalárico, las cuales recomiendan un cambio en la política de tratamiento cuando el porcentaje de falla terapéutica sea superior a 10%.

Dado que la eficacia de un tratamiento depende de diversos factores tanto intrínsecos como extrínsecos (disponibilidad del tratamiento, adherencia, especificidad del medicamento, carga parasitaria, farmacocinética, seguridad y tolerabilidad del medicamento), se hace necesario realizar un estudio que establezca nuevas asociaciones con dichas variables y la medición de concentraciones hemáticas y urinarias de los medicamentos, e implantar un sistema de monitoreo permanente de los medicamentos utilizados.

También, es necesario un control riguroso de los medicamentos en áreas maláricas, evitando su comercio, y la aplicación indebida de dosis, como también, el uso de medicamentos traídos del exterior, además de mejorar el sistema de vigilancia epidemiológica, en el sentido que el mismo registre e identifique los pacientes cada vez que soliciten un examen de gota gruesa, y reciban tratamiento, para evitar la repetición de pacientes tratados en distintos centros antimaláricos.

Por supuesto, es imprescindible, que el programa antimalárico del MPPS, esté en consonancia con la Estrategia técnica mundial contra la malaria 2016-2030, elaborada por la OMS el año 2015, con el propósito de ayudar a los países a reducir el sufrimiento humano causado por la más mortal de las enfermedades transmitidas por mosquitos en el mundo.

REFERENCIAS.

- AÑEZ A., NAVARRO-COSTA D., YUCRA O., GARNICA C., MELGAR V., MOSCOSO M., ARTEAGA R. Y NAKAO G. (2012). Respuesta terapéutica de *Plasmodium vivax* a la Cloroquina, en Riberalta, Guayamerín y Yacuiba, Bolivia. *Biomedica*, Volume 32, Number 4, pp. 527.
- BERGONZOLI G., RIVERS J. (2000). Eficacia terapéutica de diferentes regímenes antimaláricos en la región fronteriza de Costa Rica y Nicaragua. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 7(6).
- CÁCERES J.L. (2013). Récord de incidencia malárica en Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. 88.
- DENIS M., TSUYUOKA R., LIM F., LINDEGARDH N., YI P. (2006). Efficacy of artemether/lumefantrine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in northwest Cambodia. *Tropical Medicine and International Health*, 2 (12): p.1800-1807.
- DONDORP A., NOSTEN F. (2009). Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *New England Journal of Medicine*; 361:455-67.
- FALADE C., OGUUNDELE A., YUSUF B., ADEMOWO G. (2008). High efficacy of two artemisinin-based combinations (artemether-lumefantrine and artesunate plus amodiaquine) for acute uncomplicated malaria in Ibadan, Nigeria. *Tropical Medicine and International Health*, 5 (13): p.635-643.
- FERREIRA I., MARTINELLI A. (2008). *Plasmodium falciparum* from Pará state (Brazil) shows satisfactory in vitro response to artemisinin derivatives and absence of the S769N mutation in the SERCA-type PfATPase6. *Tropical Medicine and International Health* 2008; 13 : 199-207.
- JAMBOU R., LEGRANDE E., NIANG M. (2005). Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet*, 366: 1960-3.
- KRUDSOOD S., TANGPUKDEE N., MUANGNOICHAROEN S., THANA-CHARTWET V., LUPLERTLOP N., SRIVILAIRIT S. (2007). Clinical efficacy of chloroquine versus artemether-lumefantrine for *Plasmodium vivax* treatment in Thailand. *The Korean journal of parasitology*.
- MACHADO Y. (2011). Paludismo, enfermedad del tercer mundo. Recuperado el 09 de agosto de 2017, de: <http://www.monografias.com/trabajos77/paludismo-enfermedad-tercer-mundo/paludismo-enfermedad-tercer-mundo.shtml>.
- MARTENSSON A., STROMBERG J. (2005). Efficacy of Artesunate Plus Amodiaquine versus that of Artemether-Lumefantrine for the Treatment of Uncomplicated Childhood *Plasmodium falciparum* Malaria in Zanzibar, Tanzania. *Clinical Infectious Diseases*, 41:1079-86.
- MARTÍNEZ E., YUCRA W., CASTRO V., FIGUEROA R., DE LA CRUZ L., TÉLLEZ C., AVILA J., MOLLINADO R., ESCOBAR J. Y DURAN P. (2009). Evaluación de la eficacia de la Cloroquina para el tratamiento de la malaria por *Plasmodium vivax* en Yacuiba, Tarija, Bolivia. *Cuadernos del Hospital de Clínicas* 54(1):27-33.
- Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS). (2015) Circular 00012 Dirección Nacional de Salud Ambiental. Pauta nacional de Tratamiento antimalárico. Caracas.
- NDAYIRAGIJE A. (2004). Efficacy of therapeutic combinations with artemisinin derivatives in the treatment of non complicated malaria in Burundi. *Trop Med Int Health*, 9(6): p. 673-9.
- ORGANIZACIÓN Mundial de la Salud (OMS). (2017). Informe mundial sobre el paludismo 2016. Ginebra.
- ORGANIZACIÓN Mundial de la Salud (OMS). (2016). Informe mundial sobre el paludismo 2015. Ginebra.
- OMS (1996). Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: medicamentos utilizados en las enfermedades parasitarias.
- ORGANIZACIÓN Panamericana de la Salud (OPS). (2017). (RAVREDA) Protocolo genérico para estudios In vivo de eficacia de los medicamentos antimaláricos en las américas. de: <http://www2.paho.org/hq/index.php>. Consultado el 17/05/16.
- ROJAS D. (2010). Evaluación de la eficacia terapéutica y la tolerabilidad de las combinaciones fijas de Artesunate /Amodiaquine y Artemeter/Lumefantrina para el tratamiento de malaria por *P. falciparum* no complicada en el departamento del Chocó. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- SEBBAG R. (2011). Situación de la malaria a nivel mundial y la contribución de Sanofi a través de su programa de acceso a medicamentos. Simposio: Nuevas alternativas terapéuticas para el manejo de la malaria. XV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. *Biomédica*; 31(sup.3):3-315.
- SINCLAIR D., ZANI B. (2009). Artemisinin-based combination therapy for treating uncomplicated malaria (Review). *The Cochrane Library*, 4:5-22.
- SUTHERLAND, C.J. (2005). Reduction of malaria transmission to Anopheles mosquitoes with a six-dose regimen of co-artemether. *PLoS Med*, 2(4): p.92.
- WILSON G., CAMPONOVIO E., NEIRA P., SUBERCASEUX B., MUNOZ N. (2006). Malaria por *Plasmodium falciparum* en el Servicio de Medicina del Hospital San Camilo de San Felipe. *Parasitol Latinoam*; 61(1/2):82-85.
- WORLD Health Organization (1996). Assessment of therapeutic efficacy of antimalarial drugs for uncomplicated *Falciparum* malaria in areas of intense transmission. WHO/MAL/96.1077. Geneva: WHO.
- WORLD Health Organization. (2006). What is malaria?<http://www3.who.org/en/Section.Section21/Section334.htm>. Consultado el 10/06/16.
- WORLD Health Organization. (2005). *The World Malaria Report*. Geneva: World Health Organization. RL:<http://rbm.who.int/wmr2005/>. Consultado el 10/05/2016.
- SNOW R.W., GUERRA C.A., NOOR A.M, MYINT H.Y., HAY S.I. (2005). The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 2005; 434:214-217.
- OPS (2006). IV Reunión conjunta de las redes subregionales de vigilancia de enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes. *Rev Patol Trop* 2007; 36(supl.1):1-158.
- OPS. (2005). Regional Strategic Plan for Malaria in the Americas 2006-2010. RAVREDA project resistance network. www.paho.org/english/AD/DPC/CD/raurada-ami.htm. Consultado el 22/05/2016.

Comportamiento frente a insecticidas organosintéticos en *Anopheles nuneztovari* Gabaldon 1940, de una zona malárica minera del Estado Bolívar, Venezuela.

Darjaniva Molina de Fernández¹,
Luisa Elena Figueroa Acosta¹,
Danny Bastidas¹,
Nieves Molina¹,
Víctor Sánchez¹,
William Anaya¹,
Claudia Domínguez² & Jorge Moreno².

¹ Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental, Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldón" Ministerio del Poder Popular para la Salud. Avenida Bermúdez Sur No 93, Maracay, edo. Aragua. Venezuela, darja2410@gmail.com

² Centro de Investigaciones de Campo Dr. Francesco Vitanza, Tumeremo, edo. Bolívar. Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldón" Ministerio del Poder Popular para la Salud, jorermo@gmail.com

RESUMEN

Anopheles nuneztovari Gabaldon 1940, es considerado el principal vector de malaria en la región andina, recientemente ha sido reportado en el estado Bolívar, donde se produce más de 60% de la malaria en Venezuela. Se propuso como objetivo estudiar el comportamiento de *An. nuneztovari* s.l. de Las Manacas, municipio Sifontes, en el estado Bolívar, frente a los cuatro grupos toxicológicos de insecticidas (organofosforados, organoclorados, carbamatos y piretroides) y determinar los posibles mecanismos de resistencia a insecticidas involucrados, por medio de pruebas biológicas en botellas, pruebas bioquímicas en microplacas y electroforesis. *Anopheles nuneztovari* s.l. resultó resistente a los insecticidas fenitrothion, pirimifosmetil y DDT, pero susceptible a propoxur, lambdacialotrina y deltametrina. Este fenómeno fue confirmado por pruebas bioquímicas observándose valores elevados de acetilcolinesterasa insensible (0,1083), al mismo tiempo que valores normales para la acetilcolinesterasa (0,1095), esterasas α (0,4930), esterasas β (0,5293) y oxidasas de función múltiple (0,1215). Estos resultados fueron comprobados en las electroforesis, observándose bandas bien definidas y fuertemente teñidas tanto de esterasas A4 como de B2, las cuales han sido reportadas como mecanismos de resistencia en vectores de enfermedades. Estos hallazgos contribuyen al planteamiento de nuevas estrategias para el buen uso y prolongación de la vida útil de los insecticidas.

Palabras clave: *Anopheles nuneztovari*; esterasas; oxidasas; resistencia a insecticidas; malaria; Venezuela.

BEHAVIOR TO ORGANOSYNTHETIC INSECTICIDES IN ANOPHELES NUNEZTOVARI GABALDON 1940 OF A MALARIOUS MINING ZONE FROM BOLIVAR STATE, VENEZUELA.

ABSTRACT

Anopheles nuneztovari Gabaldon 1940, is considered the main vector of malaria in the Andean region, has recently been reported in the Bolívar state, where more than 60% of malaria is produced in Venezuela. The objective was to study the behavior of *An. nuneztovari* s.l. of Las Manacas, municipality Sifontes, in the Bolívar state, in front of the four toxicological groups of insecticides (organophosphorus, organochlorine, carbamates and pyrethroids) and to deter-

mine the possible mechanisms of resistance to insecticides involved, by means of biological tests in bottles, biochemical tests in microplates and electrophoresis. *Anopheles nuneztovari s.l.* It was resistant to insecticides fenitrothion, pirimiphosmethyl and DDT, but susceptible to propoxur, lambda-cyhalothrin and deltamethrin. This phenomenon was confirmed by biochemical tests observing high values of insensitive acetylcholinesterase (0.1083), at the same time as normal values for acetylcholinesterase (0.1095), esterases α (0.4930), esterases β (0.5293) and multiple function oxidases (0.1215). These results were checked in the electrophoresis, observing well defined and strongly stained bands of both A4 and B2 esterases, which have been reported as resistance mechanisms in disease vectors. These findings contribute to the approach of new strategies for the good use and prolongation of the useful life of the insecticides.

Keywords: *Anopheles nuneztovari*; esterases; oxidases; insecticide resistance, malaria; Venezuela.

INTRODUCCIÓN

Anopheles nuneztovari Gabaldon 1940, se encuentra distribuida en sur América desde Venezuela hasta Brasil (Sinka *et al.*, 2012). Hasta 2004 se pensó que la especie estaba confinada a las regiones del oeste de Venezuela, asociada a la ecoregión de piedemonte andino, hallándosele ocasionalmente en los llanos y bosques interiores en tierras bajas (Osborn *et al.*, 2004; Rubio-Palis, 2000); sin embargo, Moreno *et al.*, (2004) la colectaron en tres localidades del municipio Sifontes en el estado Bolívar. Esta especie se encuentra en zonas con altitudes que van desde 200 hasta 1352 msnm, con precipitaciones y temperaturas medias anuales de 1000 a 4000 mm de lluvia y 25 a 28 °C (Sinka *et al.*, 2010); siendo considerado el principal vector de malaria por *Plasmodium vivax* en el occidente de Venezuela y norte de Colombia, así como de *P. falciparum* en Surinam durante las epidemias (Panday 1977). Fue encontrado por primera vez infectado en la naturaleza con *Plasmodium* spp. por Rey y Renjifo (1950). *Anopheles nuneztovari s.l.* ha sido encontrada naturalmente infectada con *Plasmodium* en Brasil (Arruda *et al.*, 1986; Póvoa, 1993; Tadei *et al.*, 1998), Colombia (Brochero, *et al.*, 2007) y Perú (Hayes *et al.*, 1987); mientras que en Venezuela la infección ha sido reportada por Pintos y Sabril (1965), Pintos *et al.*, (1968) y Rubio-Palis *et al.*, (1992), siendo el último reporte el de Abou Orm *et al.* (2017)

en el municipio Sifontes del estado Bolívar. Gabaldón y Guerrero (1959) observaron que en algunas áreas donde *An. nuneztovari* estaba transmitiendo malaria los índices esplénicos eran cercanos a 100%. Hamon *et al.*, (1970) también señalaron que la importancia de este vector dependía de la densidad de vegetación en los alrededores de las casas, reduciéndose la densidad del vector cuando la vegetación peridoméstica se eliminaba. Esta especie es antropofílica y las hembras abandonan las casas poco después de alimentarse de sangre, por consiguiente, al no reposar sobre las paredes evitan ponerse en contacto con dosis letales de insecticidas. Gabaldón (1972) consideraba que esta intensa exofilia ha sido responsable en gran medida de la malaria "refractaria" en Venezuela.

Para 2017 La Incidencia Parasitaria Anual (IPA) del país fue de 21,7 por cada 1.000 habitantes (MPPS, 2017). El control exitoso de la malaria se basa en la integración de las medidas de educación sanitaria hacia la comunidad, orientadas a crear conciencia sobre la protección individual y aquellas medidas llevadas a cabo por los Programas de control, dirigidas a actuar sobre los vectores y sobre el parásito. Sin embargo, las estrategias de control en malaria, no pueden ser estáticas, en virtud de las capacidades adaptativas de los parásitos a los medicamentos y los vectores a los insecticidas (Wide, *et al.*, 2011). El control mediante rociamiento residual intradomiliario y el uso de mosquiteros insecticidas de larga duración, seguirá siendo fundamental, desafortunadamente, debido a la presión, los mosquitos siguen desarrollando resistencia a los insecticidas. Se ha identificado resistencia a insecticidas en los anofelinos vectores de malaria en 64 países con transmisión activa de la enfermedad, afectando todas las regiones del mundo, detectándose en algunas áreas, resistencia a las cuatro clases de insecticidas utilizados en salud pública para el control de vectores (IRAC, 2011). La comunidad mundial para el control de la malaria ha tomado en serio esta amenaza, el Plan Mundial para el Manejo de la Resistencia a Insecticidas en los vectores de malaria (GPIRM, por sus siglas en inglés) advierte sobre la necesidad de actuar antes que este

problema ponga en peligro las estrategias actuales de control de vectores (OMS, 2012).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y muestra

La población objeto de estudio fue *An. nuneztovari* s.l. de la localidad de Las Manacas (6° 12' 24" N; 61° 22' 40" O; fig. 1) ubicada en la parroquia San Isidro del municipio Sifontes en el estado Bolívar.

La muestra estuvo constituida por mosquitos hembras adultas de esta especie colectadas entre las 18:00 y 20:00 horas, reposando sobre vaqueras y paredes de las viviendas a una frecuencia de dos veces por semana de septiembre a diciembre de 2017. No se contó con una cepa patrón susceptible a insecticidas, de la especie.

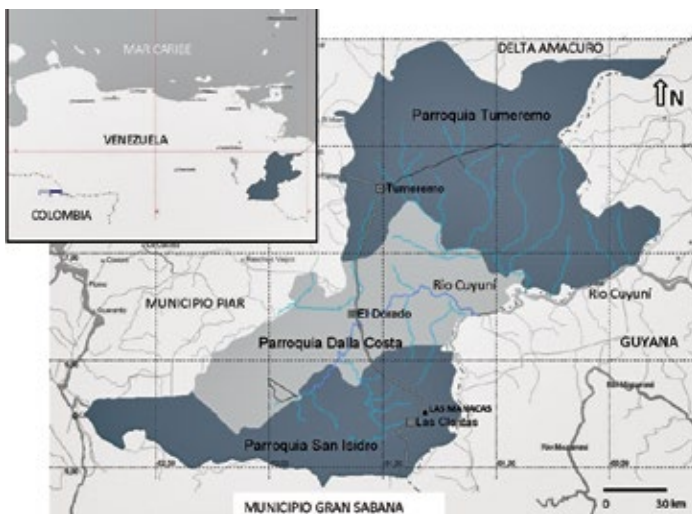


Figura 1
Ubicación geográfica de la localidad de Las Manacas, Parroquia San Isidro, Municipio Sifontes, edo. Bolívar, Venezuela.

Insecticidas

Se evaluaron el organoclorado DDT (98%), los organofosforados fenitrotrion (95%) y pirimifosmetil (89,08%); los piretroides lambdacialotrina (70%) y deltametrina (70%) y el carbamato propoxur (99,3%), los insecticidas grado técnico sin valor comercial que fueron suministrados por Insecticidas Internacionales Compañía Anónima INICA.

Pruebas biológicas

Los bioensayos se realizaron siguiendo el método de las botellas del CDC (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA). Los mosquitos adultos hembras colectados fueron expuestos a botellas de vidrio tipo Wheaton de 250 ml, tratadas con soluciones cetónicas de insecticidas, las cuales fueron usadas como cámaras de prueba para detectar la resistencia a los insecticidas en mosquitos adultos, para los ensayos se emplearon las dosis recomendadas por la OMS (2016) que señala la dosis diagnóstica como la menor de la dosis que mata el mayor porcentaje de los insectos expuestos. Las botellas controles del experimento solo fueron tratadas con acetona. Los ensayos se realizaron a temperaturas aproximadas de 26°C ± 2 y humedad relativa de 75% ± 5. Se expusieron aproximadamente 10 mosquitos adultos (♀) por botella y se evaluaron cuatro repeticiones por cada concentración de insecticida y dos repeticiones como grupo control. Los ensayos fueron replicados tres veces en días distintos, durante el tiempo que se lograba el 100% de mortalidad. De esta manera se determinó el efecto del insecticida en función del tiempo de exposición, Con esta misma metodología se procedió para los bioensayos con los sinergistas.

Pruebas bioquímicas

Cada mosquito fue homogeneizado en 50 µl de amortiguador fosfato y diluido a 0.5 ml del mismo amortiguador. Se tomaron alícuotas de 50 µl de cada muestra y se colocaron en placas para microtitulación de 96 pocillos. Se evaluaron seis diferentes enzimas que confieren resistencia a insecticidas; esterasas α y β, multifunción oxidasa (MFO), glutation-S-transferasa (GST), acetilcolinesterasa (AChE) y acetilcolinesterasa insensible (AChEi). Los substratos utilizados en cada ensayo incluyen α y β-naftil acetato para las esterasas no específicas, el TMBZ (3,3',5,5'-Tetrametil Benzidina) para las oxidasas (hemo peróxidasa) y el yoduro de acetilcolina usado para medir la actividad de la acetilcolinesterasa normal, para la acetilcolinesterasa insensible se añadió el insecticida carbamato propoxur a la muestra. La absorbancia fue medida en un lector de

ELISA, Multiskan Plus de Fisher Scientific, empleando filtros de 405 nm para AChe y AChe_i, mientras que para las esterasas y oxidasas se empleó filtro de 620 nm (Hemingway y Brogdon, 1998).

Identificación de esterasas por electroforesis.

Siguiendo el procedimiento descrito por García-Segua, se prepararon las muestras en una proporción de 1:1; 10 µl de homogenato con 10 µl de amortiguador de carga para un total de 20 µl. Luego se preparó el gel tampón colocándolo en la placa y se esperó la polimerización del mismo. Seguidamente se preparó el gel de corrida, añadiéndolo a la placa nuevamente, colocando el peine separador. Una vez ocurrida la polimerización se retiró el peine, y el gel del soporte. Se llenó la cámara con amortiguador de corrida, luego se colocó el gel dentro y las muestras en cada pocillo correspondiente. La corrida se realizó a 150 voltios aproximadamente 1 hora u 1 hora y 20 minutos. Pasado el tiempo se sacó el gel y se colocó en un recipiente contentivo de 50 ml de substrato, se incubó por 20 minutos para luego añadir el colorante Fast Blue por 5 minutos, enjuagar y sumergirlo en solución fijadora 50 ml por 20 minutos; después se procedió a secar a 80°C por 1 hora y 45 minutos, por último se retiró el gel y se cuantificaron las bandas.

Análisis de los resultados

Los datos obtenidos con las **pruebas biológicas** fueron sometidos a un análisis de regresión y correlación lineal probit, donde se determinaron los tiempos letales 50 y 98 (TL₅₀ y TL₉₈), así como la pendiente de la recta y el X₂ y graficados en el programa Excel, empleando una curva sigmoideal de porcentaje de mortalidad versus tiempo en minutos, Los resultados obtenidos en las **pruebas bioquímicas** de la acetilcolinesterasa, acetilcolinesterasa insensible, esterasas elevadas y multifunción oxidasa, fueron analizados en función de los valores de absorbancias según el siguiente criterio: valores de absorbancia por encima de 0,3; 0,02; 0,8 y 0,5 respectivamente, son considerados como evidencia de presencia del mecanismo en concordancia con los resultados de los bioensayos con insecticidas. Para **Identificación**

de esterasas por electroforesis, se determinó la razón de movilidad (Rf= distancia de migración de la banda/ distancia de migración del indicador xileno cianol) y se buscó identificar las esterasas A4 (Rf= 0,7) y B2 (Rf= 0,2), que han sido reportadas como mecanismo de resistencia en otras especies de importancia médica (Georghiou y Pasteur, 1978).

RESULTADOS

Se determinó el efecto del insecticida en función del tiempo de exposición en comparación al umbral de resistencia categorizando los mosquitos como resistentes o susceptibles. En el tratamiento control no se encontró mortalidad por lo que no fue necesario corregir. La relación tiempo (dosis) mortalidad de los especímenes de *An. nuneztovari s.l.* de Las Manacas, expuestos al órgano clorado DDT y los organofosforados fenitrotion y pirimifosmetil, evidencian resistencia, mientras que los expuestos al insecticida piretroide deltametrina y al carbamato propoxur resultaron susceptibles (tabla I, figura 2), por cuanto 100 % de los individuos expuestos murieron entre 15 y 20 minutos, con relación al umbral referencial para la especie de 30 minutos, determinado por Fonseca-González et al (2010). Adicionalmente, se observó sinergismo del butóxido de piperonilo con el pirimifosmetil (figura 3), más no con la deltametrina (figura 4). Este fenómeno fue confirmado por las pruebas bioquímicas donde se observaron valores elevados en absorbancia de acetilcolinesterasa insensible (0,1083), pero valores normales en acetilcolinesterasa (0,1095), esterasas alfa (0,4930), esterasas beta (0,5293) y oxidasas de función múltiple (0,1215) (tabla II). Asimismo, esto fue comprobado en las electroforesis, en las cuales se pudo observar bandas bien definidas y fuertemente teñidas tanto de esterasas A4 (figura 5), como de B2 (Figura 6), que también sugieren mecanismos de resistencia basados en estas enzimas.

Insecticidas	Dosis ¹	TL ₅₀ ²	IC ³	TL ₉₈ ⁴	IC ⁵	b±DS ₆	X ²
Pirimifos metil	20	46.4	42.8-50.1	70.5	64.4-80.6	0.8+/-0.01	10
Fenitrotion	50	46	43.6-48.4	71.4	67-77.5	0.8+/-0.007	25
Delta metrina	12.5	10	9.5-10.5	14.5	13.5-16	0.5+/-0.05	2.4
Lambda cialotrina	12.5	10.3	9.7-10.8	15	14-16.5	0.4+/-0.04	1.1
DDT	100	-	-	65.3	60-72.6	9.7+/-0.8	12.9
Propoxur	10	8.8	8.1-9.3	12.4	11.5-13.9	0.6+/-0.08	1.4

Tabla I

Tiempos letales para seis insecticidas (µg/ml) en adultos de *Anopheles nuneztovari* s.l. de Las Manacas, municipio Sifontes, estado Bolívar.

1= µg/ml, 2= Tiempo letal 50 (minutos), 3= Intervalo de confianza a 95% (minutos), 4= Tiempo letal 98 (minutos), 5= Intervalo de confianza a 95% (minutos) y 6= Pendiente de la Línea de regresión +desviación estándar.

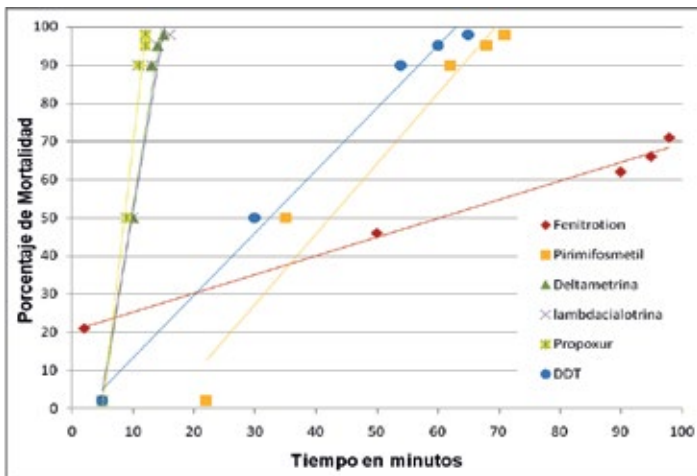


Figura 2

Tendencia de los datos tiempo-mortalidad en adultos de *Anopheles nuneztovari* s.l. expuestos a seis insecticidas en Las Manacas, municipio Sifontes, estado Bolívar.

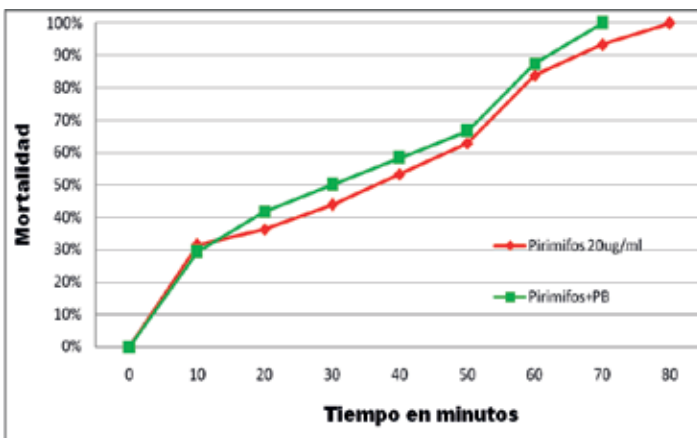


Figura 3

Tendencia de los datos tiempo-mortalidad en adultos de *Anopheles nuneztovari* s.l. expuestos a pirimifosmetil y butóxido de piperonilo, Las Manacas, municipio Sifontes, estado Bolívar.

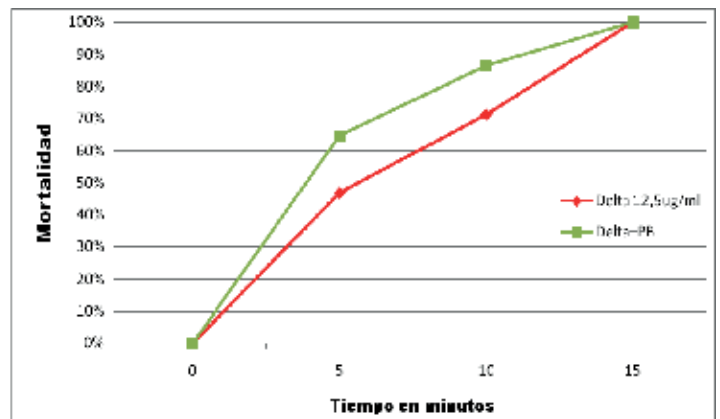


Figura 4

Tendencia de los datos tiempo-mortalidad en adultos de *Anopheles nuneztovari* s.l. expuestos a deltametrina y butóxido de piperonilo, Las Manacas, municipio Sifontes, estado Bolívar.

Estadística Descriptiva				
Mecanismo	Criterio de resistencia (absorbancia)	Promedio	Desviación Standard	Resultado
Acetilcolinesterasa	0,3	0,1095	0,0263	normal
Acetilcolinesterasa				
Insensible	0,02	0,1083	0,0252	elevada
Esterasas alfa	0,8	0,4930	0,0922	normal
Esterasas beta	0,8	0,5293	0,0833	normal
Oxidazas	0,5	0,1215	0,0272	normal

Tabla II

Mecanismos de resistencia determinados en adultos hembras de *Anopheles nuneztovari* s.l., Las Manacas, municipio Sifontes, estado Bolívar.

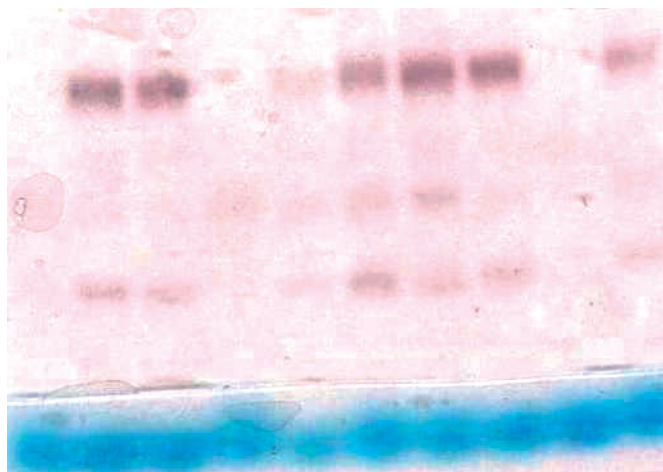


Figura 5

Patrones electroforéticos de esterasas alfa en adultas hembras de *Anopheles nuneztovari s.l.* de Las Manacas, municipio Sifontes, estado Bolívar.

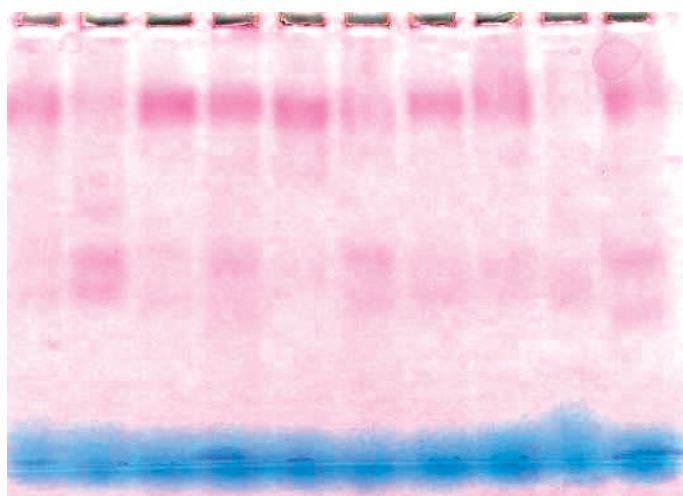


Figura 6

Patrones electroforéticos de esterasas beta en adultas hembras de *Anopheles nuneztovari s.l.* de Las Manacas, municipio Sifontes, estado Bolívar.

(Figuras 5 y 6: No se pudo disponer de una mejor resolución de la imagen por parte de los autores)

DISCUSIÓN

Anopheles nuneztovari s.l. del estado Bolívar, se fue encontrado resistente al organoclorado DDT y a los organofosforados pirimifosmetil y fenitroion, mientras que sigue respondiendo de manera favorable a los piretroides deltametrina y lambdacialotrina y al carbamato propoxur. La resistencia encontrada posiblemente esté siendo mediada por la acetilco-

linesterasa insensible y las esterasas A4 y B2 reveladas en la electroforesis. Existen reportes de especies de anofelinos en diferentes regiones del mundo, que todavía son susceptibles a los insecticidas piretroides, pero resistentes a los organofosforados por ejemplo en Venezuela, Figueroa Acosta *et al.* (2006) publicaron un estudio en *An. aquasalis* de Aragua en el cual se determinó su nivel de resistencia a lambdacialotrina y a pirimifosmetil, además se identificaron mecanismos de resistencia *in vivo* con los sinergistas Butóxido de Piperonilo (PB) y S, S, S, Tributifosforotriotioato (DEF) e *in vitro* con el substrato beta naftil acetato. Las enzimas de multifunción oxidasa (MFO) y las esterasas pudieran estar interviniendo en la resistencia encontrada a estos insecticidas.

También Molina de Fernández *et al.*, (2007) describen el nivel de resistencia a insecticidas organosintéticos en *albitarsis s.l.* (*marajoara* Galvão & Damasceno, 1942), en estudios realizados en zonas agrícolas de Calabozo, en el estado Guárico, donde hay brotes de malaria, esporádicos, con metodología combinada OMS y CDC, con la cual también se determinaron mecanismos de resistencia a insecticidas *in vivo* e *in vitro*. Las poblaciones adultas de *An. albitarsis s.l.* de esta zona mostraron resistencia cruzada entre DDT y piretroides, entre piretroides y a los organofosforados evaluados. En este caso, la resistencia a piretroides y organofosforados fue fuertemente reducida por el sinergista butóxido de piperonilo demostrando la presencia de multifunción oxidasas. Las pruebas bioquímicas indicaron aumento en el nivel de enzimas esterasas no específicas, y hubo evidencia de acetilcolinesterasa insensible. Estos resultados fueron discutidos en términos de resistencia múltiple a insecticidas, reportada por primera vez para esta especie y en la cual el uso de insecticidas se encuentra claramente comprometido con la aplicación de insecticidas en la agricultura, debido a que esta especie de importancia epidemiológica habita ecosistemas de arrozales. Del mismo modo, Fonseca-González *et al.*, 2009, a fin de establecer el estatus de susceptibilidad para *An. darlingi* de Colombia, condujeron ensayos bioquímicos en microplacas, encontrando niveles

elevados de enzimas, relacionados con la resistencia a insecticidas que incluyen MFO, NSE, GST y Achei. El metabolismo incrementado a través de MFO y NSE, pudiera estar envuelto en la resistencia cruzada a DDT y lambda-cialotrina. Nuevamente, González *et al.*, (2009a), reportaron para *An. nuneztovari*, evidencia de algunos mecanismos de resistencia tales como OFM y Achei, que implica resistencia cruzada entre DDT y piretroides, también se reportó resistencia a fenitrotión. Esta resistencia encontrada a estos insecticidas, es debido a que son los más comúnmente usados por las autoridades de salud para el control de los vectores de malaria. Por último, Molina de Fernández y Figueroa Acosta (2009), señalan resistencia metabólica en *An. aquasalis* del municipio Libertador, Sucre. Se detectaron niveles elevados de esterasas alfa y beta, así como también la Acetilcolinesterasa alterada. Las enzimas oxidasas de función múltiple en las poblaciones de *An. aquasalis* de tres de las localidades evaluadas también resultaron alteradas, por lo que ambos sistemas enzimáticos pudieran estar intervinando en la expresión de resistencia a insecticidas organofosforados en las poblaciones de estudio. Por otro lado, la actividad enzimática de la Glutathion-S-transferasa solo está operando en Río de Agua, esto podría explicarse, por cuanto la zona ha sido sometida a fuerte presión con insecticidas organoclorados, en el pasado, específicamente el DDT, ejercida por los organismos de salud en esa zona para el control de la malaria.

REFERENCIAS

- ABOU ORM S., MORENO J., CARROZZA M., ACEVEDO P. y HERRERA F. (2017). Tasas de infección de *Plasmodium spp.* para algunos *Anopheles spp.* del municipio Sifontes, Estado Bolívar, Venezuela. *Boletín de malariología y Salud Ambiental*, 57(1):12-25.
- ARRUDA M., CARVALHO M., NUSSENZWEIG R., MARACIC M., FERREIRA W., COCHRANE A. (1986). Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35(5):873-881.
- BROCHERO H., LI C., Y WILKERSON R. (2007). A newly recognized species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albittarsis* complex (Diptera: Culicidae) from Puerto Carreño, Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76(6):1113-7.
- FIGUEROA ACOSTA L. E., MARÍN ÁLVAREZ M., PÉREZ PINTO E., MOLINA DE FERNÁNDEZ D. (2006). Mecanismos de resistencia a insecticidas organosintéticos en una población de *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae) del estado Aragua. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* 46(1): 39-47.
- FONSECA-GONZÁLEZ I., CÁRDENAS R., GÓMEZ W., SANTA-COLOMA L., BROCHERO H., OCAMPO C., SALAZAR M., MCALLISTER J., BROGDON W., QUIÑONES M. (2010). Dosis diagnósticas para vigilar la resistencia a insecticidas de los vectores de malaria en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 36 (1): 54-61.
- FONSECA-GONZÁLEZ I., QUIÑONES M., MCALLISTER J., BROGDON W. (2009). Mixed-function oxidases and esterases associated with cross-resistance between DDT and lambda-cyhalothrin in *Anopheles darlingi* Root 1926 populations from Colombia. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*, 104(1): 18-26.
- FONSECA-GONZÁLEZ I., CÁRDENAS R., QUIÑONES M., MCALLISTER J., BROGDON W., (2009a). Pyretroid an organophosphate resistance in *Anopheles nuneztovari* (N.) Gabaldon populations from malaria endemic areas in Colombia. *Parasitology Research* 5:1399-1409.
- GABALDON A. (1972). Difficulties confronting malaria eradication. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 21:634-639.
- GABALDON A. Y GUERRERO L. (1959). An attempt to eradicate malaria by weekly administration of pyrimethamine in areas of out-of-doors transmission in Venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 8:433-439.
- GARCIA-SEGUA J., GAVILANES J., MARTINEZ A., MONTERO F., OÑADERRA M., Y VIVANCO F. (2002). Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica. España: Síntesis, SA.
- GEORGHIOU G. Y PASTEUR N. (1978). Electrophoretic esterase patterns in insecticide-resistant and susceptible mosquitoes. *Journal of Economic Entomology* 71: 201-205.
- HAMON J., MOUCHET J., BRENGUES J. Y CHAUVET G. (1970). Problems facing anopheline vectors control. Vector ecology and behavior before, during and after application of control measures. *Entomol Soc Am Misc Publ* 7: 28-41.
- HAYES J., CALDERON G., FALCON R., ZAMBRANO V. (1987). Newly incriminated anopheline vectors of human malaria parasites in Junin department, Perú. *Journal of the American Mosquito Control Association* 3(3): 418-422.
- HEMINGWAY J. y BROGDON W. (1998). Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual). World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- INSECTICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE (IRAC). (2011). Prevention and management of insecticide resistance in vectors of public health importance [en línea]. Disponible en <http://www.irc-online.org>.
- MINISTERIO DEL PODER POPULAR PARA LA SALUD. (2017). *Boletín epidemiológico semanal*, año 66, semana epide-

- miológica N° 53. [en línea]. Disponible en: <http://www.mppps.gov.ve/ms/modulesphp> (Consulta: Enero, 19, 2018).
- MOLINA DE FERNÁNDEZ D. Y FIGUEROA ACOSTA LE. (2009). Resistencia metabólica a Insecticidas Organofosforados en *Anopheles aquasalis* Curry 1932, Municipio Libertador, estado Sucre, Venezuela. *Biomédica* 29(4): 604-615.
- MOLINA DE FERNÁNDEZ D., FIGUEROA ACOSTA LE Y PÉREZ E. (2007). Resistencia Múltiple a Insecticidas en *Anopheles marajoara* Galvao & Damasceno, 1942 en zonas agrícolas. *Salud & Desarrollo Social*, N° 3 Art. 3 pp. 21-31.
- MORENO, J., RUBIO-PALIS Y., SÁNCHEZ V. Y MARIANY D. (2004). Primer registro de *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* Gabaldon, 1940 (Diptera: Culicidae) en el estado Bolívar, Venezuela y sus implicaciones eco-epidemiológicas. *Entomotropica* 19: 55-58.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (O.M.S). (2012). Plan Mundial para el Manejo de la Resistencia a Insecticidas en los vectores de malaria. [en línea]. Disponible en: <http://www.who.org/AD/DPC/CD/mal.htm> (Consulta: Enero, 08, 2018).
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (O.M.S). (2016). Programa mundial sobre el paludismo. Procedimientos de las pruebas para la vigilancia de la resistencia a los insecticidas en los mosquitos vectores del paludismo. Ginebra, Suiza.
- OSBORN F., RUBIO-PALIS Y., HERRERA M., FIGUERA A. Y MORENO J. (2004). Caracterización Ecoregional de los Vectores de Malaria en Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 44 (2): 77-92.
- PANDAY R. (1977). *Anopheles nuneztovari* and malaria transmission in Suriname. *Mosquito News* 37: 728-737.
- PINTOS P. Y SABRIL H. (1965). Infección natural de *Anopheles nuneztovari* en un brote de malaria en ausencia de insecticida. *Boletín Informativo de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental*, 4: 169-171. (2): 77-92.
- PINTOS P., SABRIL H. Y LÓPEZ V. (1965). Esporozoitos de *Anopheles (N.) nuneztovari* en área de malaria refractaria. *Boletín Informativo de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental*, 8: 169-171. (2): 375-381.
- POVOA M. (1993). Studies on malaria in Serra do Navio región, Amapá state, Brazil. PhD Thesis. University of London, 259 p.
- REY H., Y RENJIFO J. (1950). *Anopheles (N.) nuneztovari* infectado en la naturaleza con *Plasmodium*. *Academia Colombiana de Ciencias Exactas Fis-Quim y Nat. Rev.* 7: 534-537.
- RUBIO PALIS Y., WIRTZ R., CURTIS C. (1992). Malaria entomological inoculation rates in western Venezuela. *Acta Tropica* 52_: 167-174.
- RUBIO-PALIS, Y. (2000). *Anopheles (Nyssorhynchus)* de Venezuela, taxonomía, bionomía, ecología e importancia médica. Escuela de Malariología y Saneamiento Ambiental "Dr. Arnoldo Gabaldón" y el proyecto control de enfermedades endémicas. Maracay, edo. Aragua, Venezuela.
- SINKA M., BANGS M., MANGUIN S., RUBIO-PALIS Y., CHAREONVIRIYAPHAP, Y., COETZEE, M., MBOGO C., HEMINGWAY J., PATIL A., TEMPERLEY W., GETHING P., KABARIA C., BURKOT T., HARBACH R. Y HAY S. (2012). A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors* 5:69.
- SINKA M., RUBIO-PALIS Y., MANGUIN S., PATIL A., TEMPERLEY W., GETHING P., VAN BOECKE P., KABARIA C., HARBACH R., HAY S. (2010). The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis *Parasites & Vectors* 3:72.
- TADEI W., DUTARY THATCHER B., SANTOS J., SCARPASSA V., RODRIGUES I., SILVA RAFAEL M. (1998). Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59(2):325-335.
- WIDE A.; CAPALDO J.; ZERPA N. Y PABÓN R. (2011). Fundamentos en el diagnóstico y control de la malaria. SIAE "Dr. Arnoldo Gabaldon". Maracay. Estado Aragua. Venezuela.

Muscarinic receptors regulate intracellular cGMP levels at airway smooth muscle.

Marcelo J. Alfonzo^{†1},
Ramona Gonzálezde Alfonzo¹,
Marcelo Andrés Alfonzo González¹,
Itala Lippo de Bécemberg¹
Elizabeth Cardillo²

¹ Sección de Biomembranas. Instituto de Medicina Experimental. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

² Laboratorio de Neuroendocrinología Comparada. Instituto de Medicina Experimental. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. italalippo@gmail.com

ABSTRACT

In this review, we exposed the experimental evidences, related to the cGMP signals, linked to the muscarinic activation of airway smooth muscle (ASM), an essential element in the bronchoconstriction and the remodelling described in asthma and COPD. During this muscarinic activation, two cGMP signals are observed, at 20-s and 60-s, being products of two different muscarinic receptors (mAChRs) associated with two distinctive guanylylcyclases. Thus, the 20-s-cGMP signal involves an M2mAChR inducing a massive and transient $\alpha 1\beta 1$ -NO-sGC translocation from cytoplasm to plasma membranes. Moreover, the 60-s-cGMP signal is associated with a novel G-protein coupled NPR-GC-B. This nano-machine is regulated by mAChRs, in an opposite way, by an M3mAChR coupled to Gq16 to activate NPR-GC-B and an M2mAChR coupled to Go/1 to inhibit this NPR-GC-B. Moreover, M3mAChRs is desensitized by dimerization induced by PKG-II phosphorylation. This phosphorylated-M3mAChR binds muscarinic antagonists rather than muscarinic agonists implying receptor desensitization. Recently, we described a novel PDE1A coupled to M2mAChR to finish these cGMP signal transduction cascades. In ASM cells from rats, M2mAChR displays a novel anti-mitogenic effects suggesting that a possible imbalance between these two M2mAChR/M3mAChR signal cascades can contribute to airway hyperreactivity and the abnormal proliferative ASM responses present in asthma and COPD. In asthma experimental model as OVA-sensitized rats, the muscarinic activation of these ASMC exhibited a dysfunction of these cascades involving two M2mAChR/M3mAChR associated with two distinctive cGMP generators, which has been implied in asthma and COPD, opening ways for the development of novel drugs to treat these human diseases.

Keywords: cGMP; M2mAChR; M3mAChR; PKG-II; NPR-GC-B; NOs GC.

REGULACIÓN POR LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE GMPC EN EL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS

RESUMEN

En esta revisión se presentan evidencias experimentales que relacionan al GMPC con la activación muscarínica del músculo liso de las vías aéreas, elemento esencial en la broncoconstricción y en la remodelación descrita tanto en el asma bronquial como en la enfermedad obstructiva crónica (COPD).

En efecto, durante la activación muscarínica se observan dos señales del

GMPC una a los 20 segundos y otra a los 60 segundos, las cuales son el producto de 2 diferentes tipos de receptores muscarínicos asociados con dos diferentes guanililciclasas.

Esta nanomaquinaria está regulada en forma opuesta por receptores muscarínicos, en forma tal que hay un receptor muscarínico tipo M3 acoplado a una proteína G Gq16 para activar al complejo NPR-GC-B y un receptor muscarínico de tipo M2 acoplado a una Go/1 para inhibir este complejo NPR-GC-B.

Aún más, el receptor M3 es desensibilizado por dimerización inducida por fosforilación a través de una PKG-II., además una nueva fosfodiesterasa PDE1A acoplada al receptor muscarínico M2 con lo cual se finaliza esta cascada de transducción de señales inducidas por el GMPC. Ladsifunción de estas cascadas que involucran a los M2 y M3, implicadas en el asma y en COPD, pudieran ser objeto del uso de nuevas drogas en estas dos patologías humanas.

Palabras clave: Guanosín monofosfato cíclico (cGMP); Receptor muscarínico tipo 2 (M2mAChR); Receptor muscarínico tipo 3 (M3mAChR); Proteín quinasa tipo II (PKG-II); una guanil-ciclasa tipo B sensible al Péptido natriurético (NPR-GC-B); Guanil-ciclasa sensible a óxido nítrico (NO)

INTRODUCTION

The airway smooth muscle tone is mainly regulated by the dominant neuronal pathway under the parasympathetic nervous system control. Acetylcholine (ACh) is released under cholinergic stimulation being the predominant parasympathetic neurotransmitter; acting as an autocrine or paracrine hormone in the airways. The role of ACh in the regulation of bronchomotor tone (bronchoconstriction) and mucus secretion from airway submucosal glands in the respiratory tract is well established (Belmonte, 2005; Van der Velden & Hulsmann, 1999). Muscarinic activation of Airway smooth muscle (ASM) is of major importance to the physiological and patho-physiological actions of acetylcholine, which induces bronchoconstriction, airway smooth muscle thickening, may promoting airway inflammation and remodelling, including airway smooth muscle thickening and the modulation of cytokine and chemokine production by these cells inflammatory (Belmonte, 2005), which may contribute to the pathogenesis and pathophysiology of asthma as reported (Gosens et al., 2006; Racke & Matthiesen, 2004; Racke et al., 2006).

Neurogenic source of ACh has been related to the vagal nerve endings and the Non-neurogenic source of ACh is produced by the non-neuronal cells

and tissues, particularly inflammatory cells and the airway epithelium as reported (Proskocil et al., 2004; Wessler & Kirkpatrick, 2001; Wessler & Kirkpatrick, 2008). Acetylcholine derived from the vagal nerve and from non-neuronal origins such as the airway epithelium acting on muscarinic receptors (mAChRs) anchored at the airway smooth muscle sarcolemma are involved in the generation of a number of signal transducing cascades allowing the activation of the smooth muscle machinery (Challiss et al., 1993). These mAChRs, which are members of the so called G protein-coupled receptors (GPCR) family, which are cell surface receptors, that activate intracellular responses by coupling G proteins to specific effectors (Oldham & Hamm, 2008; Kostenis et al., 1999). Molecular cloning studies have revealed the existence of five mammalian subtypes of muscarinic receptors (m1-m5) (Caulfield, 1993). Airway smooth muscle expresses mRNAs coding for both m2 and m3 receptors (Maeda et al., 1988) being identified using pharmacological ligand binding studies as a mixed population of M2 and M3 subtypes roughly in a 4:1 ratio (Lucchesi et al., 1990; Eglen et al., 1996). It is relevant that the M2 subtype is the most abundant mAChR in airway smooth muscle plasma membranes as reported (Lucchesi et al., 1990; Roffel et al., 1988; Misle et al., 1994; Misle et al., 2001).

M3mAChR represents a primary target of acetylcholine in the airways, which is involved in the regulation of bronchoconstriction (Meurs et al., 1988; Roffel et al., 1988; Eglen et al., 1996; Misle et al., 2001). Classically, M3mAChRs in ASM are coupled to phospholipase C (PLC)/protein kinase C (PKC) pathway via pertussis toxin (PTX)-insensitive G proteins of the Gq/11 family. The contractile response evoked by M3mAChRs stimulation is attributed to the formation of inositol trisphosphate (IP3), the subsequent release of Ca²⁺ from intracellular stores, the additional influx of extracellular calcium, and the Ca²⁺-sensitizing effect of PKC (Grandordy et al., 1986; Meurs et al., 1988; Roffel et al. 1990a; Roffel et al., 1990b).

The stimulation of M2 muscarinic receptors (M2mAChRs) in ASM inhibits adenylyl cyclase via

activation of PTX-sensitive G proteins of the Gi/o family in (Jones et al., 1987; Sankary et al., 1988) and therefore M2mAChRs are thought to counteract relaxation and potentiate smooth muscle contraction (Fernandes et al., 1992). Experimental evidence has been provided that M2mAChRs participate directly in ASM contraction. In this sense, it has been shown that M2mAChRs stimulate Gi/o proteins to released $\beta\gamma$ dimer, which inhibit the Large Conductance Ca^{2+} -activated K^{+} Channel Activity (BK channels), Zhou et al., 2008. The inhibition of BK channel activity favors contraction of ASM and these BK channels are opposed to the M2mAChR-mediated depolarization and activation of calcium channels by restricting excitation-contraction coupling to more negative voltage ranges (Semenov et al., 2011).

In addition, the influence of M2mAChRs to modulate the relaxant effects of atrial natriuretic peptide (ANP) has been reported. Thus, the stimulation of M2mAChRs suppresses ANP-induced activation of particulate guanylyl cyclase via a PTX-sensitive G protein (Nakahara et al., 2002).

In this review, we address the generation of second messengers as cGMP, which is linked to some of the signal transducing cascades activated by M3mAChRs and M2mAChR, at intact Bovine ASM (BASM) strips. Thus, the muscarinic activation of airway smooth muscle (ASM) fragments associated with smooth muscle contraction, displays a kinetic behavior that involves the generation of two cGMP signals, at 20-s and 60-s (Guerra de González et al., 1999) as shown in Figure 1. Thus, the generation of these two signal cGMP are mediated by an M2mAChR coupled to PTX sensitive G-protein inducing the transient translocation of NO-sensitive soluble guanylylcyclases (NO-sGC) (Pláceres-Uray et al., 2010a) from ASM cytoplasm to the sarcolemma to produce the 20 s signal. In the other hand, an M3mAChR coupled to a Gq16 protein acting on the plasma membrane-spanning Natriuretic peptide Receptor Guanylyl Cyclases type B (NPR-GC-B) (Lippo de Bécemberg et al., 1995; Alfonzo et al., 1998a; Alfonzo et al., 1998b; Borges et al., 2001; Alfonzo et al., 2006; Bruges et al.,

2007) to be responsible of the 60 s signal. In addition, both (NO-sGC) and (NPR-GC-B) were evaluated in a broken cell system as plasma membranes fractions isolated from Bovine ASM. These cGMP signal cascades were ended by two ways, one, this second messenger activates a negative feedback mechanism involving a PKG-II-dependent phosphorylation to specifically desensitize M3mAChR (Alfonzo et al., 2013; Alfonzo et al., 2015) the main receptor, involves in ASM contraction. Moreover, to degrade these cGMP signals, a novel mechanism of activation of a PDE1A-coupled to M2mAChR (Alfonzo et al., 2015) is discussed. To establish, the functional relevant of these M2mAChR/NO-sGC and M3mAChR/NPR-GC-B cascades, an additional approach, using Airway Smooth Muscles Cells (ASMC) in culture was

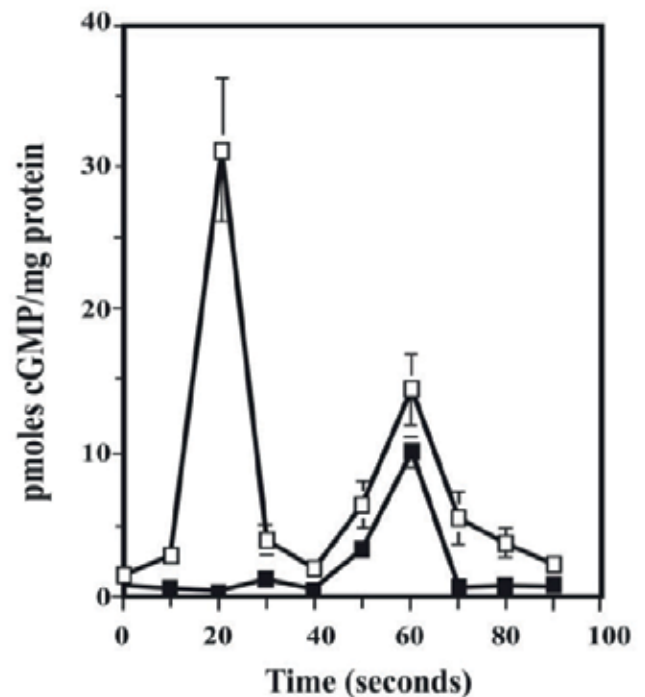


Figure 1.

Time course of cGMP signals induced by muscarinic-agonist-Cch at BASM in the presence of ODQ. Bovine airway smooth muscle (BASM) strips were pre-incubated for 30 min at 37°C with 100 nM ODQ a selective inhibitor of NO-sGC (■) or without ODQ (□). After this time, Cch (1×10^{-5} M) was added and samples were removed at each specific times and processed to determine cGMP as described (Guerra de González et al., 1999). The cGMP and total cellular protein determinations were carried out by triplicate. Each value is the mean \pm SE of 4 different BASM preparations. Taken and modified from (Guerra de González et al., 1999).

performed. This approach allows a new insight into the role of M2mAChR as anti-proliferative agent in ASMC (Pláceres-Uray et al., 2013). Furthermore, the functional roles of mAChRs linked GC systems (M2mAChR/NO-sGC and M3mAChR/NPR-GC-B) were evaluated in ASMC in culture obtained from an asthma experimental model using OVA-sensitized rats. In these experiments, an imbalance in these GC activities expressed as a depressed NO-sGC activity (Pláceres-Uray et al., 2010b) and an hyperstimulation of the M3mAChR/NPR-GC was found (Pláceres-Uray et al., 2011).

1.1. THE M2MACHR/ GI/O PROTEIN /NO-SGC SIGNAL CASCADE.

Until now, the muscarinic activation of BASM is unique biological system described that involves the generation of two cGMP signals as second messengers (Guerra de González et al., 1999; Borges et al., 2001). Interestingly, the 20-s cGMP signal is linked to the onset and the 60s cGMP signal is related to the “plateau” of the airway smooth muscle contraction (Guerra de González et al., 1999). This 20-s signal is also associated with the NO-sGC activity (Pláceres-Uray et al., 2010a) and the second, the 60-s signal, is linked to the activation of a membrane-bound NPR-GC (Lippo de Bécemberg et al., 1995; Alfonzo et al., 1998a;

Alfonzo et al., 1998b; Borges et al., 2001; Alfonzo et al., 2006; Bruges et al 2007), which has been previously characterized at BASM. The details of the activation of an NO-sGC, generating the early 20-s cGMP signal, presents in the plasma membrane of BASM, has been previously reported (Pláceres-Uray et al., 2010a) and further analyzed in this review.

The NO-sGCs are stimulated by a primary and best-studied endogenous activator, which is nitric oxide (NO). The NO-sGC is a heterodimeric hemoprotein formed by two different subunits, α - and β -subunits, which exist in four types ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, and $\beta 2$), each ones being the product of a separate gene (Sharina et al., 2000). Structurally, each subunit consists of N-termi-

nal H-NOX domain, a central domain related to the dimerization, and a C-terminal consensus nucleotide catalytic cyclase domain (Wedel et al., 1995; Derbyshire & Marletta, 2012). For the formation of a catalytically active enzyme, both α - and β -subunits are required (Buechler et al., 1991). Although the $\alpha 1\beta 1$ isoform is ubiquitous, the $\alpha 2\beta 1$ isoform is less broadly distributed (Buechler et al., 1991; Wedel et al., 1995; Derbyshire & Marletta 2012). The best-characterized heterodimers are the $\alpha 1/\beta 1$ and the $\alpha 2/\beta 1$ isoforms (Wagner et al., 2005) being the first ones, relevant in ASM (Pláceres-Uray et al., 2010a). At molecular level, His-105 at the amino terminus of the $\beta 1$ subunit of NO-sGC is the axial ligand of the penta-coordinated reduced iron center of heme, which is required for NO activation (Russwurn et al., 2013).

The first 20-s cGMP signal is a product of NO-sGC linked to M2mAChR coupled to G-proteins sensitive to PTX, which was established with several experimental approaches, as biochemical, pharmacological and molecular biology methods. This statement is supported by the following experimental evidences (Pláceres-Uray et al., 2010a). Thus, in intact ASM strips exposed, to muscarinic agonist (Cch), the isolated plasma membranes fractions from these Cch exposed ASM strips displayed increments in the GC activity at 20s and the 60s. Interestingly, at 20s, there is a peak of GC activity being stimulated in several fold by a NO releasing compound as SNP, but the 60s GC peak was not affected by SNP as shown in Figure 2. These GC activities increments at 20 and 60s coincide, with the two cGMP signals, reported at BASM strips, under agonist exposure (see Figure 1) (Guerra de González et al., 1999).

Additionally, in these plasma membranes isolated from BASM showed that the NO-sGC heterodimer involved is the $\alpha 1\beta 1$. The Western blotting analysis with specific antibodies against all subunits of NO-sGC demonstrate that under muscarinic activation, the $\alpha 1\beta 1$ NO-sGC-heterodimer isoform is translocated from cytoplasm to plasma membranes of BASM are shown in Figure 3. The NO-sGC activities have been also described at plasma membrane from cardiomyo-

cytes (Agulló et al., 2005) and neurons (Bidmon et al., 2006). Moreover, it has been reported that the $\alpha 2\beta 2$ isoform of NO-sGCs at plasma membrane site, may provide a localized pool of cGMP (Agulló et al., 2005; Bellingham & Evans, 2007), which seems to be in similar trend postulated in this review.

Furthermore, these experimental findings

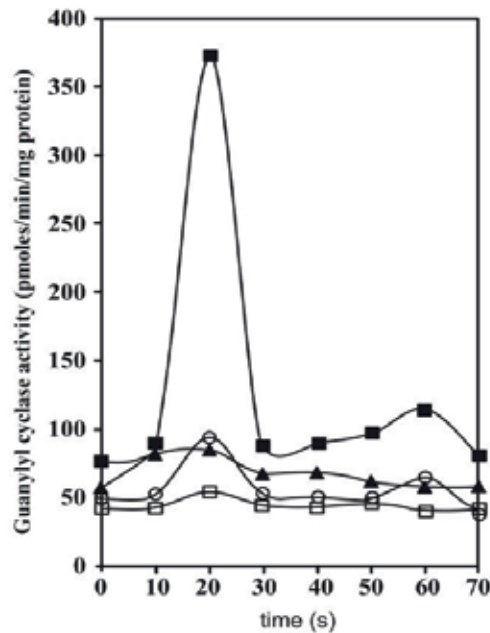


Figure 2

Time-course of guanylyl cyclase activities in plasma membrane fractions isolated from BASM strips under muscarinic agonist exposure. Isolated BASM strips were incubated in the presence and absence of muscarinic agonist Cch for 70 s (Pláceres-Uray et al., 2010a). After each 10 s, the BASM strips were removed and immediately frozen in liquid N₂ and processed to prepare plasma membranes fraction (González de Alfonso et al., 1996). In these membrane fractions, GC assays as cGMP determinations were performed in duplicate as described (Lippo de Bécemberg, 1995). Empty symbols represent basal GC activities. Full symbols represent GC activities in the presence of 100 μ M SNP. Basal (□), muscarinic agonist [Cch 1 \times 10⁻⁵ M] (○), basal plus SNP (▲), and Cch + SNP (■). Each value is the mean of three different BASM strips. Taken from (Pláceres-Uray et al., 2010a).

exhibited in Figure 3 revealed, an interesting fact, which involved the formation of the transient active $\alpha 1\beta 1$ dimer. It can be seen, after muscarinic agonist exposure, that $\alpha 1$ subunits are present, all the time, at the plasma membrane, but, the $\beta 1$ subunit is only present at 20s to form the active $\alpha 1\beta 1$ dimer. The transient formation of $\alpha 1\beta 1$ NO-sGC mechanism can explain the existence of the first 20s cGMP signal observed in intact BASM strips under muscarinic

stimulation as shown in Figure 1.

These experiments were also supported by a series of additional reconstituted experiments using isolated plasma membranes fractions and concentrated cytosol fractions from Bovine ASM (Pláceres-Uray et al., 2010a). In these reconstituted experiments, there is a muscarinic agonist-dependent “incorporation” of NO-sGC to plasma membranes fragments being sensitive to PTX involving a Go/Gi heterotrimeric proteins as previously demonstrated (Pláceres-Uray et al., 2010a). Thus, the $\beta 1$ -sGC subunit of the $\alpha 1\beta 1$ is translocated from cytoplasm to the inner face of the airway smooth muscle sarcolemma under muscarinic activation. Since the capability of this $\alpha 1\beta 1$ -sGC to migrate to plasma membranes under muscarinic activation, a purification procedure and further

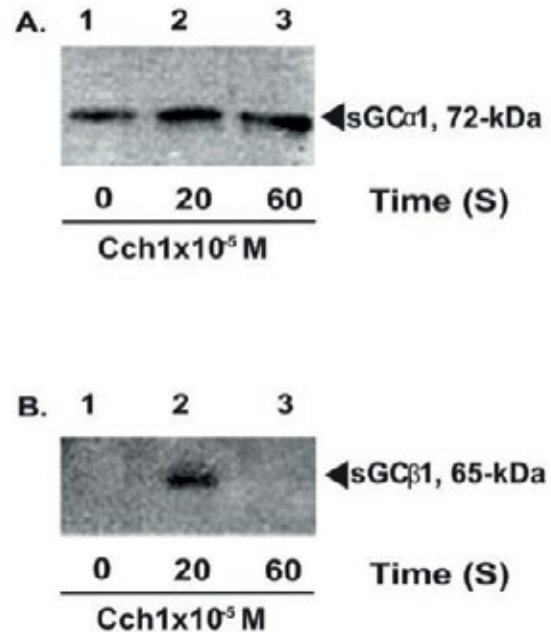


Figure 3.

Western blotting analysis of $\alpha 1\beta 1$ NO-sGC-subunits at plasma membranes from BASM under muscarinic activation (Alfonzo et al., 2013). Identification of $\alpha 1/\beta 1$ sGC heterodimer at plasma membrane fractions isolated from BASM strips under muscarinic agonist exposure. Isolated BASM strips were incubated in KRB at 37°C in the presence of muscarinic agonist CC (1 \times 10⁻⁵ M) during 0, 20 s and 60 s. The samples were immediately frozen and pulverized with a mortar in liquid nitrogen, following the protocols described to isolate plasma membranes fraction (González de Alfonso et al., 1996). These membranes sediments were run in 12% PAGE-SDS, transferred to nitrocellulose membranes, and probed with specific antibodies against the $\alpha 1$, $\alpha 2$, (Panel A) $\beta 1$ and $\beta 2$ (Panel B) of NO-sGC subunits.

identification of this $\alpha 1\beta 1$ -sGC heterodimer was also performed (Pláceres-Uray et al., 2010a). In summary, all these experimental evidences support the rationale that first 20s cGMP signal is a product of a novel signaling cascade involving M2mAChR coupled to Go/i protein, which facilitates the transient formation of the $\alpha 1\beta 1$ -sGC isoform by migration of the $\beta 1$ subunit from cytoplasm to the BASM sarcolemma. All these experimental evidences support a model for a novel signal transducing cascade integrates by the M2mAChR, Gi/o, and the $\alpha 1\beta 1$ heterodimer of sGC as illustrated in Figure 4.

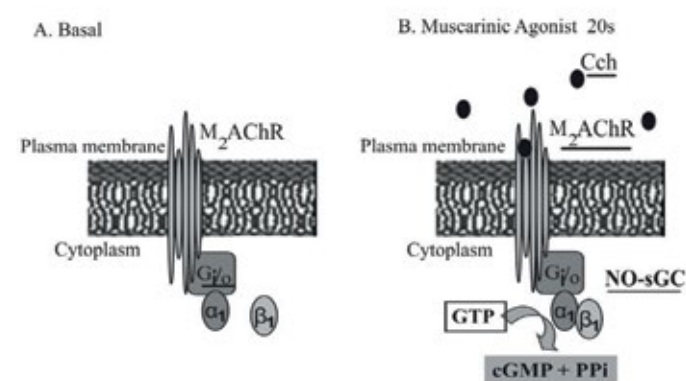


Figure 4.

Model for the novel signal transducing cascade forms by a M2mAChR, Gi/o, and the $\alpha 1\beta 1$ of NO-sGC heterodimer in mammalian cells.

Proposed model for a novel signal transducing cascade in mammalian cells involving three distinct molecular entities: M2mAChR, Gi/o protein, and heterodimer of $\alpha 1\beta 1$ of NO-sGC. (A) Basal condition: The M2mAChR and Gi/o proteins and the $\alpha 1$ subunit of the $\alpha 1\beta 1$ NO-sGC heterodimer is located at the plasma membrane bilayer while the $\beta 1$ subunit of the heterodimer $\alpha 1\beta 1$ NO-sGC is located at the cytoplasm of ASM. (B) Under muscarinic exposure, the agonist (Cch) binds at the extracellular domains of M2mAChR causing the activation of M2mAChR. This induces conformational changes at the M2mAChR cytoplasm domains stimulating a PTX-sensitive G protein (Gi/o), which may facilitate the migration of $\beta 1$ subunit and transient activation of the $\alpha 1\beta 1$ heterodimer NO-sGC resulting in a fast rise in cGMP production, which is related to the 20s cGMP signal generated during the muscarinic activation of airway smooth muscle cell (Guerra de González et al., 1999).

1.2. THE M3MACHR/GQ16NPR-GC-B SIGNAL CASCADE.

The signal transducing cascade involving the macromolecular complex formed by M3mAChR/NPR-GC-B, is responsible for the 60s cGMP signal.

This signal cascade was identified at ASM, using biochemical (Lippo de Bécemberg et al., 1995; Alfonzo et al., 1998a; Alfonzo et al., 1998b; Borges et al., 2001; Alfonzo et al., 2006; Bruges et al., 2007) and molecular biology approaches (Borges et al., 2001). The NPR-GC-B is a membrane-spanning homodimer form, which contains an extracellular ligand-binding, trans-membrane, kinase homology, dimerization and carboxyl-terminal catalytic domains (Koller et al., 1991; Alfonzo et al., 2006). NPR-GC-B is activated by CNP, which exists in 22 and 53 amino acid forms that are structurally similar to ANP and BNP (Suga et al., 1992). NPR-GC-B is abundantly expressed in brain, lung, bone, heart and ovary tissue (Nagase et al., 1997). NPR-GC-B contains three intramolecular disulfide bonds and is highly glycosylated on asparagine residues. Moreover, NPR-GC-B is highly phosphorylated and dephosphorylation is associated with receptor inhibition (Potter & Hunter, 1998).

Furthermore, this form, the NPR-GC-B described in BASM, as a novel G-protein coupled NPR-GC-B (Lippo de Bécemberg et al., 1995; Alfonzo et al., 1998a), which is present in plasma membranes fractions from this smooth muscle subtype (Lippo de Bécemberg et al., 1995; Alfonzo et al., 1998a). This G protein-coupled NPR-GC-B is located in plasma membranes from BASM shows complex kinetics and regulation. NPR-GC-B is activated by natriuretic peptides (CNP-53>ANP-28) at the ligand extracellular domain, stimulated by Gq-protein activators, such as mastoparan, and inhibited by Gi-chloride sensitive, interacting at the juxtamembrane domain. The kinase homology domain was evaluated by the ATP inhibition of Mn²⁺-activated NPR-GC-B, which was partially reversed by mastoparan. The catalytic domain was studied by kinetics of Mn²⁺/Mg²⁺ and GTP, and the catalytic effect with GTP analogues. These results indicate that NPR-GC-B is a highly regulated nano-machinery with domains acting at cross-talk points with other signal transducing cascades initiated by G protein-coupled receptors and affected by intracellular ligands such as chloride, Mn²⁺, Mg²⁺, ATP and GTP. Moreover, this NPR-GC-B

from BASM is regulated, in an opposite way by two MACHRs signaling cascades, acting the M2mACHR as an inhibitor and the M3mACHRs as an activator of this NPR-GC-B (Bruges et al., 2007). This novel signal transducing system forms by M3mACHR, a Gq16 being sensitive by mastoparans to activate NPR-GC-B (Alfonzo et al., 2006; Bruges et al., 2007) is illustrated as a model in Figure 5.

Mastoparans are tetradecapeptides isolated from wasp venom (Hirai et al., 1979; Higashijima et al., 1988), and they are well known as G-protein activators (Higashijima et al., 1990; Shpakov & Pertseva, 2006). These peptides inhibited, in a selective manner, the BASM contraction induced by muscarinic agonist as carbamylcholine (Cch) (Hassan-Soto et al., 2012). Interestingly, the biological responses of classic ASM spasmogens as 5-HT (Shi et al., 2007a), was not affected and a potent contractions were displayed (Hassan-Soto et al., 2012).

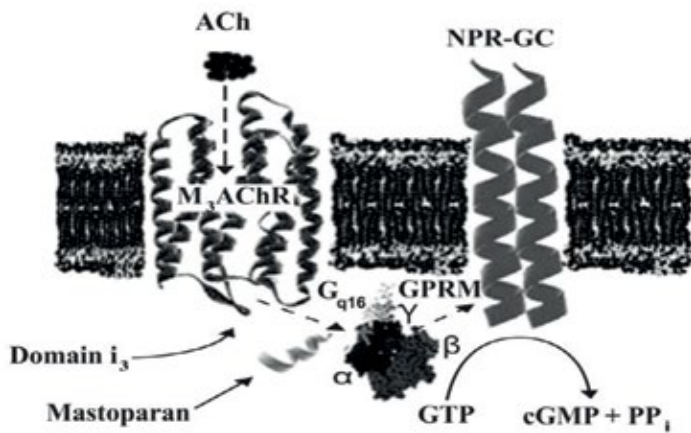


Figure 5.

Schematic model of signal cascade involving M3mACHR/Gq16/NPR-GC-B at ASM. This model is composed of three separate and different molecular entities, M3mACHR, a GPCR seven transmembrane receptor, a heterotrimeric G protein and homodimeric NPR-GC (cGMP producing enzyme) as the effector. The drawings do not take into account the actual structural biology (molecular mass) of these entities; it is a scheme to suggest the flow of information in this signal transducing cascade, which is indicated by the dashed lines. Thus, a muscarinic agonist (ACh) binds at extracellular domains of M3mACHR inducing a conformational change at the cytoplasmic i₃M3mACHR domain, which stimulates the Gq₁₆βγ, releasing active subunits that interact with NPR-GC-B. Mastoparan and its active analogues may interfere at the interactions between i₃M3mACHR domain and the Gq₁₆βγ protein. Taken from (Alfonzo et al., 2006).

These findings can be explained since this bioactive amine has been claimed to exert their physiological effects on ASM through specific GPCRs. These receptors are the 5-HT_{2A}, which induced activation of the Gq/11 protein and its downstream effector phospholipase C (PLC) leading to intracellular phosphatidylinositol turnover and Ca²⁺ mobilization (Shi et al., 2007b). These Gq/11 proteins are mastoparan-insensitive ones. The last facts can explain the mastoparan-insensitivity of the serotonergic transducing cascades at ASM. Furthermore, our results demonstrated that mastoparan inhibits selectively the muscarinic activation without altering other spasmogens transducing cascades at ASM. These experimental results indicate that the most like candidates implicated in mastoparan effects are the heterotrimeric G-proteins coupled to these MACHRs. This mastoparan inhibition on BASM muscarinic activation is mediated through G-proteins altering the generation of the two GMPc signals at 20 s and 60 s under muscarinic agonist exposure (Guerra de González et al., 1999). Mastoparan (50 nM) induced a potent inhibition of these cGMP signals, as shown in Figure 6, that is correlated with a significant reduction on the contractile maximal responses as described (Hassan-Soto et al., 2012). After mastoparan pre-incubation, the kinetics of cGMP intracellular levels at BASM following the muscarinic agonist exposure were evaluated. Interestingly, the first cGMP signal (20s) decreased in more than 60% and the second signal peak (60s) completely vanished. The significant reduction of 20s cGMP signal peak, which appears at the onset of the ASM contraction, may be explained by the effects of mastoparan on the the M2mACHR/ Go/i protein /NO-sGC signal cascade as above discussed. The dramatic disappearance of the second peak of cGMP (60s) is correlated to the ablation of the muscarinic-dependent ASM contraction. This 60s signal is product of NPR-GC-B (Higashijima et al., 1988; Higashijima et al., 1990; Alfonzo et al., 1998) linked to Gq16 protein activation in isolated BASM plasma membranes fraction (Higashijima et al., 1988) indicates that the signal cascade involving

M3mAChR/Gq16/NPR-GC-B is essential for the ASM contractions.

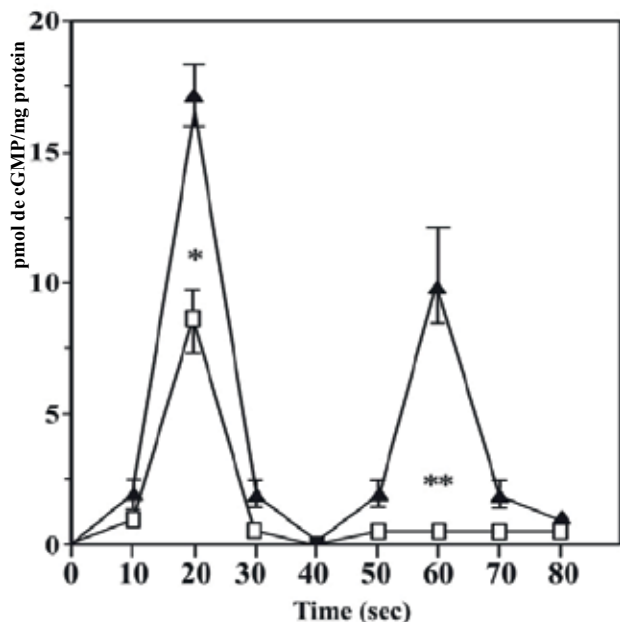


Figure 6.

Mastoparan effect on the time course of cGMP signal peaks induced by muscarinic agonist. BASM strips were assayed as described (Suga et al., 1992). Pre-incubation for 10 min with 50nM mastoparan (□) was performed and Control experiments (▲) without drugs. After this time, muscarinic agonist Cch ($1 \times 10^{-5}M$) was added and the ASM strips were removed and specific times and processed to determine cGMP as described (Alfonzo et al., 2006). Each value is the $X \pm SEM$ of four different BASM preparations, and the cGMP determinations were carried out in triplicate. Statistically significant differences between the Control with respect to mastoparan as indicated with asterisk (*) $p < 0.05$ and (**) $p < 0.001$.

1.3. THE M3MACHR ACTIVITY IS REGULATED BY THE CGMP VIA PKG-II.

MACHRs are able to induce cGMP signals at BASM as above discussed. The possible existence of a cGMP regulatory feedback mechanism on the MACHR activity in the plasma membranes fractions from BASM was studied. To explore this possibility, plasma membranes fraction was employed, as a simpler and reliable biological system, to evaluate the direct effect of cGMP on the M3/M2mAChRs at the plasma membranes instead of intact ASM or isolated cells, which are a more complicated systems due the plethora of regulatory mechanisms associated with cGMP, as an intracellular second messenger, in

a number of physiological functions (Hamad et al., 2003).

The working hypothesis was that muscarinic agonist binds to MACHR inducing its stimulation, which may provoke, some molecular events to guarantee, the activation/termination of these transduction cascades. Plasma membrane possesses some molecular mechanisms for the generation of cGMP linked to activation of MACHRs as above-mentioned. By contrast, to end this muscarinic activation, a MACHR desensitization, via protein phosphorylation has been also described (Hosey et al., 1995; Krupnick & Benovic, 1998; Luo et al 2008).

GPCR phosphorylation-dephosphorylation processes regulate the functional coupling between membrane receptors and G-proteins. Two classes of muscarinic phosphorylations have been reported being the first ones, the G-protein coupled receptor kinases (GRKs) and the G-protein independent kinases phosphorylation. These phosphorylation-dephosphorylation processes of MACHRs change the affinity of this receptor for agonists and antagonists. Thus, muscarinic receptor phosphorylation has being reported by GRKs (Hosey et al., 1995; Debburman et al., 1995; Willets et al., 2001), inducing receptor desensitization, which is initiated by the phosphorylation of serine/threonine residues, which promotes uncoupling the receptor from G protein and terminating signaling (Hosey et al., 1995; Krupnick & Benovic, 1998; Luo et al., 2008). Cyclic GMP can affect the MACHR activities at plasma membrane using the [3H]QNB binding activity (Alfonzo et al., 2013). Thus, cGMP, via PKG-II phosphorylates the M3mAChR at plasma membranes from BASM. This PKG-phosphorylation affects its functionality, which is expressed by an increment in the Bmax for [3H] QNB binding activity and displaying a positive cooperativity close to 2.0 for such binding suggesting a M3mAChR dimer formation as shown in Figure 7. Furthermore, a cGMP-dependent [32P]-phosphorylation was specific for the M3mAChR using immuno-precipitation assays with anti-M3mAChR (Alfonzo et al., 2015). This novel cGMP biological effect is mediated through the activation of

a cGMP-dependent protein kinase (PKG-II) anchored to the plasma membranes fractions from BASM and its existence was also demonstrated (Alfonzo et al., 2013). This [32P]-membrane labeling was affected by muscarinic agonists such as Cch displaying agonist-dependent phospho/dephosphorylation reactions. Conversely, 4-DAMP, a selective M3mAChR antagonist, inhibited both the basal and cGMP-dependent membrane protein [32P]-phosphorylations (Alfonzo et al., 2015) supporting the involvement of an unknown PPase. This last possibility is also strengthened by the fact that okadaic acid (OKA), (a protein phosphatase -PPase inhibitor) induced a faster [3H]QNB binding, strengthening the involvement of a membrane-bound PPase (Alfonzo et al., 2013). It has been claimed that M3mAChR dephosphorylation regulates the receptor interactions with G proteins (Wu et al., 2000). The muscarinic receptor signaling regulator, named SET is a PPase 2A inhibitor, which binds to the C-terminal of the i3-loop- M3mAChR (Simon et al., 2006; Simon et al., 2012) decreasing receptor engagement with G proteins. A recent study indicates that the binding site of both SET and PP2A on M3mAChR occurs at the i3-loop (474ITKRKRMS LIKEKAAQ490). SET specifically binds to the site 476KRKR479 in close vicinity to a domain 484KEKAAQ490 involved in G protein coupling and activation (Wu et al., 2000; Schmidt et al., 2003) and the domain 480MSLIKEK485, is the putative phosphorylation site on PKG-II. Thus, this last domain contains the S481, which is located between these two relevant regulatory binding sites, suggesting an important biological function for this PKG-II action.

It is well established that the M3mAChR activation, is the main molecular event, to initiate the ASM contraction. In this sense, to finish the muscarinic activation of ASM, the M3mAChR must be the molecular entity to be knock-off. Thus, the involvement of PKG-II as a cGMP-dependent M3mAChR phosphorylation, is a novel mechanism, presents in ASM cells, to guarantee a feedback control of cGMP on M3mAChR activation. This post-translational reversible modification at M3mAChRs may act

as a feedback mechanism to terminate the cGMP dependent muscarinic signal transduction cascades at the sarcolemma of BASM as shown and explained in Figure 7.

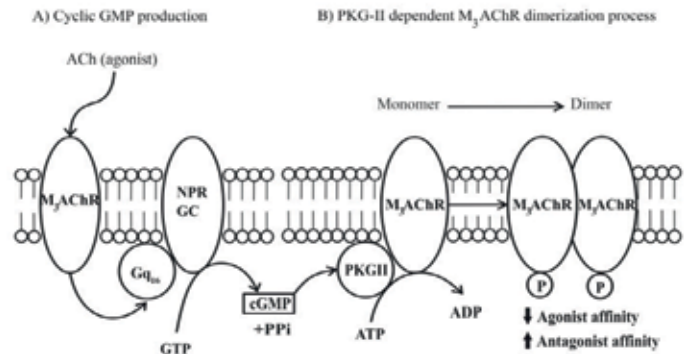


Figure 7. Cyclic GMP induced a PKG-II dependent M3 AChR dimerization and desensitization Proposed model of molecular regulation of M3mAChR induced by PKG-II phosphorylation at plasma membrane from BASM. All molecular components are membrane associated entities. (A) Muscarinic agonist (Acetylcholine) binds to M3mAChR and activates the heterotrimeric Gq16, which stimulates the NPR-GC-B and increases the cGMP production. (B) Cyclic GMP activates the membrane-bound PKG-II and produces the M3mAChR phosphorylation inducing a conformation changes to promote the formation of a M3mAChR dimer, which stabilizes or “freezes” the M3mAChR population, in a “refractory state” to agonist activation, and prone to antagonist binding, which helps to understand the molecular mechanisms of muscarinic antagonist drug action.

1.4. THE M2MACHR LINKED TO A PDE1A ACTS AS A CGMP SIGNAL ENDING CASCADE.

MACHRs are involved in the rise/decline of cAMP/ cGMP levels in ASM (Kamm & Stull, 1989). In isolated BASM strips, a non-selective muscarinic antagonist such as atropine, significantly increased the cGMP and cAMP intracellular levels, in a function of time, being the maximal effects at 15 min, decreasing at longer times, to basal levels in the case of cGMP and remaining higher for cAMP (Mastromatteo-Alberga et al., 2016). This effect was similar to the ones produced by vinpocetine, a specific PDE1 inhibitor (Hagiwara et al., 1984) as shown in Figure 8. The atropine and vinpocetine effects on the cyclic nucleotides (cAMP and cGMP) intracellular levels might be mediated by

the inhibition of a cyclic nucleotide phosphodiesterase (Cyclic PDE-1) in BASM as postulated (Mastromatteo-Alberga et al., 2016). Initially, the existence of an $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ dependent PDE1 (CaM-PDE) in intact BASM was demonstrated using an induced cyclic nucleotides accumulation produced by atropine followed by KCl depolarization of BASM strips (Perez & Sanderson, 2005), which produced a fast decline in both cyclic nucleotides levels as the result of CaM-PDE1 activation (Mastromatteo-Alberga et al., 2016). The PDEs are enzymes that hydrolyze cyclic nucleotides (cGMP, cAMP) to the inactive linear form (5-GMP, 5-AMP), thereby regulating both the duration and the amplitude of cyclic nucleotide signaling. It is possible that KCl induces membrane depolarization and initiates a Ca^{2+} influx, through the opening of L-type Ca^{2+} channels located at BASM sarcolemma increasing the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and the active CaM levels (Perez & Sanderson, 2005) producing the activation of the BASM contraction machinery (Simon et al., 2006) and the PDE1s (Sharma et al., 1980; Charbonneau, 1990).

It has been reported that ASM exhibits $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ dependent PDE1s (CaM-PDE 1) that hydrolyze cAMP and cGMP with equal capacity (Beavo, 1988; Torphy & Cieslinski, 1990; Shahid et al., 1991). This is the main reason to consider this PDE 1 family as the target of atropine and vinpocetine actions because both drugs increased the cAMP and cGMP levels as discussed.

CaM-PDEs are mediators between the Ca^{2+} and cyclic nucleotides second messenger allowing cyclic nucleotide-dependent processes to be regulated by $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Beavo, 1995) PDE1 family has three genes (PDE1A, PDE1B, and PDE1C) (Beavo, 1995; Sonnenburg et al., 1995). This PDE1 from BASM was identified as a vinpocetine and atropine-sensitive PDE being located at plasma membranes of this smooth muscle subtype (Mastromatteo-Alberga et al., 2016). At this plasma membrane fraction, the muscarinic receptor involves, in this muscarinic antagonist inhibition, was identified as an M2mAChR (Misle et al., 1994; Misle et al., 2001) as shown in Figure 9. This PDE1 was inhibited by muscarinic antagonists acting on M2mAChRs at the sarcolemma from BASM (Mastromatteo-Alberga

et al., 2016). Thus, methoctramine (M2mAChR selective antagonist) (Michel & Whiting, 1988) was more effective than 4-DAMP (an M3mAChR selective antagonist) (Michel et al., 1989) inhibiting this membrane-bound PDE1A. The inhibitory concentration IC_{50} for methoctramine, ($\text{IC}_{50} = -8.12 \pm 0.21$) and for 4-DAMP, ($\text{IC}_{50} = -6.68 \pm 0.13$). This pharmacological profile belongs to an M2mAChR (Misle et al., 1994). ASM displays a mixed population of M2 and M3 subtypes (Eglen et al., 1996) being the M2 subtype, the most abundant at BASM (Misle et al., 1994; Misle et al., 2001). In addition, the isolation and purification of this plasma membrane-bound PDE1 was characterized as a vinpocetine-inhibited and CaM-stimulated PDE activity (Sharma et al., 1980) with MW of 58 kDa and identified by Western blotting as PDE1A as described (Mastromatteo-Alberga et al., 2016).

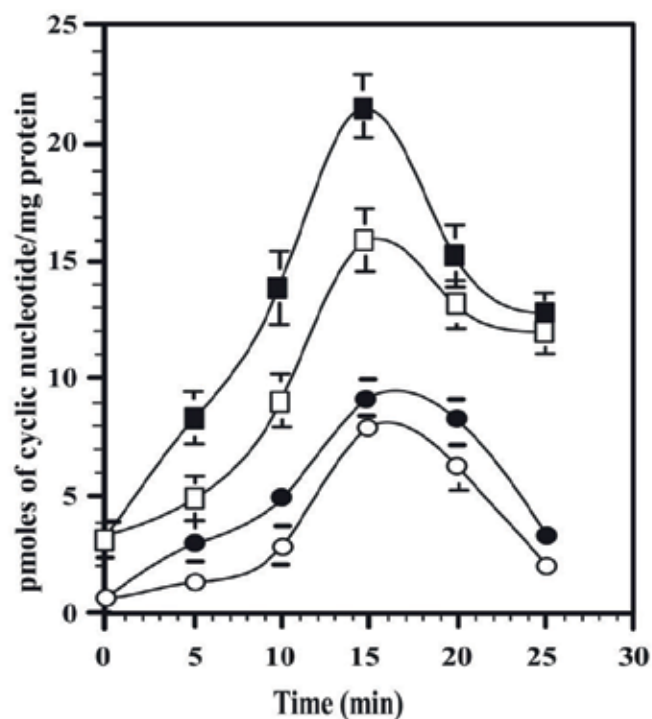


Figure 8.

The time course of vinpocetine and atropine on the cyclic nucleotides levels at BASM. Bovine ASM were incubated at different times in the presence of 20 μM vinpocetine (■,●) and 10 μM atropine (□,○) as described (Mastromatteo-Alberga et al., 2016). The squares symbols denote cAMP and the circles symbols are the cGMP tissue levels. Each value is the mean \pm S.E.M. of three different BASM preparations and the cyclic nucleotides were determined by triplicate. Taken from (Mastromatteo-Alberga et al., 2016).

It is well established that M2mAChRs participate directly in ASM contraction, via Gi/o proteins (Jones et al., 1987; Sankary et al., 1988; Fernandes et al., 1992; Nakahara et al., 2002; Zhou et al., 2008; Semenov et al., 2011; Pláceres-Uray et al., 2010a). However, our experimental data provided by the muscarinic-antagonists inhibition of PDE1A at plasma membranes from BASM, which took place in the absence of GTP or analogs, suggesting a direct coupling mechanism between M2mAChR and this PDE1A (Mastromatteo-Alberga et al., 2016). In this sense, a direct coupling mechanism between the M2AChR and the target enzyme has been demonstrated for other GPCR, as a direct interaction between the M3mAChR, and its effector enzyme PLC β 3 (Kan et al., 2014). All these experimental evidences support a model for the interaction of M2mAChR and PDE1A illustrated in Figure 10.

In summary, we provide evidence that the molecular signal transducing functional machinery named

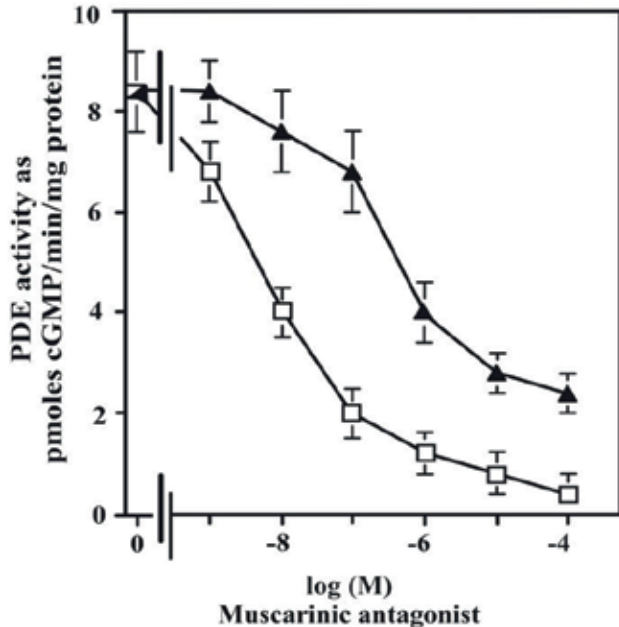


Figure 9. Effect of muscarinic antagonists on the PDE1 activity at plasma membranes fraction. Plasma membranes from BASM (20–30 μ g membranes protein) fractions were incubated with [3H] cGMP as PDE substrate as described (Mastromatteo-Alberga et al., 2016). A dose titration curve of muscarinic antagonists such as methoctramine (□) and 4-DAMP (▲) were performed. Data are the mean \pm SE of three (3) different plasma membranes from BASM preparations. Taken from (Mastromatteo-Alberga et al., 2016).

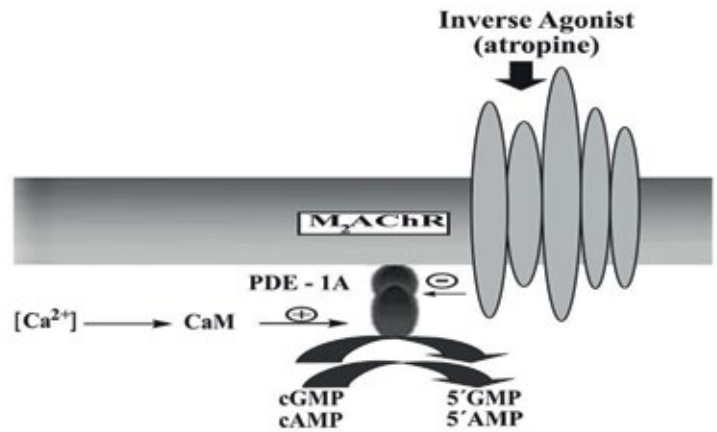


Figure 10. A model of a novel transducing cascade integrated by an M2mAChRs and the PDE1A. This model of a signal transducing pathway of the airway smooth muscle (ASM) proposes that muscarinic agents (antagonists) acting as “inverse agonists” bind to the M2mAChR located to ASM sarcolemma, which induces the inhibition of a plasma membrane-bound PDE1A, which is vinpocetine-inhibited and CaM stimulated enzyme. This last PDE1A inhibition can increase the cGMP/cAMP intracellular levels, inducing ASM relaxation.

“signalosomes”, one comprising by M3mAChRs, NPR-GC-B, PKG-II and the second ones, the M2mAChRs linked to cGMP-PDE 1A, which are located at the plasma membrane of BASM (Mastromatteo-Alberga et al., 2016).

1.5. M2MACHR ACTS AN ANTI-MITOGENIC RECEPTOR IN RAT AIRWAY SMOOTH CELLS IN CULTURE.

The airway structural changes play an important role in the development of the airway hyperresponsiveness presents in asthma. Furthermore, the remodeling of the airways is a relevant process in asthma, being the most important feature the hyperplasia (proliferation) of smooth muscle (Gosens et al., 2007; Kistemaker et al., 2012). The role of these MACHRs and their signal transducing cascades in airway smooth cell proliferation studies were performed in rat ASMC. Initially, we explored the effect of muscarinic agonist, carbamylcholine (Cch) on cell proliferation as described (Pláceres-Uray et al., 2010a). Fetal Bovine Serum (FBS) increased rat ASMC proliferation, being significant at 48 and 72 hr as shown in Figure 11. However, muscarinic agonist Cch, in a dose dependent manner, decreases

the ASMC proliferation induced by 10% FBS (Figure 11). Thus, a dose dependent inhibitory effect on ASMC proliferation by Cch was significant at 48 and 72 hrs. Proliferation inhibition was not due to death cell because ASMC viability (90-95%) in presence of Cch was confirmed with blue dye exclusion method (Pláceres-Uray et al., 2010b).

Trying to understand this novel finding on the ability of muscarinic agonist (Cch) to exhibit anti-proliferative properties especially at high mitogen concentration (10% FBS); the identification of the mAChR involved in this inhibitory effect was relevant. Thus, a pharmacological approach was performed

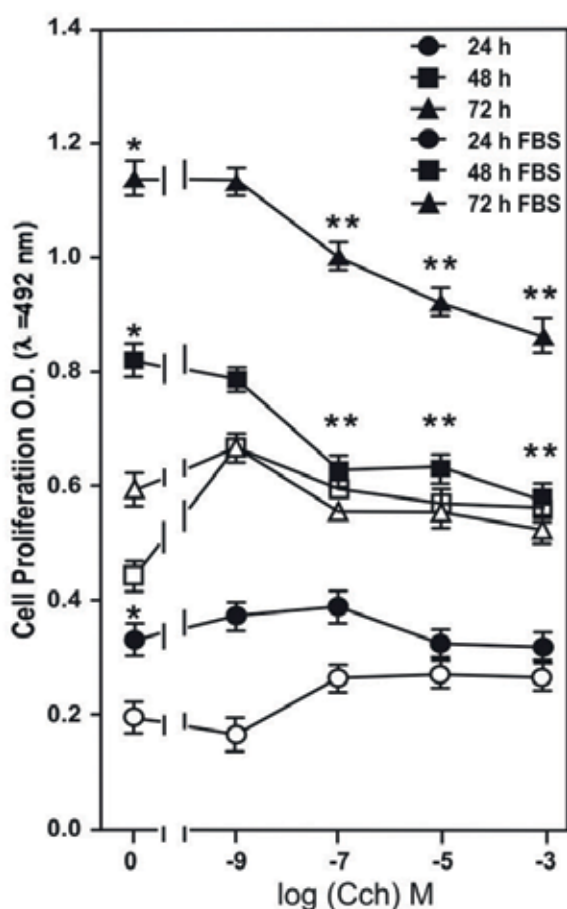


Figure 11.

Rat ASMC proliferation responses to muscarinic agonist [Cch] concentrations. ASMC (1×10^3 cells/well) were cultured in 96 wells plates with increasing concentration of muscarinic agonist Cch in medium without FBS during 48 (□), 72 (Δ), and 10% FBS, during 48 (■), y 72 (▲) hrs. Cell proliferation was determined using a colorimetric method (MTS-PMS), measuring O.D at $\lambda = 492$ nm. Data are the mean \pm SE of $n = 6$ experiments for triplicate. Mitogen responses at 48 and 72 h by 10% FBS vs. basal was significant (*) $p < 0.05$. The inhibitory effect of Cch (-7, -5, -3) vs 0 Cch was significant (**) $p < 0.05$.

using selective muscarinic antagonists, such as 4-DAMP (for M3mAChR) and AF-DX-116-DS (for M2mAChR). It was found, this anti-mitogenic Cch effect was reversed, in a dose dependent manner, by the selective muscarinic antagonists as AF-DX-116 (M2mAChR antagonist) (Gosens et al., 2004), which was more efficient than 4-DAMP (M3mAChR antagonist) (Michel et al., 1989) to reverse this novel Cch inhibition activity as shown in Figure 12. The proliferative stimulatory responses displayed by muscarinic antagonists reversed significantly the anti-mitogenic Cch (1×10^{-5} M) action ($p < 0.05$). Thus, the log $IC_{50} \pm SE$ for AFDX-116-DS = -9.40 ± 0.37 and 4-DAMP = -7.11 ± 0.71 were estimated. The difference between these log IC_{50} values is more than 2 orders of magnitude, that support a pharmacological profile of AFDX 116 \gg 4-DAMP, which clearly belongs to an M2mAChR (Misle et al., 1994; Misle et al., 2001).

In normal rat ASMC, the exposure to 10% FBS, produces a mitogen-induced proliferation, which was inhibited by muscarinic agonist, via an M2mAChR as above discussed. It is well known that asthma and COPD exhibit an “inflammatory environment”, rich in ASMC mytogens (Barnes, 2008). Interestingly, it has been reported that in murine (BALB/c mice) models of chronic asthma, sensitized and challenged to ovalbumin, the expression of the M3mAChR was inhibited and M2mAChR was elevated by the administration of tiotropium bromide (Kang et al., 2012). It is well known that anticholinergic drug (tiotropium bromide) (Kang et al., 2012; Busse et al., 2016), which selectively antagonizes the M3mAChR subtype, could be beneficial in attenuating airway remodeling in chronic asthma. These findings on the ability of M2mAChR to be an anti-mitogenic receptor, can explain these experimental findings of tiotropium bromide (Kang et al., 2012) and open new avenues for drug design to treat these chronic inflammatory respiratory diseases such as asthma and COPD (Kang et al., 2012; Busse et al., 2016; Kang et al 2012).

The molecular mechanisms involved in these novel M2mAChR anti-proliferative effects are unknown. However, the involvement of M2mAChR,

in molecular mechanisms, related to cell growth or regression has been claimed (Nicke et al., 1999).

It has been demonstrated that the activation of M2mAChR inhibits cell growth and survival in human

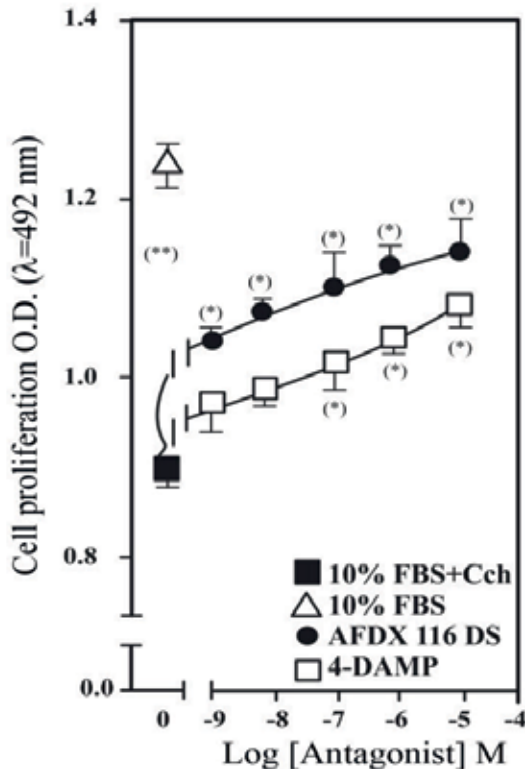


Figure 12. Effect of selective muscarinic antagonists AF-DX-116 (M2mAChR) and 4-DAMP (M3mAChR) on normal ASMC proliferation. Rat ASMC (1×10^3 cells/well) were cultured in 96 wells plates for 72 hrs and expose to increasing concentrations of AF-DX-116 and 4-DAMP on the anti-proliferative effect induced by Cch (1×10^{-5} M), in presence of 10% FBS. Cell proliferation was determined using a colorimetric method (MTS-PMS), measuring O.D at $\lambda = 492$ nm. (n = 5, for triplicate). The muscarinic antagonists stimulatory proliferative responses were significant (*) $p < 0.05$ against the anti-proliferative Cch (1×10^{-5} M). (**) $p < 0.05$ for the Cch inhibition vs 10% FBS proliferation activity.

glioblastoma cancer stem cells. (Alessandrini et al., 2015). In urothelial bladder cancer cells similar findings have been reported (Pacini et al., 2014). This muscarinic agonist inhibition mechanism of ASMC proliferation may be the result of the cGMP/PKG activation cascade signaling pathways (Gilotti et al., 2014). It is our interest the cGMP/PKG transducing cascade, in BASM. It is known that muscarinic agonists (Cch) rise the cGMP levels generating two cGMP signals, the first (20s) as a product of M2mAChR /NO-sGC

coupling mechanism described (Guerra de González et al., 1999). This NO-sGC is an enzyme highly expressed in the lungs (Papapetropoulos et al., 2006). However, it has been claimed that excessive NO production that occurs in asthma induces a down-regulation of NO-sGC (Pláceres-Uray et al., 2010b; Papapetropoulos et al., 2006). The second signal cGMP (60s), is produced, via the M3mAChR /Gq16 protein/NPR-GC-B cascade (Lippo de Bécemberg et al., 1995; Alfonso et al 1998a; Alfonso et al 1998b; Borges et al., 2001; Alfonso et al., 2006; Bruges et al., 2007). Thus, the M2mAChR/Go/i /NO-sGC and the M3mAChR /Gq16 protein/NPR-GC-B cascades produce cGMP, which can activate the cyclic GMP-dependent protein phosphokinases (PKG), which can exist as two isoenzymes termed PKG-I and PKG-II (Lohmann et al., 1997; Francis et al., 2010). These PKGs can phosphorylate transcription factors associated with inhibition of gene expression that promote cell cycle, also induce increment of proteins that leads cell cycle arrest as p21Cip1/Waf1 converting the PKG, as an anticancer promising signal cascades (Cen et al., 2008). In this sense, it has been claimed that PDE5 inhibitors, that increased the cGMP levels, have anticancer activities express as anti-proliferative mechanisms in multiple carcinomas. Thus, these compounds reduced the protein expression of cyclin D1, while p21 protein expression was increased. Furthermore, it has been found that PKG β being responsible for the anti-proliferative effects (Ren et al., 2014).

It is possible that these signal cascades may be involved in this anti-mitogenic effect of M2mAChR. Actually, the specific molecular mechanisms linked to the anti-mitogenic M2mAChR responses are under intense research.

1.6. THE M2MACHR/NOSGC CASCADE IS DEPRESSED WHILE M3MACHR/NPR-GC-B CASCADE IS ENHANCED IN RAT ASTHMA MODEL.

It has been claimed that a dysfunction of the MACHR signal transducing cascades has been implied in the pathophysiological mechanisms of asthma (Gosens et al., 2004; Racke & Matthiesen, 2004;

Belmonte, 2005; Gosens et al., 2006; Gosens et al., 2007; Kistemaker et al., 2012) and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) (Racke & Matthiesen, 2004; Gosens et al., 2006). The pathophysiological relevance of the signal transducing cascades here described as the M2mAChR/NOsGC and the M3mAChR/NPR-GC-B, were evaluated in ASMC from a murine (rat) chronic asthma model (Vanacker et al., 2001). This is a murine experimental model of allergic asthma, is induced by long exposure to ovalbumin (OVA), which mimics several of the central hallmarks of human bronchial asthma including airway hyperresponsiveness and immune cell lung infiltration (Vanacker et al., 2001).

The muscarinic receptor (M3mAChR/M2mAChRs) expression levels in ASM determined by radioligand binding were not significantly different from normal and asthmatic patients or animal asthma models. These facts conduce to evaluate the guanylylcyclases activities linked to these receptors, by the cGMP production, which may relevant to ASMC proliferation. Accordingly, the NOsGC linked to M2mAChR and the NPR-GC-B associated to M3mAChR were determined, in CD rat ASMC from CONTROL and a murine experimental model of allergic asthma induced by long exposure to ovalbumin (OVA).

Cultured Airway Smooth Muscle Cells (ASMC) from CONTROL and OVA-CD rats were used to determine the cGMP production under the exposure to muscarinic agonists (Cch) (Alfonzo et al., 1998a; Alfonzo et al., 1998b; Guerra de González et al., 1999; Bruges et al., 2007), an inhibitor of NO-sGC (ODQ) (Wedel et al., 1995; Pláceres-Uray et al., 2010b; Pláceres-Uray et al., 2011; Derbyshire & Marletta, 2012; Russwurm et al., 2013) and the natriuretic peptide (CNP) to stimulate the NPR-GC-B (Koller et al., 1991; Borges et al., 2001; Alfonzo et al., 2006; Bruges et al 2007).

It can be seen in Figure 13 that OVA-ASMC showed low basal cGMP production compared to CONTROL ASMC as previously reported (Pláceres-Uray et al., 2010b). Thus, these basal GC activities were, more than 50% sensitive to ODQ, indicating that NO-sGCs

are present in these ASMC. It has been reported that the bronchoconstriction observed in asthma is accompanied by changes in NO-sGC activity possibly due to substantial reduced sGC expression reflected in decrease the steady state levels of sGC subunit mRNAs and protein level expression, as found in intact lung tissue from OVA-sensitized mice (Papapetropoulos et al., 2006).

The muscarinic agonist (Cch) increased the cGMP intracellular levels in all ASMC, which were also inhibited more than 50% by ODQ. Specifically, in the OVA-ASMC, CCh increased 3.5 fold the GC activity being 1.5 fold in the CONTROL-ASMC. These results in ASMC confirmed all previous experimental findings on the ability of muscarinic agonists to increase the cGMP intracellular levels as reported in isolated ASM strips (Katsuki & Murad, 1977; Guerra de González et al., 1999). Interestingly, CNP (activator of NPR-GC-B) stimulate (> 2 fold) the GC activity in CONTROL ASMC while in the OVA ASMC was > 3.0 fold. However, ODQ potentiated the CNP activation in the OVA-ASMC suggesting that NO-sGC may regulate the NPR-GC-B.

A relevant finding in this work was that CNP and Cch act synergistically, and this combination displays the maximal GC activity in cultured ASMC. Thus, this synergistic effect was more significant (> 6.0 fold) on the OVA-ASMC. In addition, ODQ inhibited this CNP plus CCh effect, in about 25% (NO-sGC), in both cells types (Figure 13). One possible explanation for this synergistic effect is related to the property of the G-protein coupled NPRGC-B nano-machine described in BASM, that possess an intracellular domain named as the G-protein regulatory module (GPRM) (Alfonzo et al. 2006), in which, molecular components or events coming from the M3mAChR/Gq16 activated cascade by muscarinic agonist (Cch), can potentiate or facilitate the CNP activation of the NPR-GC-B, which occurs at the extracellular domain (Koller et al., 1991; Suga et al., 1992; Borges et al., 2001; Alfonzo et al., 2006; Brown et al., 2013).

Due to the important finding that the Cch and CNP act synergistically, the M3mAChR/G-protein/NPR-

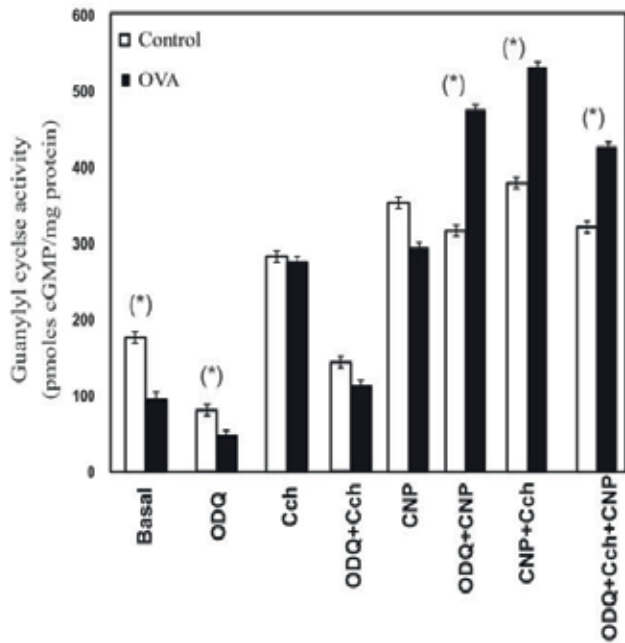


Figure 13.

Guanylylcyclase activities in ASMCs from CONTROL and OVA-sensitized rats. The ASMCs were incubated for 15 min in the presence of IBMX (100 μ M) and ODQ (100 nM), Cch (1x10-5M), CNP (1x10-7M) as described (Pláceres-Uray et al., 2010b). The cGMP produced was estimated in duplicate using a radioimmunoassay kit from GE/Amersham. Each value is the mean + of 5 different experiments. In both groups, the number of cell culture plates was obtained for a pool of 5 rats. The statistical significance between CONTROL versus OVA cells was established as (*) $p < 0.05$.

GC-B cascade on the ASM was profoundly studied (Lippo de Bécemberg et al., 1995; Alfonzo et al., 1998a; Alfonzo et al., 1998b; Borges et al., 2001; Alfonzo et al., 2006; Bruges et al., 2007). Consequently, the effect of several activators of this G-protein coupled NPR-GC-B such as natriuretic peptides (CNP) and mastoparans (G-protein activator specially Gq16) were evaluated as previously described in BASM (Lippo de Bécemberg et al., 1995; Alfonzo et al., 1998a; Alfonzo et al., 1998b; Borges et al., 2001; Alfonzo et al., 2006; Bruges et al., 2007; Gosens et al., 2007).

It can be seen in Figure 14 that the CNP stimulated GC activity was more than 3 times in OVA-ASMC and 1.5 times in Control-ASMC indicating that NPR-GC-B was present in Control and OVA-ASMC, which are similar behavior described in plasma membranes preparations from ASM cells (Lippo de Bécemberg et al., 1995; Alfonzo et al., 1998b; Alfonzo et al., 2006). The muscarinic agonist (Cch) increased in 1.3

times, the Control ASMC GC activity while increased 2.2 times in OVA-ASMC. Thus, the OVA-ASMC in comparison to Control ASMC showed a more significant stimulation by these NPR-GC-B activators. Interestingly, the combination of (Cch plus CNP) increased in more than 6 times the OVA-ASMC-GC activity being only 1.5 times in Control ASMC. As expected, mastoparan, an activator of NPR-GC-B, via Gq16 (Bruges et al., 2007; Hassan-Soto et al., 2012) dramatically increased in 6 times, the OVA-ASMC-GC activity and 1.5 times in Control-ASMC (Alfonzo et al., 2006; Bruges et al., 2007). However, at OVA-ASMC, Cch did not affected the hyperstimulation induced by mastoparan. However, the combination of CNP and mastoparan rendered in a reduction of the NPR-GC activation at OVA-ASMC. These data showed for the first time that there is a hyperstimulation of M3mAChR/Gq16/NPR-GC-B cascade in ASMC from an experimental asthma model (Pláceres-Uray et al., 2011), which support the classic statement that ACh

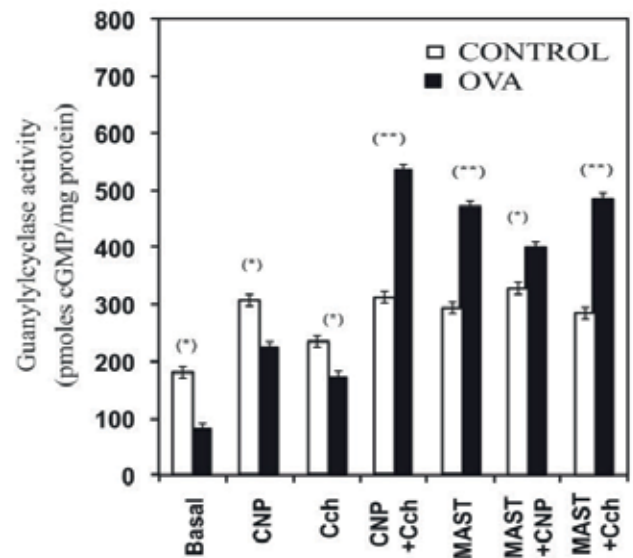


Figure 14.

M3AChR/NPR-GC-B activity in ASMCs from CONTROL and OVA-sensitized rats. The ASMCs were incubated for 15 min in the presence of IBMX (100 μ M) and Cch (1x10-5M), CNP (1x10-7M) and Mastoparan (MAST) (1x10-7M) and different combinations. The cGMP produced was estimated in duplicate using a radioimmunoassay kit from GE/Amersham. Each value is the mean + of 5 different experiments. In both groups, the number of cell culture plates was obtained for a pool of 5 rats. The statistical significance between CONTROL versus OVA was established as $p < 0.05$ (*).

mediates airway smooth muscle (ASM) contraction primarily the activation of M3mAChRs (Roffel et al., 1988; Eglen et al., 1996; Misle et al., 2001; Belmonte, 2005; Gosens et al., 2006; Brown et al., 2013).

Taking together all these results indicate that the ASMC from OVA-sensitized rats express a reduced NO-sGC activity and a hyperstimulation of M3mAChR/Gq16/NPR-GC-B cascade. The imbalance between these two signal transducing cascade, one of them regulated by M3mAChR/Gq16/NPR-GC-B cascade can contribute to airway hyperreactivity to muscarinic agonists and it might be implicated in the Ach linked hyperplastic and remodeling smooth muscle responses present in asthma and COPD (Kistemaker & Gosens, 2015).

Consequently, this work opens new pharmacological and therapeutical approaches for the treatment of these chronic respiratory diseases, such as asthma and COPD, in which, the ASM is involved.

CONCLUSION

This review discussed the recent experimental findings about the role of muscarinic receptors and in regulating the function of cGMP at ASM, in normal and “pathological” conditions as asthma. The population ratio of M2mAChRs/ M3mAChRs at ASM is 4:1. This fact may help to understand the existence of three “muscarinic signal transducing signalosomes”: One comprised by M3mAChR/Gq16/NPR-GC-B; PKG-II located in the plasma membrane of ASM and the second ones formed by M2mAChRs, NO-sGC and transient location at the plasma membrane of ASM and the third, the novel M2mAChRs coupled to PDE1A. These three signalosomes regulate a “sarcolemma-associated cGMP pool” (Caulfield, 1993; Challis et al., 1993; Kostenis et al., 1999; Wessler & Kirkpatrick, 2001; Proskocil et al., 2004; Oldham & Hamm, 2008; Wessler & Kirkpatrick, 2008) as second messenger, which streams down to activate a membrane-bound PKG-II, which then phosphorylates the M3mAChR at the i3-loop extending from Thr450-Q490, inducing the desensitization of this M3mAChR subtype, in a feedback mechanism at plasma membrane level

(Lucchesi et al., 1990). The M3mAChR, a prototypic class A GPCR, which preferentially couples to the family of G proteins, is involved in numerous important physiological functions in ASM. Interestingly, M3mAChR in ASM, is involved in the cholinergic tone, which contributes to airflow obstruction and chronic airway inflammation in asthma and COPD. It is known that anticholinergics are effective bronchodilators by blocking this M3mAChR subtype but also increased the expression of M2mAChR (Shi et al., 2007a).

In the other hand, the M2mAChRs, NO-sGC “muscarinic signal transducing signalosome is involved in the generation of cGMP signal at the plasma membrane level, which is independent of the presence of NO, classic activator of this NO-sGC. Moreover, M2mAChRs is linked to two novel signal transducing signalosomes, one involves the direct coupling of this receptor subtype to a PDE1A, to hydrolyze the cGMP, and in this way to end this second messenger. The last one, is an unknown anti-mitogenic signal cascade that connect M2mAChRs to the nuclear machinery probably the regulation of the intracellular signaling pathways: 1) The cGMP/PKG activation cascade, and 2) MAPK activation: p38 MAPK and JNK cascade to control the nuclear machinery by blocking the cell cycle and in this way, act as anti-mitogenic in the ASM cells, which is relevant process in the airway remodeling presents in asthma and COPD. The molecular components of the last signal cascade are unknown.

Thus, understanding, how the M3mAChR and M2mAChRs work at the molecular level is of considerable relevance for designing novel classes of drugs that can modulate M3mAChR and M2mAChR functions, which may be significant for therapeutic purposes in pathological conditions such as asthma and COPD.

LIST OF ABBREVIATIONS

ASM: Airway Smooth Muscle, ODQ:(1H-[1, 2,4] Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one), COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease, M3mAChR: muscarinic receptor subtype 3, and M2mAChR: muscarinic receptor subtype 2, PDE: Cyclic nucleotide phosphodiesterase, cGMP: cyclic Guanosine monophosphate, PKG: cGMP dependent protein kinase, NPR-GC: Natriuretic Peptide sensitive guanylyl cyclase type B, NO-sGC NO sensitive soluble guanylyl cyclase, Cch Carbamylcholine, GPCR G protein coupled receptor, Gq16 Heterotrimeric G q16 protein.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from CDCH-UCV # PG 09-8629-2013/2 (to ILB). The authors thank Dr Coral Wynter for revision of the English version of this manuscript.

REFERENCES

- AGULLÓ, L., GARCÍA-DORADO, D., ESCALONA, N., RUÍZ-MEANA, M., MIRABET, M., INSERTE, J., SOLER-SOLER, J (2005). Membrane association of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase in cardiomyocytes. *Cardiovas Research*. 68(1):65-74.
- ALESSANDRINI, F., CRISTOFARO, I., DI BARI, M., ZASSO, J., CONTI, L., TATA, AM (2015). The activation of M2 muscarinic receptor inhibits cell growth and survival in human glioblastoma cancer stem cells. *Int Immunopharmacol*. 29(1): 105-9.
- ALFONZO, M. J., GUERRA, L., SÁNCHEZ, S., FRANCIS, G., MISLE, A., NAPOLEÓN, V., GONZÁLEZ DE ALFONZO, R., LIPPO DE BÉCEMBERG, I (1998a). Signal transduction pathways through mammalian guanylyl cyclases. In *New Advances in Cardiovascular Physiology and Pharmacology*. M. Velasco and R. Hernández, editors. Elsevier, Amsterdam, 147-175.
- ALFONZO, M.J., LIPPO DE BÉCEMBERG, I., SÁNCHEZ DE VILLARROEL, S., NAPOLEÓN DE HERRERA, V., MISLE, A.J., GONZÁLEZ DE ALFONZO R (1998b). Two opposite signal transducing mechanisms regulate a G-protein-coupled guanylyl cyclase. *Arch Biochem Biophys*. 350(1):19-25.
- ALFONZO, M.J., PEÑA DE AGUILAR, E., GUEVARA DE MURILLO, A., SÁNCHEZ DE VILLARROEL, S., GONZÁLEZ DE ALFONZO, R., BORGES, A., LIPPO DE BÉCEMBERG, I. (2006). Characterization of a G protein-coupled guanylyl cyclase-B receptor from bovine tracheal smooth muscle. *J Recept Signal Transduct Res*. 26(4):269-297.
- ALFONZO, M.J., GONZÁLEZ DE ALFONZO, R., ALFONZO GONZÁLEZ, M.A., LIPPO DE BÉCEMBERG, I (2013). Cyclic GMP regulates M(3)AChR activity at plasma membranes from airway smooth muscle. *Mol Membr Biol*. 30(8):403-17.
- ALFONZO, M.J., GONZÁLEZ DE ALFONZO, R., ALFONZO GONZÁLEZ, M., LIPPO DE BÉCEMBERG, I (2015). Muscarinic drugs regulate the PKG-II-dependent phosphorylation of M3 muscarinic acetylcholine receptors at plasma membranes from airway smooth muscle. *J Recept Signal Transduct Res*. 35(4):319-28.
- BARNES, P.J (2008). Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*. 8(3):183-92.
- BEAVO, J.A (1988). Multiple isozymes of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. 22:1-38.
- BEAVO, J.A (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev*. 75(4):725-48.
- BELLINGHAM, M., EVANS, T.J (2007). The alpha2beta1 isoform of guanylyl cyclase mediates plasma membrane localized nitric oxide signalling. *Cell Signal*. 19(10):2183-93.
- BELMONTE, K.E (2005). Cholinergic pathways in the lungs and anticholinergic therapy for chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2(4):297-304; discussion 11-2.
- BIDMON, H.J., MOHLBERG, H., HABERMANN, G., BUSE, E., ZILLES, K., BEHREND, S (2006). Cerebellar localization of the NO-receptive soluble guanylyl cyclase subunits-alpha(2)/beta(1) in non-human primates. *Cell Tissue Res*. 326(3):707-14.
- BORGES, A., SÁNCHEZ DE VILLARROEL, S., WINAND, N.J., LIPPO DE BÉCEMBERG, I., ALFONZO, M.J., GONZÁLEZ DE ALFONZO, R (2001). Molecular and biochemical characterization of a CNP-sensitive guanylyl cyclase in bovine tracheal smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 25(1):98-103.
- BROWN, S.M., KOARAI, A., STURTON, R.G., NICHOLSON, A.G., BARNES, P.J., DONNELLY, L.E (2013). A role for M(2) and M(3) muscarinic receptors in the contraction of rat and human small airways. *Eur J Pharmacol*. 702(1-3):109-15.
- BRUGES, G., BORGES, A., SÁNCHEZ DE VILLARROEL, S., LIPPO DE BÉCEMBERG, I., FRANCIS DE TOBA, G., PLÁCERES, F., GONZÁLEZ DE ALFONZO, R., ALFONZO, M.J., (2007). Coupling of M3 acetylcholine receptor to Gq16 activates a natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase. *J Recept Signal Transduct Res*. 27(2-3):189-216.
- BUECHLER, W.A., NAKANE, M., MURAD, F (1991). Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem Biophys Res Commun*. 174(1):351-7.

18. BUSSE, W.W., DAHL, R., JENKINS, C., CRUZ, A.A (2016). Long-acting muscarinic antagonists: a potential add-on therapy in the treatment of asthma? *Eur Respir Rev.* 25(139): 54-64.
19. CAULFIELD, M.P (1993). Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. *Pharmacol & Ther.* 58(3):319-79.
20. CEN, B., DEGUCHI, A., WEINSTEIN, I.B (2008). Activation of protein kinase G Increases the expression of p21CIP1, p27KIP1, and histidine triad protein 1 through Sp1. *Cancer Res.* 68(13):5355-62.
21. CHALLISS, R.A., ADAMS, D., MISTRY, R., BOYLE, J.P (1993). Second messenger and ionic modulation of agonist-stimulated phosphoinositide turnover in airway smooth muscle. *Biochem Soc Trans.* 21(4):1138-45.
22. CHARBONNEAU, H (1990). Structure-function relationships among cyclic nucleotide phosphodiesterases. In: Beavo JA, Houslay MD (eds) *Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action.* John Wiley & Sons, Chichester, UK vol 2:267.
23. DEBBURMAN, S.K., KUNAPULI, P., BENOVIC, J.L., HOSEY, M.M (1995). Agonist-dependent phosphorylation of human muscarinic receptors in *Spodoptera frugiperda* insect cell membranes by G protein-coupled receptor kinases. *Mol Pharmacol.* 47(2):224-33.
24. DERBYSHIRE, E.R & MARLETTA, M.A (2012). Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. *Annu Rev Biochem.* 81: 533-59.
25. EGLIN, R.M., HEGDE, S.S., WATSON, N (1996). Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol Rev.* 48(4):531-65.
26. FERNANDES, L.B., FRYER, A.D., HIRSHMAN, C.A (1992). M2 muscarinic receptors inhibit isoproterenol-induced relaxation of canine airway smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 262(1):119-26.
27. FRANCIS, S.H., BUSCH, J.L., CORBIN, J.D., SIBLEY, D (2010). cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev.* 62(3): 525-63.
28. GILOTTI, A.C., NIMLAMOO, W., PUGH, R., SLEE, J.B., BARTHOL, T.C., MILLER, E.A., LOWE-KRENTZ, L.J (2014). Heparin responses in vascular smooth muscle cells involve cGMP-dependent protein kinase (PKG). *J Cell Physiol.* 229(12):2142-52.
29. GONZÁLEZ DE ALFONZO, R., LIPPO DE BÉCEMBERG, I., ALFONZO, M (1996). A Ca²⁺/CAM protein kinase associated with Ca²⁺ transport in sarco(endo)plasmic vesicles from tracheal smooth muscle. *Life Sci.* 58(17):1403-1412.
30. GOSENS, R., ZAAGSMA, J., GROOTTE BROMHAAR, M., NELEMANS, A., MEURS, H (2004). Acetylcholine: a novel regulator of airway smooth muscle remodelling? *Eur J Pharmacol.* 500(1-3):193-201.
31. GOSENS, R., ZAAGSMA, J., MEURS, H., HALAYKO, A.J (2006). Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res.* 7:73.
32. GOSENS, R., DUECK, G., RECTOR, E., NUNES, R.O., GERTHOFFER, W.T., UNRUH, H., ZAAGSMA, J., MEURS, H., HALAYKO, A.J (2007). Cooperative regulation of GSK-3 by muscarinic and PDGF receptors is associated with airway myocyte proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 293(5):L1348-58.
33. GRANDORDY, B.M., CUSS, F.M., SAMPSON, A.S., PALMER, J.B., BARNES, P.J (1986). Phosphatidylinositol response to cholinergic agonists in airway smooth muscle: relationship to contraction and muscarinic receptor occupancy. *J Pharmacol Exp Ther.* 238(1):273-9.
34. GUERRA DE GONZÁLEZ, L., MISLE, A., PACHECO, G., NAPOLEÓN DE HERRERA, V., GONZÁLEZ DE ALFONZO, R., LIPPO DE BÉCEMBERG, I., ALFONZO, M.J (1999). Effects of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) and Nomega(6)-nitro-L-arginine methyl ester (NAME) on cyclic GMP levels during muscarinic activation of tracheal smooth muscle. *Biochem Pharmacol.* 58(4):563-569.
35. HAGIWARA, M., ENDO, T., HIDAKA, H (1984). Effects of vinpocetine on cyclic nucleotide metabolism in vascular smooth muscle. *Biochem Pharmacol.* 33(3):453-7.
36. HAMAD, A.M., CLAYTON, A., ISLAM, B., KNOX, A.J (2003). Guanylyl cyclases, nitric oxide, natriuretic peptides, and airway smooth muscle function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 285(5):L973-83.
37. HASSAN-SOTO, W., GUERRA DE GONZÁLEZ, L., GONZÁLEZ DE ALFONZO, R., LIPPO DE BÉCEMBERG, I., ALFONZO, M.J (2012). Selective Mastoparan inhibition of muscarinic activation of bovine tracheal smooth muscle. *AVFT* 31(4):72-79.
38. HIGASHIJIMA, T., UZU, S., NAKAJIMA, T., ROSS, E.M (1988). Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). *J Biol Chem.* 263(14):6491-4.
39. HIGASHIJIMA, T., BURNIER, J., ROSS, E.M (1990). Regulation of Gi and Go by mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines. Mechanism and structural determinants of activity. *J Biol Chem.* 265(24): 14176-86.
40. HIRAI, Y., YASUHARA, T., YOSHIDA, H., NAKAJIMA, T., FUJINO, M., KITADA, C (1979). A new mast cell degranulating peptide "mastoparan" in the venom of *Vespula lewisii*. *Chem Pharm Bull.* 27(8):1942-4.
41. HOSEY, M.M., BENOVIC, J.L., DEBBURMAN, S.K., RICHARDSON, R.M (1995). Multiple mechanisms involving protein phosphorylation are linked to desensitization of muscarinic receptors. *Life Sci.* 56(11-12):951-5.
42. JONES, C.A., MADISON, J.M., TOM-MOY, M., BROWN, J.K (1987). Muscarinic cholinergic inhibition of adenylate cyclase in airway smooth muscle. *Am J Physiol.* 253(1 Pt 1):C97-104.
43. KAMM, K.E & STULL, J.T (1989). Regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Annu Rev Physiol.* 51:299-313.
44. KAN, W., ADJOBHO-HERMANS, M., BURROUGHS, M., FAIBIS, G., MALIK, S., TALL, G.G., SMRCKA, A.V (2014). M3 muscarinic receptor interaction with phospholipase C beta3 determines its signaling efficiency. *J Biol Chem.* 289(16):11206-18.
45. KANG, J.Y., RHEE, C.K., KIM, J.S., PARK, C.K., KIM, S.J., LEE, S.H., YOON, H.K., KWON, S.S., KIM, Y.K., LEE, S.Y

- (2012). Effect of tiotropium bromide on airway remodeling in a chronic asthma model. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 109(1):29-35.
46. KATSUKI, S & MURAD, F (1977). Regulation of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate levels and contractility in bovine tracheal smooth muscle. *Mol Pharmacol.* 13(2):330-41.
 47. KISTEMAKER, L.E., OENEMA, T.A., MEURS, H., GOSENS, R (2012). Regulation of airway inflammation and remodeling by muscarinic receptors: perspectives on anticholinergic therapy in asthma and COPD. *Life Sci.* 91(21-22):1126-33.
 48. KISTEMAKER, L.E & GOSENS, R (2015). Acetylcholine beyond bronchoconstriction: roles in inflammation and remodeling. *Trends in Pharmacol Sci.* 36(3):164-71.
 49. KOLLER, K.J., LOWE, D.G., BENNETT, G.L., MINAMINO, N., KANGAWA, K., MATSUO, H., GOEDDEL, D.V (1991). Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* 252(5002):120-3.
 50. KOSTENIS, E., ZENG, F.Y., WESS, J (1999). Structure-function analysis of muscarinic receptors and their associated G proteins. *Life Sci.* 64(6-7):355-62.
 51. KRUPNICK, J.G & BENOVIC, J.L (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 38:289-319.
 52. LIPPO DE BÉCEMBERG, I., CORREA DE ADJOUNIAN, M.F., SÁNCHEZ DE VILLAROEL, S., PEÑA DE AGUILAR, E., GONZÁLEZ DE ALFONZO, R., ALFONZO, M (1995). G-protein-sensitive guanylyl cyclase activity associated with plasma membranes. *Arch Biochem Biophys.* 324(2):209-15.
 53. LOHMANN, S.M., VAANDRAGER, A.B., SMOLENSKI, A., WALTER, U., DE JONGE, H.R (1997). Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci.* 22(8):307-12.
 54. LUCCHESI, P.A., SCHEID, C.R., ROMANO, F.D., KARGACIN, M.E., MULLIKIN-KILPATRICK, D., YAMAGUCHI, H., HONEYMAN, T.W (1990). Ligand binding and G protein coupling of muscarinic receptors in airway smooth muscle. *Am J Physiol.* 258(4 Pt 1):C730-8.
 55. LUO, J., BUSILLO, J.M., BENOVIC, J.L (2008). M3 muscarinic acetylcholine receptor-mediated signaling is regulated by distinct mechanisms. *Mol Pharmacol.* 74(2):338-47.
 56. MAEDA, A., KUBO, T., MISHINA, M., NUMA, S (1988). Tissue distribution of mRNAs encoding muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *FEBS Lett.* 239(2):339-42.
 57. MASTROMATTEO-ALBERGA, P., PLÁCERES-URAY, F., ALFONZO GONZÁLEZ, M.A., GONZÁLEZ DE ALFONZO, R., LIPPO BÉCEMBERG, I., ALFONZO, M.J (2016). A novel PDE1A coupled to M2AChR at plasma membranes from bovine tracheal smooth muscle. *J Recept Signal Transduct Res.* 36(3):278-87.
 58. MEURS, H., ROFFEL, A.F., POSTEMA, J.B., TIMMERMANS, A., ELZINGA, C.R., KAUFFMAN, H.F., ZAAGSMA, J (1988). Evidence for a direct relationship between phosphoinositide metabolism and airway smooth muscle contraction induced by muscarinic agonists. *Eur J Pharmacol.* 156(2):271-4.
 59. MICHEL, A.D & WHITING, R.L (1988). Methoctramine reveals heterogeneity of M2 muscarinic receptors in longitudinal ileal smooth muscle membranes. *Eur J Pharmacol.* 145(3):305-11.
 60. MICHEL, A.D., STEFANICH, E., WHITING, R.L (1989). Direct labeling of rat M3-muscarinic receptors by [3H]4DAMP. *Eur J Pharmacol.* 166(3):459-66.
 61. MISLE, A.J., LIPPO DE BÉCEMBERG, I., GONZÁLEZ DE ALFONZO, R., ALFONZO, M.J (1994). Methoctramine binding sites sensitive to alkylation on muscarinic receptors from tracheal smooth muscle. *Biochem Pharmacol.* 48(1):191-5.
 62. MISLE, A., BRUGES, G., DE HERRERA, V., ALFONZO, M., DE BÉCEMBERG, I., GONZÁLEZ DE ALFONZO, R (2001). G-Protein-dependent antagonists binding in M3 mAChR from tracheal smooth muscle. *AVFT.* 20:143-51.
 63. NAGASE, M., KATAFUCHI, T., HIROSE, S., FUJITA, T (1997). Tissue distribution and localization of natriuretic peptide receptor subtypes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 15(11):1235-43.
 64. NAKAHARA, T., YUNOKI, M., MITANI, A., SAKAMOTO, K., ISHII, K (2002). Stimulation of muscarinic M2 receptors inhibits atrial natriuretic peptide-mediated relaxation in bovine tracheal smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv pharmacol.* 366(4):376-9.
 65. NICKE, B., DETJEN, K., LOGSDON, CD (1999). Muscarinic cholinergic receptors activate both inhibitory and stimulatory growth mechanisms in NIH3T3 cells. *J Biol Chem.* 274(31):21701-6.
 66. OLDHAM, W.M & HAMM, H.E (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(1):60-71.
 67. PACINI, L., DE FALCO, E., DI BARI, M., COCCIA, A., SICILIANO, C., PONTI, D., PASTORE, A.L., PETROZZA, V (2014). M2 muscarinic receptors inhibit cell proliferation and migration in urothelial bladder cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 15(11):1489-98.
 68. PAPAPETROPOULOS, A., SIMOES, D.C., XANTHOU, G., ROUSSOS, C., GRATZIOU, C (2006). Soluble guanylyl cyclase expression is reduced in allergic asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 290(1):L179-84.
 69. PEREZ, J.F & SANDERSON, M.J (2005). The frequency of calcium oscillations induced by 5-HT, ACh, and KCl determine the contraction of smooth muscle cells of intrapulmonary bronchioles. *J Gen Physiol.* 125(6):535-53.
 70. PLÁCERES-URAY, F., GONZÁLEZ DE ALFONZO, R., LIPPO DE BÉCEMBERG, I., ALFONZO, M.J (2010a). Muscarinic agonists acting through M2 acetylcholine receptors stimulate the migration of an NO-sensitive guanylyl cyclase to the plasma membrane of bovine tracheal smooth muscle. *J Recept Signal Transduct Res.* 30(1):10-23.
 71. PLÁCERES-URAY, F., GONZÁLEZ DE ALFONZO, R., LIPPO DE BÉCEMBERG, I., ALFONZO, M.J (2010b). Soluble guanylyl cyclase is reduced in airway smooth muscle cells from a murine model of allergic asthma. *WAO Journal.*

- 3(12):271-6.
72. PLÁCERES-URAY, F., GONZÁLEZ DE ALFONZO, R., ALFONZO, M.J., LIPPO DE BÉCEMBERG, I (2011). Hypersensitivity of the M3mAChR/ Gq16 protein/NPR-GC-B coupling mechanism associated to muscarinic activation of airway smooth muscle cells in a rat asthma model. *World Allergy Organization; Annual Meeting. Boston. USA.* (Abstract 81).
 73. PLÁCERES-URAY, F.A., FEBRES-ALDANA, C.A., FERNANDEZ-RUÍZ, R., GONZÁLEZ DE ALFONZO, R., LIPPO DE BÉCEMBERG, I.A., ALFONZO, M.J (2013). M2 Muscarinic acetylcholine receptor modulates rat airway smooth muscle cell proliferation. *WAO Journal.* 6(1):22.
 74. POTTER, L.R & HUNTER, T (1998). Identification and characterization of the major phosphorylation sites of the B-type natriuretic peptide receptor. *J Biol Chem.* 273(25):15533-9.
 75. PROSKOCIL, B.J., SEKHON, H.S., JIA, Y., SAVCHENKO, V., BLAKELY, R.D., LINDSTROM, J., SPINDEL, E.R (2004). Acetylcholine is an autocrine or paracrine hormone synthesized and secreted by airway bronchial epithelial cells. *Endocrinology.* 145(5):2498-506.
 76. RACKE, K & MATTHIESEN, S (2004). The airway cholinergic system: physiology and pharmacology. *Pulm Pharmacol Ther.* 17(4):181-98.
 77. RACKE, K., JUERGENS, U.R., MATTHIESEN, S (2006). Control by cholinergic mechanisms. *Eur J Pharmacol.* 533(1-3):57-68.
 78. REN, Y., ZHENG, J., YAO, X., WENG, G., WU, L (2014). Essential role of the cGMP/PKG signaling pathway in regulating the proliferation and survival of human renal carcinoma cells. *Int J Mol Med.* 34(5):1430-8.
 79. ROFFEL, A.F., ELZINGA, C.R., VAN AMSTERDAM, R.G., DE ZEEUW, R.A., ZAAGSMA, J (1988). Muscarinic M2 receptors in bovine tracheal smooth muscle: discrepancies between binding and function. *Eur J Pharmacol.* 153(1):73-82.
 80. ROFFEL, A.F., ELZINGA, C.R., ZAAGSMA, J (1990a). Muscarinic M3 receptors mediate contraction of human central and peripheral airway smooth muscle. *Pulm pharmacol.* 3(1):47-51.
 81. ROFFEL, A.F., MEURS, H., ELZINGA, C.R., ZAAGSMA, J (1990b). Characterization of the muscarinic receptor subtype involved in phosphoinositide metabolism in bovine tracheal smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 99(2):293-6.
 82. RUSSWURM, M., RUSSWURM, C., KOESLING, D., MERGIA, E (2013). NO/cGMP: the past, the present, and the future. *Methods Mol Biol.* 1020:1-16.
 83. SANKARY, R.M., JONES, C.A., MADISON, J.M., BROWN, J.K (1988). Muscarinic cholinergic inhibition of cyclic AMP accumulation in airway smooth muscle. Role of a pertussis toxin-sensitive protein. *Am Rev Respir Dis.* 138(1):145-50.
 84. SCHMIDT, C., LI, B., BLOODWORTH, L., ERLNBACH, I., ZENG, F.Y., WESS, J (2003). Random mutagenesis of the M3 muscarinic acetylcholine receptor expressed in yeast. Identification of point mutations that "silence" a constitutively active mutant M3 receptor and greatly impair receptor/G protein coupling. *J Biol Chem.* 278(32):30248-60.
 85. SEMENOV, I., WANG, B., HERLIHY, J.T., BRENNER, R (2011). BK channel beta1 subunits regulate airway contraction secondary to M2 muscarinic acetylcholine receptor mediated depolarization. *J Physiol.* 589 (Pt 7):1803-17.
 86. SHAHID, M., VAN AMSTERDAM, R.G., DE BOER, J., TENBERGE, R.E., NICHOLSON, C.D., ZAAGSMA, J (1991). The presence of five cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme activities in bovine tracheal smooth muscle and the functional effects of selective inhibitors. *Br J Pharmacol.* 104(2):471-7.
 87. SHARINA, I.G., KRUMENACKER, J.S., MARTIN, E., MURAD, F (2000). Genomic organization of alpha 1 and beta1 subunits of the mammalian soluble guanylyl cyclase genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(20):10878-83.
 88. SHARMA, R.K., WANG, T.H., WIRCH, E., WANG, J.H (1980). Purification and properties of bovine brain calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J Biol Chem.* 255(12):5916-23.
 89. SHI, J., DAMJANOSKA, K.J., SINGH, R.K., CARRASCO, G.A., GARCÍA, F., GRIPPO, A.J., LANDRY, M., SULLIVAN, N.R., BATTAGLIA, G., MUMA, N.A (2007a). Agonist induced-phosphorylation of Galpha11 protein reduces coupling to 5-HT2A receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 323(1):248-56.
 90. SHI, J., ZEMAITAITIS, B., MUMA, N.A (2007b). Phosphorylation of Galpha11 protein contributes to agonist-induced desensitization of 5-HT2A receptor signaling. *Mol Pharmacol.* 71(1):303-13.
 91. SHPAKOV, A.O & PERTSEVA, M.N (2006). Molecular mechanisms for the effect of mastoparan on G proteins in tissues of vertebrates and invertebrates. *Bull Exp Biol Med.* 141(3):302-6.
 92. SIMON, V., GUIDRY, J., GETTYS, T.W., TOBIN, A.B., LANIER, S.M (2006). The proto-oncogene SET interacts with muscarinic receptors and attenuates receptor signaling. *J Biol Chem.* 281(52):40310-20.
 93. SIMON, V., ONER, S.S., COHEN-TANNOUDJI, J., TOBIN, A.B., LANIER, S.M (2012). Influence of the accessory protein SET on M3 muscarinic receptor phosphorylation and G protein coupling. *Mol Pharmacol.* 82(1):17-26.
 94. SONNENBURG, W.K., SEGER, D., KWAK, K.S., HUANG, J., CHARBONNEAU, H., BEAVO, J.A (1995). Identification of inhibitory and calmodulin-binding domains of the PDE1A1 and PDE1A2 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Biol Chem.* 270(52):30989-1000.
 95. SUGA, S., NAKAO, K., HOSODA, K., MUKOYAMA, M., OGAWA, Y., SHIRAKAMI, G., ARAI, H., SAITO, Y., KAMBAYASHI, Y., INOUE, K (1992). Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology.* 130(1):229-39.
 96. TORPHY, T.J & CIESLINSKI, L.B (1990). Characterization and selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes in canine tracheal smooth muscle. *Mol Pharmacol.* 37(2):206-14.

97. VANACKER, N.J., PALMANS, E., KIPS, J.C., PAUWELS, R.A (2001). Fluticasone inhibits but does not reverse allergen-induced structural airway changes. *Am J Respir Crit Care Med.* 163(3 Pt 1):674-9.
98. VAN DER VELDEN, V.H & HULSMANN, A.R (1999). Auto-nomic innervation of human airways: structure, function, and pathophysiology in asthma. *Neuroimmunomodulation.* 6(3):145-59.
99. WAGNER, C., RUSSWURM, M., JAGER, R., FRIEBE, A., KOESLING, D (2005). Dimerization of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase requires the alpha 1 N terminus. *J Biol Chem.* 280(18):17687-93.
100. WEDEL, B., HARTENECK, C., FOERSTER, J., FRIEBE, A., SCHULTZ, G., KOESLING, D (1995). Functional domains of soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem.* 270(42):24871-5.
101. WESSLER, I.K & KIRKPATRICK, C.J (2001). The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulm Pharmacol Ther.* 14(6):423-34.
102. WESSLER, I & KIRKPATRICK, C.J (2008). Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol.* 154(8):1558-71.
103. WILLETS, J.M., CHALLISS, R.A., KELLY, E., NAHORSKI, S.R (2001). G protein-coupled receptor kinases 3 and 6 use different pathways to desensitize the endogenous M3 muscarinic acetylcholine receptor in human SH-SY5Y cells. *Mol Pharmacol.* 60(2):321-30.
104. WU, G., BOGATKEVICH, G.S., MUKHIN, Y.V., BENOVIC, J.L., HILDEBRANDT, J.D., LANIER, S.M (2000). Identification of Gbetagamma binding sites in the third intracellular loop of the M(3)-muscarinic receptor and their role in receptor regulation. *J Biol Chem.* 275(12):9026-34.
105. ZHOU, X.B., WULFSEN, I., LUTZ, S., UTKU, E., SAUSBIER, U., RUTH, P., WIELAND, T., KORTH, M (2008). M2 muscarinic receptors induce airway smooth muscle activation via a dual, Gbetagamma-mediated inhibition of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activity. *J Biol Chem.* 283(30):21036-44.



Venezuela, con una población de 31.8 millones de habitantes y un territorio dividido en 24 estados, vive una Emergencia Humanitaria Compleja desde el año 2015 sin precedentes en el país. Con un perfil de gran escala, por sus múltiples factores y amplia desestructuración en los planos institucionales, jurídicos, políticos, sociales y económicos, la emergencia tiene efectos devastadores en la vida y el bienestar de toda la población. En el derecho a la salud, sus impactos se han materializado en la destrucción de un sistema sanitario público ya deteriorado, causando graves daños a la salud de millones de personas, la reaparición y propagación de epidemias erradicadas décadas atrás y miles de muertes en creciente ascenso.



Emergencia por Daños a la Salud y la Vida

Al menos 60% de la asistencia médica disponible en 2011 se perdió entre 2012 y 2017; prestada por servicios de salud públicos al 82% de la población usuaria.	19 millones de personas con las condiciones de salud de mayor prevalencia, incidencia y mortalidad no tienen garantías de acceso a diagnósticos ni a tratamientos.	300 mil personas Trasplantadas, con Hemofilia, Cáncer, Parkinson, Esclerosis, y otras personas con condiciones crónicas graves, fueron privadas de medicamentos desde 2016.
El riesgo de fallecer en un hospital público es bastante alto, causando extrema vulnerabilidad a las personas por la precariedad de las condiciones de atención.	406.000 casos de malaria, generó la epidemia en 2017, con 280 muertes en 2016. Se esperan 700.000 nuevos casos y 1.500 muertes al finalizar 2018 por debilidad de programas antipalúdicos.	140.000 personas con cáncer y más de 300.000 con condiciones cardíacas severas han visto reducidas sus posibilidades de sobrevivir por ausencia de diagnóstico, tratamiento y cirugía.
En 66% subió la escala de muertes maternas y en 30% las infantiles de 2015 a 2016. Siguen en ascenso hasta 2018, con los agravantes de la desnutrición y las epidemias.	10.952 nuevos casos de Tuberculosis ocurrieron en 2017, intensificándose en las cárceles debido a las condiciones inhumanas de hacinamiento y desnutrición de la población reclusa.	79.000 personas con VIH dejaron de recibir antirretrovirales desde 2017 y el número de defunciones aumentó de 1.800 en 2014 a posiblemente más de 5.000 en los últimos años.
De 23.000 a 3.500 descendió el número de personas atendidas en instituciones psiquiátricas públicas y las que están no disponen de comida ni de medicinas.	9.362 suman los casos de Difteria y Sarampión en 2018 con 230 muertes. Estas epidemias ya se extienden a todo el país por desplazamientos internos y bajas coberturas de vacunación.	2.500 de 15.000 personas que se dializan, la mayoría con problemas renales, fallecieron entre 2017 y 2018 por las fallas, contaminación, déficit y cierre de las unidades de diálisis.

¿Qué es una Emergencia Humanitaria Compleja?

Naciones Unidas la define como "una crisis humanitaria en un país, región o sociedad en la que hay una total o considerable ruptura de la autoridad, como resultado de un conflicto interno o externo, y que requiere una respuesta internacional que va más allá del mandato o capacidad de un solo organismo y/o el programa de país de las Naciones Unidas en curso" (IASC, 1994). Dar respuesta a una EHC implica usar marcos y mecanismos de protección internacional en forma simultánea, dado que sus exigencias humanitarias son multifacéticas, hay un gran número de personas en vulnerabilidad extrema y diversos factores actúan en combinación, produciendo una amplia y severa destrucción de las capacidades internas de un país para garantizar los derechos de asistencia y protección de toda la población, incluyendo restricciones al cumplimiento de obligaciones internacionales.



I

Eventos de Daño a la Salud y la Vida

- Al menos 60% de la asistencia médica disponible en 2011 se perdió entre 2012 y 2017; prestada por servicios de salud públicos al 82% de la población usuaria. De 27 millones de personas censadas en 2011, 56% pudo ir a un servicio médico; 6,7 millones (45%) iba a hospitales públicos, 1,5 millones (10%) a hospitales y ambulatorios de la seguridad social y 3,5 millones (23%) a centros privados. Además, 5,5 millones (37%) iba a consultorios y centros de atención primaria de Barrio Adentro y 4,4 millones (29%) a los ambulatorios de la red pública. Según el censo, los servicios de salud públicos recibían 82% de la demanda de asistencia médica. Entre 2012 y 2015, la proporción de camas ocupadas en los hospitales públicos cayó 40% y, entre 2014 y 2015, la cantidad de personas atendidas a diario en consultas, emergencias y partos se redujo 58%, de acuerdo con las últimas estadísticas de rendimiento publicadas por el Ministerio de Salud en su Memoria y Cuenta. Además, según ENCOVI 2017, Barrio Adentro perdió 96% de sus beneficiarios entre 2015 y 2017. Ese año, el único hospital público del estado Amazonas estaba en cierre técnico.

- El riesgo de fallecer en un hospital público es bastante alto, causando extrema vulnerabilidad a las personas por la precariedad de las condiciones de atención. La mayor parte de los establecimientos de salud públicos presentan serio deterioro de sus plantas físicas, no cuentan con suficiente personal y materiales de limpieza, una adecuada disposición y traslado de residuos ni suministro regular de agua. Estas condiciones generan frecuentes problemas de saneamiento que favorecen infecciones intrahospitalarias y 50% de los hospitales con servicios complejos no tienen laboratorios de bacteriología para identificar las causas. Entre 2017 y 2018, fallecieron 11 niños y adolescentes que se dializaban en el Hospital Infantil J.M. de los Ríos por una infección bacteriana en los tanques de agua y filtros de las unidades. Entre 2016 y 2018, también fallecieron 147 niños y niñas por la bacteria *Serratia Marcescens* en el Hospital Pediátrico Dr. Agustín Zubillaga del estado Lara. De igual modo, entre diciembre de 2017 y febrero de 2018, se denunció la muerte de 112 recién nacidos en la Maternidad Santa Ana de Caracas por bacteria *Klebsiella Pneumoniae*.

- En 66% subió la escala de muertes maternas y en 30% las infantiles de 2015 a 2016. Siguen en ascenso hasta 2018, con los agravantes de la desnutrición y las epidemias. La muerte asociada a la atención del embarazo y del nacimiento, han escalado en Venezuela por la caída de los servicios de salud públicos, la desnutrición y las epidemias. La tasa de embarazo adolescente, en 95 por 1.000 mujeres, es la mayor de América Latina. Entre 2015 y 2016, las muertes maternas crecieron en 66%, alcanzando una tasa de mortalidad de 140 embarazadas por 100.000 nacidos vivos, y siguieron ascendiendo durante 2017 y 2018. Las muertes infantiles, más de 60% neonatales, subieron en 30% (8.812 a 11.466) con una tasa de 19,0 fallecidos por 10.000 nacidos vivos. En la ENCOVI 2017, 25.000 embarazadas nunca habían recibido control prenatal y 15.000 sólo a partir del octavo mes. Hasta agosto de 2018, 48% de las embarazadas en parroquias pobres tenía algún grado de desnutrición y 21% desnutrición severa, según Cáritas. En 2017, 117 embarazadas del estado Bolívar perdieron la vida por complicaciones a causa de la malaria; en 2018, 10 embarazadas de 690 mujeres indígenas con malaria en el estado Amazonas también fallecieron.

- 18,7 millones de personas con las condiciones de salud de mayor prevalencia, incidencia y mortalidad no tienen garantías de acceso a diagnósticos ni a tratamientos. La denegación de medicinas y de atención médica en los servicios de salud públicos unido a una extrema pobreza e inseguridad alimentaria, han incrementado y cambiado los patrones de enfermedad, discapacidad y mortalidad en Venezuela. Desde hace 3 años, 18,7 millones de personas - entre ellas, 7,4 millones de personas hipertensas y 2,4 millones con diabetes, según estudios recientes, además de 6 millones con infecciones respiratorias agudas (42% menores de 5 años) y 2,2 millones que sufren de diarreas (39% menores de 5 años) que reportó el Ministerio de la Salud hasta 2016; y más de 400.000 con malaria, así como 300.000 con condiciones crónicas graves- no tienen garantías de acceso a diagnósticos ni a tratamientos. Hasta agosto de 2018, se



II

Eventos de Daño a la Salud y la Vida

- **300 mil personas Trasplantadas, con Hemofilia, Cáncer, Parkinson, Esclerosis, y otras personas con condiciones crónicas graves, fueron privadas de medicamentos desde 2016.** Unas 74.000 personas con condiciones crónicas graves recibían medicamentos de alto costo en 58 farmacias de la seguridad social y unas 300.000 en total podían conseguir y comprar otras medicinas en farmacias privadas. A raíz de severos recortes de importaciones, en 2016 se suspendieron las compras de medicamentos de alto costo, sin otra alternativa, y se agotaron las medicinas en las farmacias, privando a las personas de sus tratamientos. Hasta 2018, 3.000 personas trasplantadas dejaron de recibir inmunosupresores y, como consecuencia, 96 personas sufrieron rechazo de sus órganos y 12 fallecieron; a 5.000 personas con hemofilia se negaron factores de coagulación para prevenir el sangrado y la artropatía hemofílica y, por esta razón, fallecieron 43 personas y 270 se encuentran en riesgo de morir; 33.000 personas con Parkinson perdieron sus medicamentos, causándoles terribles sufrimientos que van desde la pérdida de equilibrio hasta una rigidez total que puede provocar la muerte; también 8.000 mujeres con Cáncer de Mama, 13.000 con Linfoma, 2.700 con Esclerosis múltiple, 200 con Hipertensión Pulmonar, entre otras, han sufrido daños a su salud y corren peligro de perder la vida.

- **140.000 personas con cáncer y más de 300.000 con condiciones cardíacas severas han visto reducidas sus posibilidades de sobrevivir por ausencia de diagnóstico, tratamiento y cirugía.** En los casos de personas con cáncer y problemas cardiovasculares, principales causas de muerte en el país, la esperanza de vida es muy baja. Los centros oncológicos no garantizan quimioterapia a 140.000 personas con cáncer; ya no hay radioterapias y las cirugías disminuyeron 50%. Tampoco se cuenta con equipos de mamografía, tomógrafos, aceleradores lineales y bombas de cobalto, entre otros. Igualmente, para más de 300.000 personas con condiciones cardíacas severas, 78% de los centros públicos de referencia no están en capacidad de atender una emergencia. Según la Sociedad Venezolana de Cardiología, 39% no puede hacer un electrocardiograma, ninguno realiza exámenes en caso de infarto y 88% tampoco exámenes sanguíneos de cualquier tipo; 68% no tiene las medicinas indicadas ni efectúa cateterismos; 93% no hace angioplastias y 92% carece de aspirinas. Al menos 4 servicios de cirugía cardiovascular han cerrado, no existen suficientes dispositivos de electro-estimulación, especialistas ni insumos para una cirugía cardiovascular adecuada.

- **Más de 79 mil personas con VIH dejaron de recibir antirretrovirales desde 2017 y el número de defunciones aumentó de 1.800 en 2014 a posiblemente más de 5.000 en los últimos años.** En Venezuela se estiman 154.000 personas con VIH, aunque no existen estudios de prevalencia e incidencia de coberturas significativas. La falta de acceso a pruebas diagnósticas y de seguimiento, preservativos y fórmulas lácteas para madres con VIH, ha persistido en la última década. Las comunidades Warao de Delta Amacuro corren riesgo de ser diezmadas por una veloz epidemia de VIH. Hasta 2017, 79.400 personas con VIH estaban inscritas en el Programa Nacional de Sida del Ministerio de la Salud para recibir tratamiento antirretroviral (TAR). Desde 2016, el acceso a los TAR bajó de forma alarmante hasta casi desaparecer en 2017 y 2018 al interrumpirse las compras internacionales. En 2018, fueron retiradas 10.000 personas inscritas por posibles defunciones o migración. Las muertes pasaron de 1.800 en 2014 a 2.400 en 2015, aumentando 33%, y posiblemente escalaron a más de 5.000 en los años 2017 y 2018 por el incremento de personas hospitalizadas, muertes por SIDA y otras enfermedades oportunistas, reportadas por ONG y servicios de salud en VIH.

- **2.500 de 15.000 personas que se dializan, la mayoría con problemas renales, fallecieron entre 2017 y 2018 por las fallas, contaminación, déficit y cierre de las unidades de diálisis.** En Venezuela, 15.000 personas se dializan con una frecuencia de 4 horas 3 veces a la semana para sobrevivir. El número de personas en diálisis crece por la alta incidencia de la diabetes, hipertensión y otras condiciones que causan insuficiencia renal. Desde 2015, existía un alto déficit de unidades y se había acentuado la falla de las máquinas, la escasez de insumos y la falta de cirujanos vasculares. La diálisis se convirtió en la única opción de sobrevivencia, dado que la donación y trasplante de órganos fue mermando hasta paralizarse en 2017. En febrero de 2018, 32 unidades de diálisis de las 129 disponibles, cerraron por dos semanas de forma simultánea en 13 estados del país, a causa del agotamiento severo de insumos. Entre mayo y septiembre no cesó la crisis por distintos motivos: escases de insumos, avería de 1.000 máquinas, rotura de tuberías de aguas cloacales, escasez de agua, renuncias de personal de salud y cortes de luz, entre otros. A través de diversas denuncias se contabilizaron 2.500 personas fallecidas como consecuencia de esta grave situación.



III

Eventos de Daño a la Salud y la Vida

- De 23.000 a 3.500 descendió el número de personas atendidas en instituciones psiquiátricas públicas y las que están no disponen de comida ni de medicinas. Las políticas de salud mental han sido históricamente débiles en Venezuela. Las personas con alguna condición de salud mental (esquizofrenia, demencia, depresión y trastornos bipolar, de ansiedad, de la personalidad, déficit de atención, discapacidad intelectual y autismo) sólo han dispuesto de atención pública en 11 hospitales del Ministerio de Salud y 68 casas de reposo de la seguridad social. Entre 2009 y 2013, las camas descendieron 42% y, entre 2013 y 2015, el número de personas atendidas bajó de 23.000 a 5.500, debido a los graves problemas de infraestructura, escaso presupuesto y falta de medicinas. En 2016, la escasez de medicinas psicotrópicas alcanzaba 85%, generando alta probabilidad de discapacidad y mortalidad. En ENCOVI 2016, 63% de las personas con estas condiciones no conseguía medicinas en farmacias. Los psiquiatras expresaban haber regresado a prácticas superadas como amarrar o aislar en un cuarto sin ropa para evitar autoagresiones. En 2018, 3.500 personas debían desalojar los centros por severos cuadros de desnutrición y episodios psicóticos.

- 406.000 casos de malaria, generó la epidemia en 2017, con 280 muertes en 2016. Se esperan 700.000 nuevos casos y 1.500 muertes al finalizar 2018 por debilidad de programas antipalúdicos. Venezuela integra los 41 países del mundo con alta carga de malaria. En 2017, el país acumulaba 34% de los casos de América Latina, ocupando el primer lugar de incidencia. La OMS ha reconocido la emergencia y ha dispuesto apoyar a Venezuela junto a Nigeria, Sudán del Sur y Yemen, con situación similar. En 2017, los casos aumentaron 200%, pasando de 136.000 en 2015 a 406.289 en 2017 extendidos a 10 estados del país por los desplazamientos de población minera, escasez de medicamentos antipalúdicos y debilitamiento del control de vectores según OMS. En 2018, la OMS alertó que Venezuela presentaba el mayor incremento de casos del mundo debido a la drástica reducción de las campañas antipalúdicas. La malaria dejó de estar en áreas remotas para extenderse a zonas urbanas y peri-urbanas. Los especialistas estiman para 2018 al menos 700 mil casos y, registros hasta abril de 2018 muestran la extensión de la epidemia a todo el territorio nacional, pasando a concentrar 60% de los casos de América Latina y generando posiblemente unas 1.500 muertes.

- 10.952 nuevos casos de Tuberculosis ocurrieron en 2017, intensificándose en las cárceles debido a las condiciones inhumanas de hacinamiento y desnutrición de la población reclusa. Los casos de tuberculosis aumentaron 67% entre 2011 y 2017, pasando de 6.552 a 10.952, según OMS. Los datos publicados por el Ministerio de Salud arrastran un subregistro mayor a 100%. El repunte de esta enfermedad es reflejo del empeoramiento de la seguridad alimentaria y de las condiciones de vida de la población, siendo más vulnerables las personas con VIH, las personas reclusas y los pueblos indígenas. De acuerdo con OMS, 60% de los casos en 2017 correspondía a personas con VIH; pero, entre 2011 y 2015, se intensificaron en la población carcelaria, aumentando 833%. Entre 2017 y el primer semestre de 2018, Una Ventana a la Libertad registró un incremento de 18 a 54 personas reclusas fallecidas por tuberculosis, falta de atención médica y desnutrición en centros de detención preventiva bajo custodia y responsabilidad del Estado, los cuales presentan condiciones inhumanas con un hacinamiento de 300% y falta de alimentación, salud e higiene personal. El peso de estos casos, pasó de 18% a 33%, en el total de defunciones registradas durante el período.

- 9.362 suman los casos de Difteria y Sarampión hasta 2018 con 230 muertes. Estas epidemias se extienden a todo el país por desplazamientos internos y bajas coberturas de vacunación. En 2016 inició un brote de Difteria en los estados Bolívar y Monagas, luego de dos décadas sin casos notificados. El personal de salud y las sociedades científicas denunciaron la reaparición de la enfermedad y 17 defunciones infantiles en abril de 2016, que desestimaron las autoridades nacionales y regionales. De septiembre de 2016 a agosto de 2018, la Difteria se transformó en epidemia, subiendo de 320 a 1.217 casos confirmados de 1.992 sospechosos y se extendió a 20 estados del país con 168 personas fallecidas, en su mayoría niños y niñas. El primer caso de Sarampión se confirmó en 2017. Desde ese año hasta septiembre de 2018, los casos aumentaron de 727 a 5.332 confirmados, sobre 7.370 sospechosos en total, en todos los estados del país con 64 defunciones y una mayor incidencia en los estados Delta Amacuro, Distrito Capital y Amazonas. Las bajas coberturas de vacunación son su principal causa. En la ENCOVI 2017, 54% de los niños no había recibido la primera dosis contra Sarampión y a 30% le faltaba las vacunas contra la Difteria.



En el derecho a la salud, la Emergencia Humanitaria Compleja comprende impactos de gran alcance en el menoscabo y destrucción de las capacidades sanitarias nacionales. Entre estos impactos destacan, una institucionalidad sanitaria ausente, la paralización y cierre operativo de la mayor parte de los servicios de atención médica y la denegación prolongada de medicinas, vacunas e insumos sanitarios básicos para la prevención y tratamiento de enfermedades y lesiones, y la atención de personas con condiciones crónicas, desnutrición, embarazadas y recién nacidos, en un contexto de grave inseguridad alimentaria, hundimiento económico, 61% de extrema pobreza, alta incidencia de muertes violentas y colapso de los servicios básicos.

Emergencia por Impactos en las Capacidades Sanitarias

55% del personal médico, 24% de enfermería y 30% de los biólogos, en su mayoría de servicios de salud públicos, renunciaron a sus puestos de trabajo y migraron del país.

1,5% del PIB representa el gasto público en salud. Este gasto es 75% inferior al estándar mundial y el más bajo y regresivo de América Latina y el Caribe en las últimas décadas.

95% de las medicinas, insumos, materia prima, equipos y repuestos en salud son importados. De 2012 a 2017, las importaciones cayeron 70% sin previsión ni plan de contingencia.

A 64% asciende el déficit de camas en Venezuela y, del total disponible, 40% está fuera de servicio por deterioro físico, equipos dañados, falta de personal y de presupuesto.

El pago de insumos, medicinas y exámenes y 90% de paralización del transporte público agrava la inaccesibilidad de la atención en los servicios de salud públicos.

A 93% bajó el consumo per cápita de medicamentos de 2014 a 2018, por caída de producción interna. La escasez de medicinas en farmacias es de 85% y en hospitales 88%.

71% de las emergencias en la mayoría de los hospitales públicos del país no pueden prestar servicios de manera regular, 22% dejó de funcionar y 53% de los quirófanos están cerrados.

79% de los hospitales no recibe agua de manera regular y 33% no cuenta con plantas para mantener la continuidad de energía eléctrica en caso de ocurrir fallas.

Los sistemas de vigilancia epidemiológica y ambiental han decaído, aumentando los sub-registros y los vacíos de información sobre la grave situación de salud.

100% de los laboratorios presentan fallas severas para realizar pruebas diagnósticas y 69% de los bancos de sangre no pueden garantizar tratamientos de transfusión seguros.

El personal de salud, las personas afectadas, los periodistas y defensores afrontan prácticas de intimidación, censura y represalia por denunciar y ejercer la protesta pacífica.

Desde 2016 no se publica ninguna cifra oficial sobre la situación de salud ni se rinde cuenta sobre el gasto ni estado de los servicios sanitarios públicos al parlamento nacional.

Un sistema sanitario público deteriorado

En 1999, la Constitución (Artículos 83 y 84) estableció como obligación del Estado garantizar el derecho a la salud, como parte del derecho a la vida, creando un sistema público nacional de salud bajo su rectoría y gestión, de carácter intersectorial, descentralizado y participativo, integrado al sistema de seguridad social, y regido por los principios de gratuidad, universalidad, integralidad, equidad, integración social y solidaridad. A lo largo de dos décadas, por el contrario, el Estado encaminó sus políticas al desmantelamiento institucional y debilitamiento del sistema sanitario público, entre las que destacan: a) la negativa a cumplir el mandato constitucional; b) el desfinanciamiento público de la salud; c) el uso de cuantiosos recursos para crear un sistema paralelo al institucional, prescindiendo de los profesionales y trabajadores de la salud; d) la vulnerabilidad del sector salud por su alta dependencia de las importaciones a través un control abusivo de las divisas; y e) la censura y ausencia de datos oficiales sobre las condiciones del sistema y la situación de salud de la población.



I

Impactos en las Capacidades Sanitarias

- 55% del personal médico, 24% de enfermería y 30% de los bionalistas, en su mayoría de servicios de salud públicos, renunciaron a sus puestos de trabajo y migraron del país. Entre 2012 y 2017 migraron del país 22.000 médicos venezolanos, entre especialistas y residentes, cuya mayoría prestaba servicios en las áreas de pediatría, medicina general, emergencia y cirugía del sistema sanitario público. Esta cifra representa una pérdida de al menos 55% del personal médico capacitado sobre un total de 39.900 registrados por la OPS en 2014. El gobierno ha venido otorgando títulos a más de 20.000 médicos integrales comunitarios (MIC) y 12.000 médicos generales, sin haber cursado los programas de formación de las facultades de medicina ni hacer revalidas en las universidades públicas que acreditan a todos los médicos en Venezuela. Tampoco se conocen los niveles de deserción. A las renunciaciones del personal médico se han sumado las de 6.600 bionalistas (33% de 20.000 en total) y de 6.030 enfermeras/os (24% de unos 24.500 según OPS en 2014), aumentando a 74% el déficit de 50% en personal de enfermería que arrastraba el país.

- 1,5% del PIB representa el gasto público en salud. Este gasto es 75% inferior al estándar mundial y el más bajo y regresivo de América Latina y el Caribe en las últimas décadas. El gasto público en salud de Venezuela representa 1,5% del PIB. Este gasto es 75% inferior al 6% recomendado por la OMS y está ubicado en el último lugar de América Latina y el Caribe, a una distancia de 40,5% por debajo del 3,7% en promedio que destinan los países de la región. Venezuela es el único país que retrocedió a menos de lo que gastaba en 1995, año donde era 1,8% del PIB. La mayor caída de recursos ocurrió entre los años 2007 y 2014, período en el cual disminuyeron 40%, luego de haber alcanzado un máximo de 2,5% del PIB en 2007. La reducción del presupuesto público para la salud por tantos años se ha hecho a expensas de mantener altos niveles de “gasto de bolsillo” cargados al presupuesto de las familias. El pago por medicinas y servicios médicos en 2014 fue 64,3% del gasto familiar en salud, siendo uno de los más altos del mundo y el mayor de América Latina y el Caribe, en 59% superior al promedio regional.

- 95% de las medicinas, insumos, materia prima, equipos y repuestos en salud son importados. De 2012 a 2017, las importaciones cayeron 70% sin previsión ni plan de contingencia. Los cuantiosos recursos extraordinarios que recibió Venezuela en divisas, bajo control del Estado desde 2003, se utilizaron para privilegiar las importaciones antes que la producción interna. En el sector salud, las importaciones alcanzaron 95% del abastecimiento en medicinas, insumos, materias primas, equipos y repuestos. Estos niveles de importación se mantuvieron a través de endeudamiento y, a partir de 2010 el gobierno fue reduciendo la asignación de divisas a las empresas importadoras, hasta detenerlas en el año 2017, dejando una elevada deuda sin cancelar. En 2018, 74,5% de estas empresas había cerrado, así como la mayoría de los laboratorios internacionales. Entre 2012 y 2016, el recorte de divisas para importaciones del sector salud fue de 70%, precipitando una extensa y grave escasez sin ninguna previsión ni plan de contingencia. Entre 2016 y 2017 las importaciones para bienes esenciales cayeron 37%, siendo salud el sector más afectado.

- A 93% bajó el consumo per cápita de medicamentos entre 2014 y 2018 por caída de la producción interna. La escasez de medicamentos en farmacias es de 85% y en hospitales de 88%. Entre los años 2014 y 2018, el consumo de medicinas bajó de 22 a 1,5 unidades per cápita. Hasta 2018, las empresas de la industria farmacéutica nacional reportaban una caída de la producción interna de medicamentos entre 60% y 70%, debido a los excesivos recortes en la asignación de divisas para la compra de materia prima, 98% de la cual es importada, así como la pérdida de aproximadamente 60% de los trabajadores de la industria. Entre los años 2016 y 2018, la red de farmacias privadas registró una escasez de medicinas en sus anaqueles que osciló entre 80% a 85%. En 2016 cerraron 40 farmacias, en 2017 habían quebrado 125 y, en 2018, se esperaba el cierre de 100 más. En los hospitales, la escasez de medicinas aumentó de 55% a 88% entre los años 2014 y 2018, de acuerdo con los datos proporcionados por la V Encuesta Nacional de Hospitales (ENH 2018). Entre 2016 y 2018, las políticas oficiales se han limitado a medidas de racionamiento en la distribución de medicinas, cuyo acceso está sujeto a criterios y condiciones de carácter político.



II

Impactos en las Capacidades Sanitarias

- El pago de insumos, medicinas y exámenes y 90% de paralización del transporte público agrava la inaccesibilidad de la atención en los servicios de salud públicos. Debido a los bajos niveles de gasto público en salud, la protección financiera de la población ante los costos sanitarios es muy débil en Venezuela. El porcentaje de población sin seguro médico alcanzó 68% en la ENCOVI 2017, cayendo 18 puntos en relación con 2014. Entre 2014 y 2016, la cobertura de seguridad social se redujo 36%, bajando de 22% a 14%, y la de otros seguros públicos cayó 67%. En 2017, un estudio de Ipsys Venezuela en 22 salas de urgencia de los mayores centros públicos del país, confirmó que todas las medicinas e insumos eran compradas por los familiares. Durante un año de hiperinflación, los costos de las medicinas, desde los más básicos como analgésicos, hipertensivos y antibióticos, y los precios de exámenes, vacunas y anticonceptivos, además de escasos, son inaccesibles para la mayoría de la población. A ello se suma la crisis de transporte público, dado que 90% de las unidades se encuentra paralizada en todo el país, afectando las posibilidades de movilidad hacia los servicios de salud y su funcionamiento por ausentismo laboral.

- A 64% asciende el déficit de camas en Venezuela y, del total disponible, 40% está fuera de servicio por deterioro físico, equipos dañados, falta de personal y de presupuesto. En comparación con el estándar mínimo mundial de 2,3 camas por 1.000 habitantes, Venezuela presenta un déficit de 64% en la cantidad de camas con un total de 26 mil disponibles (unas 20 mil en hospitales públicos y 6 mil en privados). De 18,300 camas evaluadas en 104 hospitales públicos y 33 privados, la ENH 2018 encontró que 40% estaba fuera de servicio. El déficit es más alto en el número de camas de terapia Intensiva, el cual es superior a 60%. Las pocas camas existentes en las Unidades de Cuidado Intensivo (UCI) colapsan sólo atendiendo al gran número de casos de urgencia que llegan por accidentes de tránsito y lesiones de arma de fuego. La EHC 2018 mostró que 25% de las UCI para adultos y niños habían cerrado y que entre un 79% y 83% presentaba fallas intermitentes, lo cual obedece a que no se cuenta con monitores, ventiladores, bombas de infusión, aires acondicionados, termocunas, incubadoras, personal médico y de enfermería.

- 71% de las emergencias en la mayoría de los hospitales públicos del país no pueden prestar servicios de manera regular, 22% dejó de funcionar y 53% de los quirófanos están cerrados. Según la ENH 2018, 71% de las salas emergencia en los hospitales públicos no prestaba servicios de manera regular, 22% había dejado de funcionar y 53% de los quirófanos en 730 pabellones, se encontraba cerrado. La severa interrupción de los servicios de emergencia y cirugía obedece al elevado deterioro de las instalaciones, el gran número de equipos averiados, la extrema escasez de insumos y medicinas, el cierre o parálisis de laboratorios y la falta de personal médico y de enfermería. La ENH 2018 también reportó fallas en 97% de los tomógrafos, 94% de los servicios de Rayos X y 86% de los servicios de ecografía; así como escasez de 84% en catéteres y sondas y 79% en material médico-quirúrgico. En el principal Hospital Cardiológico Infantil G.R. Ochoa, las cirugías disminuyeron 42%. Hasta 2016, se estimaba una deuda quirúrgica de 450.000 personas. En 2017, el gobierno implementó un Plan Quirúrgico Nacional para cirugías menores y esterilizaciones, dejando sin atender a quienes están en espera de cirugías complejas y urgentes.

- 100% de laboratorios presentan fallas severas para realizar pruebas diagnósticas y 69% de los bancos de sangre no pueden garantizar tratamientos de transfusión seguros. Casi 100% de los laboratorios del sector público no pueden pruebas de rutina ni de emergencia frente a un 90% de escasez de reactivos, repuestos para equipos, insumos y materiales básicos como tubos de ensayo, inyectoras, algodón, alcohol, guantes y recolectores de muestras. En 2018, 38% de los laboratorios estaban técnicamente cerrados y 69% de los bancos de sangre que hacían pruebas serológicas a donaciones no contaban con reactivos e insumos para tamizaje de enfermedades transmisibles como hepatitis B, hepatitis C, VIH, enfermedad de Chagas, sífilis y virus linfotrópico humano. Las extremas carencias de laboratorios y bancos de sangre son la principal causa de la suspensión de cirugías y no permite garantizar tratamientos transfusionales seguros a personas con anemia, cáncer, problemas renales y hematológicos, entre otros, así como realizar otro tipo de exámenes, y el almacenamiento y transporte de la sangre y hemoderivados.

**III****Impactos en las Capacidades Sanitarias**

- 79% de los hospitales no recibe agua de manera regular y 33% no cuenta con plantas para mantener la continuidad de energía eléctrica en caso de ocurrir fallas. El colapso de servicios básicos a nivel nacional agrava los problemas de saneamiento de los centros de salud públicos, la mayoría con precarias condiciones de infraestructura. En 2018, la ENH encontró que 79% de los hospitales públicos carecía de suministro regular de agua, lo cual genera serios problemas de higiene y falta del líquido para la hidratación y alimentación de las personas hospitalizadas. Entre 2012 y 2017, las denuncias por escasez de agua subieron 8 puestos en los problemas que presentan los hospitales públicos monitoreados por Provea anualmente. Los cortes de luz, intensificados los dos últimos años por la caída de las capacidades de energía eléctrica en el país, también constituyen un aspecto de enorme preocupación dado que al menos 33% de los hospitales públicos no cuentan con plantas para mantener encendidos equipos de soporte vital en caso de fallas dentro de áreas críticas como emergencias, quirófanos y unidades de cuidado intensivo.

- Los sistemas de vigilancia epidemiológica y ambiental han decaído, aumentando los sub-registros y los vacíos de información sobre los graves problemas en la situación de salud. El menoscabo y destrucción de las capacidades sanitarias a nivel nacional afecta también los alcances y calidad de los datos que recogen los sistemas de vigilancia epidemiológica y de saneamiento ambiental, lo cual aumenta los niveles de sub-registro de mortalidad y morbilidad y los vacíos de información sobre sus causas y patrones. Además, estos sistemas han perdido capacidades para el control, investigación y seguimiento de casos por la ausencia de transporte terrestre y aéreo, y de presupuesto para gastos logísticos, trayendo como consecuencia que los equipos de trabajo no puedan realizar actividades en terreno de supervisión e inspección de establecimientos de salud, visitas a comunidades, traslado de muestras, control de vectores, aguas y residuos sólidos, así como la distribución de vacunas, medicamentos y material médico quirúrgico. A esto se suma en 2018, la falta de formas de papel para suministrar a las familias actas de nacimiento y defunción.

- El personal de salud, las personas afectadas, los periodistas y defensores afrontan prácticas de intimidación, censura y represalia por denunciar y ejercer la protesta pacífica. Entre enero y agosto de 2018, el OVCS registró 296 protestas pacíficas del personal de salud y personas afectadas por la escasez de medicinas y las graves fallas de la atención médica. Quienes denuncian y ejercen la protesta pacífica están sometidos a prácticas de intimidación y represalia por autoridades públicas, cuerpos de seguridad y grupos de civiles violentos. Entre 2015 y 2018, varios médicos fueron interrogados y amenazados de acusaciones penales por denunciar e incluso publicar trabajos de investigación que documentan muertes por la grave situación dentro de los hospitales; directores de hospitales han sido suspendidos de sus cargos por pronunciarse ante el precario estado de sus centros de salud; trabajadores del personal de salud han sido agredidos y privados de libertad por protestar y exigir respuesta a reclamos laborales; periodistas y medios de comunicación han sido censurados y bloqueados en sus páginas web por investigaciones periodísticas, entre las cuales destacan las de salud; y defensores han sido objeto de campañas de descrédito a causa de su trabajo.

- Desde 2016 no se publica ninguna cifra oficial sobre la situación de salud ni se rinde cuenta sobre el gasto ni estado de los servicios sanitarios públicos al parlamento nacional. Las estadísticas oficiales sobre la situación de salud y rendimiento de los establecimientos sanitarios desaparecieron completamente en 2016. Desde 2013 no se publican los anuarios de mortalidad y en 2016 se suspendió el acceso a los boletines epidemiológicos y muertes de notificación obligatoria. En 2018 se eliminó la página web del Ministerio de Salud donde estas estadísticas se publicaban. Desde 2016 tampoco se presentan las memorias de gestión y presupuesto público al parlamento nacional. Numerosas denuncias señalan la orden de no registrar causas de enfermedades y muertes en centros de salud públicos que perjudiquen al gobierno. En 2018, se eliminó el Centro Venezolano de Clasificación de Enfermedades (CEVECE), que velaba por la integridad y calidad técnica de los registros y estadísticas epidemiológicas y de salud. Las autoridades sanitarias han informado internacionalmente sobre una extensa red de establecimientos públicos de salud sin proporcionar datos sobre sus reales condiciones de funcionamiento y capacidades de respuesta.

**Ficha técnica**

El presente reporte sobre la Emergencia Humanitaria Compleja en el Derecho a la Salud, responde a una metodología interdisciplinaria que reunió a múltiples actores informados para compartir, contrastar y fundamentar datos sobre la situación del derecho a la salud en Venezuela, haciendo hincapié en la escala, intensidad y severidad de los daños a la salud y la vida de la población y su relación con los impactos de la situación sobre las capacidades sanitarias del país. Entre los actores participaron organizaciones de personas afectadas, profesionales en terrenos, investigadores y académicos, así como organizaciones dedicadas a la defensa del derecho a la salud, quienes realizaron varias sesiones de trabajo a fin de documentar los problemas y eventos más relevantes durante los últimos años. En estas sesiones se recogió abundante información que abarcó datos empíricos, investigaciones científicas, estadísticas oficiales y reportajes periodísticos disponibles.

Referencias consultadas

1. Lugar a donde acudió cuando necesitó atención médica durante el último año. Pág. 33. XIV Censo Nacional de Población y Vivienda. Resultados Total Nacional de la República Bolivariana de Venezuela. Instituto Nacional de Estadística (INE). En: <http://www.ine.gov.ve/documentos/Demografia/CensodePoblacionyVivienda/pdf/nacional.pdf>
2. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Memoria y Cuenta 2015. En: <https://transparencia.org.ve/wp-content/uploads/2016/07/1.-Memoria-2015-salud.pdf>
3. Encuesta sobre Condiciones de Vida Venezuela - Salud (ENCOVI 2016). Marino J. González R. Elena M. Rincón O. Unidad de Políticas Públicas-USB. En: <https://www.ovsalud.org/descargas/publicaciones/salud/UCV-UCAB-USB-ENCOVI-2016-Salud.pdf>
4. Presidente de comités de salud de Amazonas exige cierre del único hospital del estado. Wakanoticias, En: <http://wakanoticias.com/actualidad/presidente-de-comites-de-salud-de-amazonas-exige-cierre-delunico-hospital-del-estado.html>
5. ¿Laboratorios clínicos hacia el colapso total? María Yañez. Federación de Colegios de Bionlistas de Venezuela (Fecobiove). En: <https://www.fecobiove.org/comunicados/2016/laboratorios-clinicos-colapso-total.asp>
6. Los fallecidos fueron: Daniel Laya (2 años), Raziel Jaure (10 años), Samuel Becerra (12 años), Dildred Jiménez (16 años) y Bryan Puerta (16 años).
7. Informe sobre violaciones del derecho a la vida de niños y niñas en el estado Lara de Venezuela por infección de bacteria intrahospitalaria *Serratia Marcescens* en el Hospital Universitario de Pediatría Dr. Agustín Zubillaga (HUPAZ), desde 2016 hasta septiembre de 2018. Mapani Venezuela y Red de Derechos Humanos del estado Lara.
8. Las muertes silenciadas de la Maternidad Santa Ana. El Estímulo, 14.05.2018. En: <http://elestimulo.com/climax/las-muertes-silenciadas-de-la-maternidad-santa-ana/>
9. Fondo de las Naciones Unidas para la Población (UNFPA). Informe Estado de la Población Mundial 2017 "Mundos Aparte". En: <https://www.unfpa.org/es/swop>
10. Provea: Informe Anual 2016, Capítulo de Salud. En: <https://www.derechos.org.ve/web/wp-content/uploads/09Salud-3.pdf>
11. Encuesta de Condiciones de Vida (ENCOVI 2017). Marino J. González R. Elena M. Rincón O. Unidad de Políticas Públicas-USB. 21.02.2017. En: <https://www.ucab.edu.ve/wp-content/uploads/sites/2/2018/02/ENCOVI.-Salud-2017.-21-de-febrero-2017.pdf>
12. Sólo en el Hospital Ruiz y Páez hay 11 embarazadas con paludismo. El Nacional, 02. 08.17. En: http://www.el-nacional.com/noticias/sociedad/solo-hospital-ruiz-paez-hay-embarazadas-con-paludismo_196605
13. La mortalidad materna por malaria y desnutrición aumentó en indígenas. El Nacional, 18.06.2018. En: http://www.el-nacional.com/noticias/sociedad/mortalidad-materna-por-malaria-desnutricion-aumento-indigenas_226931
14. Sociedad Venezolana de Medicina Interna: Estudio Venezolano de Salud Cardiometabólica (Evescam). 01.10.2017. En: <http://estudioevescam.info.ve/jornadas/362/7-millones-400-mil-venezolanos-hipertensos-2-millones-400-mil-diabeticos-y-mas-de-8-millones-de-prediabeticos/>
15. Convite A.C.. Publicaciones en ISSUU. En: <https://issuu.com/conviteac/docs>
16. Pacientes con diabetes "en una encrucijada" ante la escasez de insulina, Efecto Cocuyo, 24.08.2017. En: <http://efectococuyo.com/principales/pacientes-con-diabetes-en-una-encrucijada-ante-la-escasez-de-insulina/> Insulinodependientes en riesgo por falta de la medicina. El Nacional, 04.11.2017. En: http://www.el-nacional.com/noticias/salud/insulinodependientes-riesgo-por-falta-medicina_201935/ Diabéticos rinden la insulina por escasez de medicinas. El Nacional, 09.07.2018. En: http://www.el-nacional.com/noticias/sociedad/diabeticos-rinden-insulina-por-escasez-medicinas_243280
17. "Entrega controlada" de tratamiento contra el paludismo contraviene estándares de la OPS y el MinSalud. Correo el Caroní, 30.01.2018. En: <http://www.correodelcaroni.com/index.php/mas/salud/item/62068-entrega-controlada-de-tratamiento->



contra-el-paludismo-contraviene-estandares-de-la-ops-y-el-minsalud

18. Informe sobre graves, masivas y sistemáticas violaciones del derecho a la salud en Venezuela como resultado de una emergencia humanitaria compleja. Codevida, 27.02.2018. En: <http://www.accionsolidaria.info/website/informe-sobre-graves-masivas-y-sistematicas-violaciones-del-derecho-a-la-salud-en-venezuela-como-resultado-de-una-emergencia-humanitaria-compleja/> / Informe sobre la situación del Derecho a la Salud de la población venezolana en el marco de una Emergencia Humanitaria Compleja. Codevida, 13.09.2018. En: <http://www.codevida.org/informes/informe-sobre-la-situacion-del-derecho-a-la-salud-de-la-poblacion-venezolana-en-el-marco-de-una-emergencia-humanitaria-compleja>
19. Video de Belkis Solorzano, de 50 años de edad, fallecida el 12 de noviembre de 2017, horas después de grabar es video pidiendo por su vida. Ella perdió su riñón después de pasar 3 meses sin tomar sus medicamentos. En: https://www.youtube.com/watch?v=Fg_1gewFIPE / Video de Marta Solorzano, En: https://twitter.com/hashtag/NoMasMuertesPorSalud?src=hash&ref_src=twsrc%5Etfw%7Ctwcamp%5Eembeddedtimeline%7Ctwtterm%5Eprofile%3Acodevida&ref_url=http%3A%2F%2Fwww.codevida.org%2Finformes
20. Centro Nacional de Bioética. Comunicado público, 18 de junio de 2018. En: http://www.svh-web.org.ve/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=167&Itemid=18
21. Hospital Luis Razetti solo cubre el 30% de las quimioterapias que necesitan sus pacientes. Efecto Cocuyo, 26.09.2018. En: <http://efectococuyo.com/salud/hospital-luis-razetti-solo-cubre-el-30-de-las-quimioterapias-que-necesitan-sus-pacientes/>
22. Sociedad Venezolana de Salud Pública y otras: ¿Qué sucede con el Programa Nacional de Cáncer en Venezuela? Mención especial a la operatividad de los equipos de radioterapia y medicina nuclear, de la red pública de centros oncológicos (MPPS-IVSS). José Félix Oletta L. y Carlos Walter V. Febrero de 2018. En: <https://www.ovsalud.org/publicaciones/salud/que-sucede-con-el-programa-nacional-de-cancer-envenezuela/>
23. La carga económica de las condiciones cardíacas en Venezuela. Aspectos epidemiológicos de la medicina interna en Venezuela. Med Interna (Caracas) 2017; 33 (1): 42 – 50. En: <http://www.svmi.web.ve/ojs/index.php/medint/article/view/415/408>
24. Monitoreo síndromes coronarios agudos en Venezuela. 2018. Sociedad Venezolana de Cardiología. En: http://svcardiologia.org/es/images/documents/resumen_encuesta_SVC_24_09_2018.pdf
25. La salud pública pierde avances de casi 7 décadas de la medicina privada. El Nacional, 23.07.2018. En: http://www.el-nacional.com/noticias/sociedad/salud-publica-pierde-avances-casi-decadas-medicina-privada_245031
26. Posición de los cardiólogos venezolanos ante la crisis de salud. Sociedad Venezolana de Cardiología. 05-07.2016. En: <https://svcardiologia.org/es/index.php/info/483-cardiologos-venezuela-crisis-salud.html> / Especial ND: El Hospital Clínico Universitario de Caracas inicia 2018 en terapia intensiva. Noticiero Digital, 03.01.2018- En: <http://www.noticierodigital.com/forum/viewtopic.php?t=90581>
27. Primera presentación: Infección por VIH en comunidad Warao. Flor Pujol (Laboratorio de Virología Molecular, IVIC, Caracas, Venezuela). En: <http://www.derechos.org/ve/pw/wp-content/uploads/VIH-Warao-FPujol-TRANSCRIPCIC3%93N-1.pdf> / SIDA en la Población Warao, Dr. Martín Carvallo del Hospital Universitario de Caracas. 30.09.2017. En: <http://www.accsi.org.ve/accsi/wp-content/uploads/Dr-Martin-Carballo-SIDA-en-la-poblaci%C3%B3n-Warao-Venezuela-Jornada-ACCSI-30.09.17.pdf> / "Imaginar el futuro de la tribu da miedo": la epidemia de VIH que diezma a una etnia indígena latinoamericana". BBC Mundo, 11.01.2018. En: <http://www.bbc.com/mundo/noticias-42569300>
28. El Derecho a la No Discriminación por VIH en Venezuela. Observatorio e Derechos Humanos en VIH y Sida. Acción Solidaria y otras organizaciones de VIH. Septiembre, 2011. Pág. 123. En: <http://www.accionsolidaria.info/website/wp-content/uploads/2016/02/El-Derecho-a-la-No-Discriminacion-por-VIH-en-Venezuela-Informe-AcSol-Septiembre-2011.pdf>
29. 77.000 pacientes con VIH se quedan sin tratamiento. El Nacional, 29.11.2017. En: http://www.el-nacional.com/noticias/crisis-humanitaria/77000-pacientes-con-vih-quedan-sin-tratamiento_213352
30. Plan Maestro de la OPS para fortalecer la respuesta del VIH, tuberculosis y malaria en Venezuela. Véase: ACCSI: Conoce el Plan Maestro de la OPS para fortalecer la respuesta del VIH, tuberculosis y malaria en Venezuela, 18.07.2018. En: <http://www.accsi.org.ve/noticias/conoce-el-plan-maestro-de-la-ops-para-fortalecer-la-respuesta-del-vih-tuberculosis-y-malaria-en-venezuela.html>
31. Tres pacientes con VIH mueren al día por falta de medicinas en Carabobo. El Nacional, 16.01.2018 / Eduardo Franco: Más de tres mil pacientes con VIH han muerto este año. Noticiero 52, 20.07.2018. En: <https://noticiero52.com/mavid-gobierno-sigue-sin-traer-medicamentos-para-pacientes-con-vih/> / Eduardo Franco: 20 pacientes con VIH fallecen diariamente en Venezuela. Noticiero 52, 31.08.2018. En: <https://noticiero52.com/eduardo-franco-20-pacientes-con-vih-fallecen-diariamente-en-venezuela/>
32. La condena a muerte de personas con sida en Venezuela. Acción Solidaria, 11.11.2018. En: <http://www.accionsolidaria.info/website/la-condena-a-muerte-de-personas-con-sida-en-venezuela/>
33. Pacientes renales se enfrentan a la crisis de las unidades de diálisis. La Razón, 2015. En: <https://www.larazon.net/2015/03/pacientes-renales-se-enfrentan-a-la-crisis-de-las-unidades-de-dialisis/> Derechos fundamentales y garantías constitucionales en las enfermedades catastróficas: pacientes renales claman por ayuda humanitaria en Venezuela. Aministía Internacional,



- 13.08.2017. En: <https://www.amnistia.org/ve/blog/2017/08/3363/derechos-fundamentales-en-las-enfermedades-catastroficas>
34. 32 unidades de diálisis cerraron por falta de insumos. El Nacional, 01.02.2018. En: http://www.el-nacional.com/noticias/salud/unidades-dialisis-cerraron-por-falta-insumos_221256
 35. El IVSS tiene 1.000 máquinas de diálisis dañadas en todo el país. El Nacional, 14.05.2018. En: http://www.el-nacional.com/noticias/sociedad/ivss-tiene-1000-maquinas-dialisis-danadas-todo-pais_234803 / 830 pacientes renales sin diálisis en una semana en Aragua y Sucre. El Nacional, 15.05.2018. En: http://www.el-nacional.com/noticias/salud/830-pacientes-renales-sin-dialisis-una-semana-aragua-sucre_235152
 36. Suspenden diálisis en el J.M. de los Ríos por desbordamiento de aguas negras en Nefrología. Efecto Cocuyo, 16.05.2018. En: <http://efectococuyo.com/salud/suspenden-dialisis-en-el-jm-de-los-rios-por-desbordamiento-de-aguas-negras-en-nefrologia/> / Diálisis. La Patilla. En: <https://www.lapatilla.com/tag/dialisis/>
 37. OMS/IESM: Informe sobre el sistema de salud mental en la República Bolivariana de Venezuela. 2013. En: http://www.who.int/mental_health/who_aims_country_reports/venezuela_who_aims_report.pdf
 38. La enfermedad mental y la escasez convergen en una realidad dantesca en Venezuela. NYtimes, 02.10.2016. En: <https://www.nytimes.com/es/2016/10/02/la-enfermedad-mental-y-la-escasez-convergen-en-una-realidad-dantesca-en-venezuela/>
 39. Psiquiatras alertan que los diagnósticos de depresiones en el país van en ascenso. Crónica Uno, 10.10.2016. En: <http://cronica.uno/psiquiatras-alertan-los-diagnosticos-depresiones-pais-van-ascenso/>
 40. “Las condiciones de salud de los venezolanos: aportes de ENCOVI 2016”. Marino J. González R. y Elena Rincón. Pág. 145. Las condiciones de vida de los venezolanos: ¿hasta cuándo? ENCOVI 2016. Anitza Freitez (Coordinadora). 2017. En: <https://encovi.ucab.edu.ve/wp-content/uploads/sites/2/2018/02/encovi-2016-venezuela-la-caida-sin-fin-hasta-cuando.pdf>
 41. La salud mental del venezolano se deteriora al ritmo de la crisis. Patricia Marcano. La Razón, 2016. En: <https://www.larazon.net/2016/10/la-salud-mental-del-venezolano-se-deteriora-al-ritmo-de-la-crisis/>
 42. 3.500 pacientes psiquiátricos están amenazados de desalojo. El Nacional, 21.03.2018. En: http://www.el-nacional.com/noticias/sociedad/3500-pacientes-psiquiatricos-estan-amenazados-desalojo_227697
 43. OMS: Puntos clave: Informe mundial sobre el paludismo 2017. 29.09.2017. En: <http://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2017/es/>
 44. Observatorio Venezolano de la Salud (OVS): Oscar Noya: Es imposible controlar la malaria mientras exista la minería ilegal. En: <https://www.ovsalud.org/noticias/2016/imposible-controlar-malaria-miner%C3%ADa-ilegal/>
 45. OPS: Respuesta de la OPS para mantener una agenda eficaz de cooperación técnica en Venezuela y en los estados miembros vecinos. 20 de junio de 2018. En: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=162-es-9842&alias=45497-ce162-inf-22-s-respuesta-ops-ct-497&Itemid=270&lang=es
 46. OMS: Venezuela registra el mayor incremento de casos de malaria en el mundo. El Universal, 24.04. 2018. En: <http://www.eluniversal.com/venezuela/7094/oms-venezuela-registra-mayor-incremento-casos-malaria-mundo> / Pronunciamento ante la grave epidemia de Malaria en Venezuela. Carta Abierta al Ciudadano Luis López, Ministro del Poder Popular para la Salud de la República Bolivariana de Venezuela. 18 de enero de 2018. En: <https://www.ovsalud.org/publicaciones/salud/epidemia-malaria-venezuela/> / La malaria sigue expandiéndose en territorio venezolano. Revista SIC, 25.04.2018. En: <http://revistasic.gumilla.org/2018/la-malaria-sigue-expandiendose-en-territorio-venezolano/>
 47. Venezuela perdió la guerra epidemiológica. El Estímulo, 17.11.2016. En: <http://elestimulo.com/climax/venezuela-perdio-la-guerra-epidemiologica-mapa/> / Pronunciamento ante la grave epidemia de Malaria en Venezuela. Carta Abierta al Ciudadano Luis López, Ministro del Poder Popular para la Salud de la República Bolivariana de Venezuela. 18.01.2018. En: http://www.svmi.web.ve/wh/documentos/carta_abierta.pdf
 48. Sociedad Venezolana de Salud Pública / Red Defendamos la Epidemiología Nacional: Reporte sumario de la compleja situación de malaria en Venezuela. 20.12.2017. En: <http://www.svinfectologia.org/images/stories/Malaria/MalariaSVSPRDE20diciembre2017.pdf>
 49. Centro de Estudios sobre Malaria registró 1.400 casos de paludismo en primeros meses de 2018. Efecto Cocuyo, 28.06.2018. En: <http://efectococuyo.com/salud/centro-de-estudios-sobre-malaria-registro-1-400-casos-de-paludismo-en-primeros-meses-de-2018/>
 50. OMS. Tuberculosis. Venezuela (República Bolivariana de). En: https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=/WHO_HQ_Reports/G2/PROD/EXT/TBCountryProfile&ISO2=VE&outtype=html&LAN=ES
 51. Tuberculosis. Jorge Díaz Polanco. Observatorio Venezolano de la Salud. En: <https://www.ovsalud.org/boletines/salud/tuberculosis/>
 52. AIPOP. Re emergencia de Tuberculosis en Venezuela Algunos datos recopilados en Enero 2018. José Félix Oletta L. En: <https://docplayer.es/84684655-Re-emergencia-de-tuberculosis-en-venezuela.html>
 53. La muerte y la violencia asedian a los privados de libertad. Situación de los derechos Humanos en los Centros de Detención Preventiva en Venezuela (2017). Una Ventana a la Libertad (UVAL). En: <http://unaventanaalalibertad.org/wp-content/>



uploads/2018/04/INFORME-ANUAL-2017-CDP-UVAL-LT.pdf / "Informe de la Situación de los derechos Humanos de los Privados de Libertad en Centros de Detención Preventiva en Venezuela, durante el primer semestre de 2018 (enero-junio)". Una Ventana a la Libertad (UVAL). En: <http://unaventanaalibertad.org/wp-content/uploads/2018/08/UVL-Informe-semestral-DDHH-CDP-15-08-2018R.pdf>

54. OMS: Actualización Epidemiológica Difteria, 16 de diciembre de 2016. En: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2016-dic-16-phe-actualizacion-epi-difteria.pdf>
55. Gobierno oculta que han muerto 17 niños con difteria desde abril. Correo del Caroní, 28.09.2016. En: <http://www.correodelcaroni.com/index.php/mas/salud/item/49991-gobierno-oculta-que-han-muerto-17-ninos-con-difteria-desde-abril>
56. Sociedad Venezolana de Salud Pública y Red Defendamos la Epidemiología Nacional | Alerta Difteria. 12.10.2016. En: <https://www.derechos.org/ve/actualidad/sociedad-venezolana-de-salud-publica-y-red-defendamos-la-epidemiologia-nacional-alerta-difteria>
57. OMS: Actualización Epidemiológica Difteria, 20 de agosto de 2018. En: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=2018-9582&alias=46164-29-de-agosto-de-2018-difteria-actualizacion-epidemiologica&Itemid=270&lang=es
58. OMS: Actualización Epidemiológica Sarampión, 21 de septiembre de 2018. En: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=sarampion-2183&alias=46337-21-de-septiembre-de-2018-sarampion-actualizacion-epidemiologica&Itemid=270&lang=es
59. Difteria. Observatorio Venezolano de la Salud (OVS). En: <https://www.ovsalud.org/boletines/salud/difteria/> / 54% de niños no fue vacunado contra el sarampión en 2017. El Nacional, 13.04.2018. En: http://www.el-nacional.com/noticias/sociedad/ninos-fue-vacunado-contra-sarampion-2017_230766
60. Evolución de la pobreza. ENCOVI. Encuesta de Condiciones de Vida. Venezuela, febrero 2018. Luis Pedro España y María Gabriela Ponce. UCAB/LACSO. En: <https://www.ucab.edu.ve/wp-content/uploads/sites/2/2018/02/ENCOVI-2017-presentaci%C3%B3n-para-difundir-.pdf>
61. Federación Médica Venezolana: 22 mil médicos se han ido al exterior. En: <http://runrun.es/nacional/341472/federacion-medica-venezolana-22-mil-medicos-se-han-ido-al-exterior.html>
62. Se gradúa V cohorte de médicos integrales comunitarios. 14.06.2016. En: <http://www.minci.gob.ve/se-gradua-v-cohorte-de-medicos-integrales-comunitarios/>
63. Laboratorios de la red pública están paralizados por falta de reactivos, tubos de ensayo y algodón. El Universal, 25.04.2018. En: <http://www.eluniversal.com/caracas/7304/medicos-obligados-hacer-diagnosticos-ciegas>
64. Encuesta Nacional del Sistema y la Organización de la Salud. Venezuela, septiembre 2018 (Enfermería Vzla2018). Elaborada por Mgcs (Abg). Julio García, Lcda. (Abg.) Ana Rosario Contreras y Dr. Rolando Smit (UC), y presentada en el Encuentro Nacional del Sector Salud Venezolano "Evidenciando el verdadero rostro de la crisis hospitalaria". 12 de septiembre de 2018.
65. 50 por ciento, es el déficit de enfermeros en Venezuela. El Carabobeno, 12.05.2017. En: <https://www.el-carabobeno.com/50-ciento-deficit-enfermeros-venezuela/>
66. Indicadores Básicos. Situación de Salud de las Américas, 2017. En: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34330/IndBrasicos2017_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
67. Sistema de salud en Venezuela: ¿un paciente sin remedio? Alejandra Carrillo Roa. CSP Caderno de Saúde Pública, 2018. En: <http://www.scielo.br/pdf/csp/v34n3/1678-4464-csp-34-03-e00058517.pdf>
68. El "gasto de bolsillo en salud" engloba todos los tipos de gastos sanitarios del hogar (honorarios de médicos, compras de medicamentos y facturas de hospital, medicina alternativa y tradicional). No incluye gastos de transporte para acudir a centros de salud, nutrición especial y los reembolsos realizados por un seguro.
69. Gasto de bolsillo en salud en América Latina (1995-2013): evolución e implicaciones de políticas. Marino J. González R. Trabajo de Incorporación como Miembro Correspondiente Nacional Puesto # 39 de la Academia Nacional de Medicina. Venezuela. Agosto, 2016. En: <http://www.anm.org.ve/anm/saciindex.php>
70. Producción de medicinas cayó 60% en 4 años por falta de divisas. El Nacional, 17.02.2018. En: http://www.el-nacional.com/noticias/economia/produccion-medicinas-cayo-anos-por-falta-divisas_223454
71. Cifar: Inventarios de medicamentos alcanzan hasta abril. 09.12.2016- En: http://www.el-nacional.com/noticias/economia/cifar-inventarios-medicamentos-alcanzan-hasta-abril_25802
72. Salud desmantelada (I). Crónica Uno, 22-07.2018. En: <http://cronica.uno/salud-desmantelada-i/>
73. Compañías farmacéuticas internacionales se retiran de Venezuela. 11.03.2016. En: <https://www.arsenalterapeutico.com/2016/03/11/companias-farmaceticas-internacionales-se-retiran-de-venezuela/>
74. Venezuela: Anatomía de un colapso. Douglas Barrios y Miguel Ángel Santos, 2016. En: <https://politikaucab.files.wordpress.com/2018/04/venezuela-anatomia-de-un-colapso.pdf>
75. Importaciones esenciales de Venezuela se contrajeron 28,1% en julio. Efecto Cocuyo, 03.10.2017. En: <http://efectococuyo.com/principales/importaciones-esenciales-de-venezuela-se-contrajeron-281-en-julio/>



76. CIFAR: Consumo de medicinas por persona se redujo de 22 a 1,5 unidades en 4 años. El Nacional, 11.06.2018. En: http://www.el-nacional.com/noticias/economia/consumo-medicinas-por-persona-redujo-unidades-anos_239440
77. Consumo de medicinas por persona se redujo de 22 a 1,5 unidades en 4 años. El Nacional, 11.06.2018. En: http://www.el-nacional.com/noticias/economia/consumo-medicinas-por-persona-redujo-unidades-anos_239440
78. Fefarven asegura que escasez de medicamentos en el país oscila entre 80% y 85%. El Universal, 15.17.2018. En: <http://www.eluniversal.com/politica/15032/fefarven-escasez-de-medicamentos-oscila-entre-80-y-85> / La Federación Farmacéutica Venezolana cifra la escasez de medicinas en un 85 %. EFE, 27.01.2017. En: <https://www.efe.com/efe/america/sociedad/la-federacion-farmacautica-venezolana-cifra-escasez-de-medicinas-en-un-85/20000013-3161928> / Fefarven: 85% de escasez en medicinas llevó al cierre a más de 40 farmacias. Efecto Cocuyo, 31.10.2016. En: <http://efectococuyo.com/principales/feffarven-85-de-escasez-en-medicinas-llevo-al-cierre-a-mas-de-40-farmacias/>
79. Fefarven: Alrededor de 125 farmacias quebraron hasta el año pasado. El Nacional, 26.06.2018- En: http://www.el-nacional.com/noticias/crisis-humanitaria/feffarven-alrededor-125-farmacias-quebraron-hasta-ano-pasado_241549
80. V Encuesta Nacional de Hospitales, marzo 2018 (ENH 2018). Red de Médicos por la Salud y Asamblea Nacional. En: https://docs.wixstatic.com/ugd/4671e5_a4bc5d9a6f3f4e3f8c3983ba278a85b0.pdf
81. Exigen carnet de la patria para dar medicina. El Nacional, 29.07.17. En: http://www.el-nacional.com/noticias/sociedad/exigen-carnet-patria-para-dar-medicinas_195815
82. Encuesta de Condiciones de Vida (ENCOVI 2017). Marino J. González R. Elena M. Rincón O. Unidad de Políticas Públicas-USB. 21.02.2017. En: <https://www.ucab.edu.ve/wp-content/uploads/sites/2/2018/02/ENCOVI.-Salud-2017.-21-de-febrero-2017.pdf>
83. Las condiciones de salud de los venezolanos: aportes de ENCOVI 2016. Pág. 146. Marino J. González R. y Elena Rincón Osorio. Venezuela. La caída sin fin, ¿hasta cuándo? Encuesta Nacional de Condiciones de Vida 2016 (ENCOVI 2016). Anitza Freitez (coordinadora). En: <https://encovi.ucab.edu.ve/wp-content/uploads/sites/2/2018/02/encovi-2016-venezuela-la-caida-sin-fin-hasta-cuando.pdf>
84. Ipys Venezuela: Huérfanos de la Salud. Capítulo 5. Sobrevivir a la Emergencia. En: <https://ipysvenezuela.org/huerfanosdela-salud/>
85. Medicinas aumentan hasta 200%, mientras que farmacias temen su cierre. Efecto Cocuyo, 10.11.2016. En: <http://efectococuyo.com/principales/medicinas-aumentan-hasta-200-mientras-que-farmacias-temen-su-cierre/> / Medicinas duplican sus precios todos los meses- La Verdad de Vargas, 29.02.2017. En: <http://laverdaddevargas.com/24/medicinas-duplican-precios-todos-los-meses/2017/07/29/> / Se requieren millones para comprar cualquier medicamento en Venezuela. Panorama, 20.06.2018. En: <https://www.panorama.com.ve/ciudad/Se-requieren-millones-para-comprar-cualquier-medicamento-en-Venezuela-20180618-0063.html>
86. 90% del Transporte público está paralizado en Venezuela. 06.07.2018. En: <https://www.analitica.com/economia/90-del-transporte-publico-esta-paralizado-en-venezuela/>
87. Falta de transporte para el personal agrava crisis hospitalaria en Ciudad Guayana. Correo del Caroní, 04.01.2018. En: <http://correodelcaroni.com/index.php/mas/salud/item/61631-falta-de-transporte-para-el-personal-agrava-crisis-hospitalaria-en-ciudad-guayana> / Modifican guardias en hospitales de Vargas por escasez de transporte. El Nacional, 15.03.2018. En: http://www.el-nacional.com/noticias/sociedad/modifican-guardias-hospitales-vargas-por-escasez-transporte_226953 / Sector transporte se declara en crisis. NTN 21, 01.10.2018. En: <http://www.ntn24.com/america-latina/venezuela/sector-transporte-se-declara-en-emergencia-98519>
88. Red de Médicos por la Salud y Asamblea Nacional: V Encuesta Nacional de Hospitales, Mayo 2018. En: https://docs.wixstatic.com/ugd/4671e5_a4bc5d9a6f3f4e3f8c3983ba278a85b0.pdf
89. Red de Médicos por la Salud y Asamblea Nacional: V Encuesta Nacional de Hospitales, Mayo 2018. En: https://docs.wixstatic.com/ugd/4671e5_a4bc5d9a6f3f4e3f8c3983ba278a85b0.pdf
90. Hospital Cardiológico Infantil Latinoamericano Gilberto Rodríguez Ochoa. En: <http://www.cardiologicoinfantil.gob.ve/info/MATriz31demayo.pdf>
91. Los números rojos del Ministerio de Salud. La Razón, 2016. En: <https://www.larazon.net/2016/03/los-numeros-rojos-del-ministerio-de-salud/> / Registran 100% de escasez en inventarios de insumos médicos. La Razón, 2015. En: <https://www.larazon.net/2015/01/registran-100-de-escasez-en-inventarios-de-insumos-medicos/>
92. Más de 96 mil personas atendidas por Plan Quirúrgico Nacional. MINCI, 06.09.2017. En: <http://www.minci.gob.ve/mas-de-96-mil-personas-atendidas-por-plan-quirurgico-nacional/> / Plan Quirúrgico Nacional realizó el pasado año 431.574 intervenciones en todo el país. Correo del Orinoco, 06.06.2018. En: <http://www.correodelorinoco.gob.ve/plan-quirurgico-nacional-realizo-el-pasado-ano-431-574-intervenciones-en-todo-el-pais/>
93. Deuda con pacientes se mantiene a pesar del Plan Quirúrgico Nacional. La Verdad de Vargas, 09.08.2017. En: <http://laverdaddevargas.com/24/deuda-pacientes-se-mantiene-pegar-del-plan-quirurgico-nacional/2017/08/09/>
94. ¿Laboratorios clínicos hacia el colapso total? María Yañez. Federación de Colegios de Bionlistas de Venezuela (Fecobiove).



- En: <https://www.fecobiove.org/comunicados/2016/laboratorios-clinicos-colapso-total.asp>
95. Carta al Defensor del Pueblo, Alfredo Ruiz, de la Federación de Colegios de Bionalistas de Venezuela (Fecobiove). En: <https://www.fecobiove.org/comunicados/2018/2018-01-30.asp>
 96. Consecuencias de las fallas y escasez de reactivos y pruebas diagnósticas en los servicios de bioanálisis. Sociedad Venezolana de Hematología (SVH) y su Grupo Cooperativo de Medicina Transfusional (GCMT). Caracas, 18 de enero del 2018. <https://www.fecobiove.org/comunicados/2018/fallas-escasez-reactivos-pruebas-diagnosticas-bioanalisis.asp>
 97. Hospitales del país se quedan sin sangre por falta de reactivos. El Nacional, 22.01.2018. En: http://www.el-nacional.com/noticias/sociedad/hospitales-del-pais-quedan-sin-sangre-por-falta-reactivos_219797 Sangre segura. Con motivo de la celebración del día del Bioanalista 2018. Ante la emergencia compleja que sufre Venezuela. (Fecobiove). En: <https://www.fecobiove.org/comunicados/2018/sangre-segura.asp>
 98. Provea: Informe Anual 2017. Capítulo Salud. En: <https://www.derechos.org.ve/web/wp-content/uploads/09Salud-1-2.pdf>
 99. Infraestructura Hospitalaria en Venezuela: Medidas Urgentes para Victorias Tempranas. Convite AC, 2018.
 100. Nacidos sin derecho a identidad (I). Crónica Uno, 30.09. 2018. En: <http://cronica.uno/nacidos-sin-derecho-a-identidad-i/>
 101. El viacrucis de obtener actas de defunción y cédulas para niños. El Nacional, 30.09. 2018. En: http://www.el-nacional.com/noticias/sociedad/viacrucis-obtener-actas-defuncion-cedulas-para-ninos_253758
 102. Conflictividad social en Venezuela durante agosto de 2018. Observatorio Venezolano de Conflictividad Social (OVS). En: <https://www.observatoriodeconflictos.org.ve/destacado/conflictividad-social-en-venezuela-durante-agosto-de-2018>
 103. Sebin detuvo y liberó al presidente de la Asociación de Clínicas y Hospitales: fue interrogado. Noticias24, 06.02.2015. En: <http://www.noticias24.com/venezuela/noticia/273338/extraoficial-presidente-de-la-asociacion-venezolana-de-clinicas-y-hospitales-fue-detenido-por-el-sebin/>
 104. #INFORME Fiscalía 16 del MP investigará denuncia realizada por el director del HUPAZ sobre *serratia marcescens* #30Jul. El Impulso, 30.07.2018. En: <https://www.elimpulso.com/noticias/informe-fiscalia-16-del-mp-investigara-denuncia-realizada-por-el-director-del-hupaz-sobre-serratia-marcescens-30jul>
 105. Doctor Jorge Pérez: Por salvar la Maternidad del Sur me suspendieron. El Carabobeño, 01.05.2017. En: <https://www.el-carabobeno.com/doctor-jorge-perez-salvar-la-maternidad-del-sur-me-suspendieron/>
 106. Trabajadores denunciaron agresiones en el Hospital Vargas. La Verdad.com, 12.05.2018. En: <http://www.laverdad.com/zulia/141109-trabajadores-denunciaron-agresiones-en-el-hospital-vargas.html> / Liberados médicos y trabajadores de la salud detenidos en la Comandancia de la Policía por protestar pacíficamente. El Carabobeño, 24.05.2018. En: <https://www.el-carabobeno.com/1499300-2/>
 107. Director de El Pitazo: "Bloqueos a medios digitales violan los DD HH". El Nacional, 16.07.2018. En: http://www.el-nacional.com/noticias/sociedad/director-pitazo-bloqueos-medios-digitales-violan-los_244209
 108. 116 ONG de DDHH respaldan a Francisco Valencia de Codevida ante acusaciones del ministro Luis López. Codevida, 12.06.2018. En: <http://www.codevida.org/agenda-en-accion/116-ong-de-ddhh-respaldan-a-francisco-valencia-de-codevida-ante-acusaciones-del-ministro-luis-lopez/> / Codevida: Denunciamos ante la Fiscalía y la Defensoría las falsas acusaciones de López en contra de Valencia. 12.06.2018. En: <http://www.codevida.org/agenda-en-accion/denunciamos-ante-la-fiscalia-y-la-defensoria-por-las-falsa-acusaciones-de-lopez-en-contra-de-valencia>
 109. Sociedad Venezolana de Salud Pública/ Red Defendamos la Epidemiología. Comunicado: La eliminación del Centro de Clasificación de Enfermedades (CEVECE) y Centro Cooperador de la OMS/OPS, daña gravemente la salud pública, debilita al Ministerio del Poder Popular para la Salud y reduce la capacidad institucional para atender eficientemente, la compleja carga de enfermedades que sufre la población. En: <https://drive.google.com/file/d/1RqpvNOxv1782T62zSS03y5jydBqqi2KF/view>

Nota: Agradecimiento a las instituciones que conforman el grupo de trabajo que elaboró este Reporte Nacional, Emergencia Humanitaria Compleja en Venezuela DERECHO A LA SALUD por autorizar su divulgación a través de nuestra revista y en especial, a la Dra. Griselda Ferrara de Giner, Profesor Titular del Departamento de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, de la UCV, quien facilitó este importante material.



ADIÓS A UN GRAN UCEVISTA: JESÚS ALBERTO GONZÁLEZ VEGAS

Médico Cirujano de la Universidad Central de Venezuela (UCV) 1962. PhD. Universidad de Birmingham, Inglaterra 1972 Investigador en el área de neurofisiología. Profesor titular Cátedra de Fisiología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina UCV. Coordinador de la Subcomisión de Publicaciones y divulgación del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico CDCH-UCV. Miembro de la Comisión de Publicaciones del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas CONICIT/FONACIT. Miembro de MUY ACTIVO DE ASEREME. Integrante de varios comités EDITORIALES. Editor de Vitae. Especialista en revistas científicas.

Médico, Docente, Investigador, Científico, Editor, UCEVISTA.

FOTÓGRAFO, GRAN LECTOR, ASESOR, FILÓSOFO, Y GRAN AMIGO.

HUELLAS: Fue un incansable Ucevista, mantuvo un excelente desempeño en el trabajo académico y de investigación, un gran editor, su sincera amistad, compromiso y su visión de Universidad marco huellas en todos sus amigos, alumnos y compañeros.

Fundó, junto a otros profesores, el laboratorio de Electrofisiología en la Escuela de Bioanálisis; de sus investigaciones surgieron numerosas publicaciones en revistas nacionales e internacionales. DOCENTE, EDITOR, Formador de EDITORES...

Nuestra amistad data desde los años 1966 cuando me desempeñe en la Biblioteca del Instituto de Medicina Experimental/UCV. Dónde fue un "Lector permanente".

Hacia la década 70-80, se incorporó como asesor permanente y miembro fundador del SINADIB (Sistema Nacional de Información Biomédica, conducido por la Lic. Alecia Freites de Acosta, fue /Asesor./

y Miembro del Consejo Editorial de ACTA MEDICA VENEZOLANA trabajó y compartió su vida académica y científica con los doctores Horacio Vanegas, Tulio Arends, Francisco De Venanzi, Germán Camejo, E. Coll-García, H. García Arocha, Carrasco Formiguera, Isis Nezer de Landaeta, Virgilio Bosch, Héctor Arrechadera, Maritza Landaeta y muchos otros.

Desde la década de 1980- fue asesor de varios comités editoriales y trabajó de manera muy especial el tema de las Revistas y las políticas científicas, y formó parte del Comité de Publicaciones de ASEREME, FONACIT y de APIU.

Para la década de 1990- realizó junto a un destacado grupo de docentes entre ellos los doctores Herbert Stegemann, Hebe Vesuri, Aura López, Consuelo Ramos, y muchos otros participantes la Comisión Revistas científicas de FONACIT (Programa de Evaluación y Financiamiento de Revistas Científicas nacionales. Coordinó durante varios años, con mucho acierto, la Comisión de Publicaciones del CDCH (Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico/UCV. Participa en varios Comités editoriales: Dicta y participa en varios talleres y foros sobre este importante tema, iniciador del movimiento "Open Access" acceso abierto a las publicaciones científicas, trabajó como miembro muy activo de la APIU/UCV La actividad editorial fue una de sus pasiones.

Fue Editor-Jefe de la Revista de VITAE (Una de las primeras revistas electrónicas del país) / Asesor e integrante de varios comités editoriales y estableció importantes vínculos con WAME (Asociación Mundial de Editores Médicos), el Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (CIERM), entre otros, con grupos de Editores del Reino Unido y otros países, y fue un activo participante como facilitador de gran número de cursos y talleres, creyó fielmente en la formación de editores, donde desempeñó una intensa actividad en ASEREME (Asociación de Editores de Revistas Biomédicas Venezolanas).

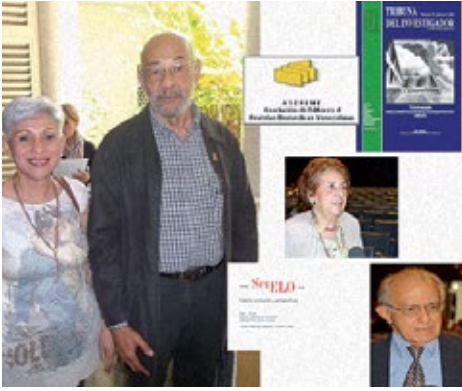
En el CDCH UCV, su asesoría fue perenne, indicando los caminos de cambios que se han establecidos en la investigación y las publicaciones universitaria, en las últimas décadas.

Jesús Alberto González Vegas, ilustre docente e incansable investigador, entrañable ser humano, que deja una huella indeleble y permanente en todas las personas que tuvimos la dicha de conocerlo. Orgullo de nuestra Alma Máter.

Expresamos y deseamos dejar constancia para la universidad nuestra tristeza y profundo dolor por la muerte de nuestro gran amigo Jesús Alberto González Vegas. Hombre excepcional, gran amigo, de ideas de avanzada, crítico constructivo, ucevista integral, investigador, gran lector, amante de la música y la fotografía, gran humanista.

Para la APIU representa una gran pérdida, especialmente su trabajo permanente en el Comité editorial de nuestra Revista Tribuna del Investigador, con su conocimiento, su innovación, ética, actualización y visión de futuro, gran orientador, hombre de consenso, de ideas claras, siempre nos motivó con sus acertados análisis académicos... Se nos fue un gran venezolano, un gran amigo, pero nos queda su obra, su ejemplo y sus ideas. A toda su familia nuestras condolencias y en especial a sus hijas, a Carmen Gabriela González, de la Escuela de Idiomas Modernos UCV. Amigo siempre permanecerá en nosotros,

CONSUELO RAMOS DE FRANCISCO
Editor-Jefe Tribuna del Investigador



LA ASOCIACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA INVESTIGACION UNIVERSITARIA DE LA UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA (APIU/UCV)

Cumple con el penoso deber de informar el sensible fallecimiento del Doctor.

JESÚS ALBERTO GONZÁLEZ VEGAS (QEPD)

Médico-cirujano, Investigador en el área de Neurofisiología, PhD en Neurofisiología (Birmingham, Reino Unido). Profesor Titular de la cátedra de Fisiología, Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela. Editor Científico de la Revista VITAE. Academia Biomédica Digital. Miembro de la Directiva de la Asociación Nacional de Revistas Médicas (ASEREME), Fue Miembro activo de ASOVAC, y permanente asesor de varias instituciones, así como de la Comisión de Publicaciones del CDCH/UCV,

Apreciado miembro de nuestra asociación, siempre permanente colaborador y miembro activo del Comité Editorial de nuestra revista Tribuna del Investigador.

Hombre ejemplar, entrañable amigo y siempre dispuesto a colaborar con el rescate y la excelencia en la UCV, Ucevista cabal y comprometido, ejemplo de vida.

Hacemos llegar nuestras más sentidas palabras de condolencia a su hija, demás familiares, amigos y compañeros, en tan triste momento por esta irreparable pérdida.

Caracas, 8 de abril, 2018.

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

TÍTULO DEL TRABAJO EN LETRA FUENTE TIMES NEW ROMAN, TAMAÑO 12, ALINEADO AL CENTRO. MAYÚSCULA, NEGRITA

Un espacio de línea en blanco (todas las líneas en blanco en Times New Roman, Tamaño 10)

Nombre y Apellido de los autores (en todos los casos, omitir títulos profesionales o académicos) centrados y escritos en Times New Roman, Tamaño 10, efecto Versales. Seguido de la Institución donde trabaja y el email.

Ejemplo:

CONSUELO RAMOS¹ y GABRIELA CONTRERAS²

¹Universidad Central de Venezuela. Facultad de Humanidades. ucv.consuelo@gmail.com

²Universidad Central de Venezuela. Escuela de Ingeniería Mecánica. gc@hotmail.com

1 línea en blanco

RESUMEN

1 línea en blanco

El resumen en Español del artículo es obligatorio y será precedido por el subtítulo RESUMEN, centrado, escrito en fuente Times New Roman, tamaño 10, Mayúsculas, Negrita. El texto del resumen utilizará la fuente Times New Roman, tamaño 10, alineación de párrafo justificado, sin sangrías a la derecha o izquierda y espacio (entre líneas) sencillo. El resumen no excederá de 15 (quince) líneas. Deberá estar escrito en un solo párrafo de tipo informativo. Debe ser adecuado para su reproducción (sin necesidad de una nueva redacción) por revistas especializadas (Clinical Abstracts, Medicine Abstracts, etc.) y deberá especificar brevemente el proceso experimental y las conclusiones.

1 línea en blanco

Palabras Clave: deben incluirse al menos 5 (cinco) Palabras Clave, separadas por punto y coma. Utilice estilo Normal, fuente Times New Roman, tamaño 10, alineación de párrafo justificado, sin sangrías a la derecha o a la izquierda y con espacio entre líneas sencillo.

2 líneas en blanco

TÍTULO TRADUCIDO AL INGLÉS EN LETRA FUENTE TIMES NEW ROMAN, TAMAÑO 12, ALINEADO AL CENTRO. MAYÚSCULA, NEGRITA

1 línea en blanco

ABSTRACT

El “Abstract” en inglés, al igual que el resumen en español, es obligatorio. Será precedido por el subtítulo ABSTRACT, centrado, escrito en fuente Times New Roman, tamaño 10, Mayúsculas, Negrita. El texto del resumen utilizará la Fuente Times New Roman, Tamaño 10, alineación de párrafo justificado, sin sangrías a la derecha o izquierda y espacio (entre líneas) sencillo. El “abstract” no excederá de 15 (quince) líneas. Deberá estar escrito en un solo párrafo de tipo informativo. Debe ser adecuado para su reproducción (sin necesidad de una nueva redacción) por revistas especializadas (Clinical Abstracts, Medicine Abstracts, etc.) y deberá especificar brevemente el proceso, los resultados y las conclusiones principales.

1 línea en blanco

Keywords: Deben incluirse las Palabras Clave traducidas al inglés, separadas por comas. Utilice estilo Normal, fuente Times New Roman, tamaño 10, alineamiento con párrafo justificado, sin sangrías a la derecha o a la izquierda y con espacio entre líneas sencillo.

2 líneas en blanco

INTRODUCCIÓN

1 línea en blanco

La introducción y el resto del texto del trabajo deben escribirse a espacio sencillo, a dos columnas, en un solo lado del papel y en hojas tamaño carta (21,5 x 28 cm), con márgenes de 2,5 cm por lado y espaciado entre columnas de 0,5 cm, utilizando estilo Normal, fuente Times New Roman, tamaño 11, alineamiento con párrafo justificado, sin sangría, sólo en caso de que el trabajo sea aceptado para su publicación.

Se aconseja a los autores utilizar subtítulos descriptivos de la forma siguiente de acuerdo al trabajo: Introducción, Materiales y Métodos o Metodología, Técnicas Experimentales, Resultados, Análisis, Discusión, Conclusiones, Agradecimientos y Referencias. Los **SUB-TÍTULOS** de cada sección en estilo Título 2, fuente Times New Roman, tamaño 11, mayúsculas, negrita, sin numeración, separados del párrafo anterior con una línea en blanco, y del párrafo siguiente con una línea en blanco.

El manuscrito debe ser claro y conciso y preferiblemente con una extensión total no mayor de 15 páginas incluyendo figuras y tablas. Se preparará en formato .doc en procesador de textos **MS Word versión 6.0 en adelante**. Se enviarán al Comité Editor de la Revista vía internet al siguiente correo: ucvapiu@gmail.com. Para el contenido del trabajo serán utilizados los siguientes formatos y alineaciones:

Abreviaturas, símbolos y terminología. En caso de incluir en el texto abreviaturas nuevas o especiales, debe incluirse en el manuscrito un listado de las mismas con su significado. La terminología química debe incluirse de acuerdo con las normas del Comité de Nomenclatura de la IUPAC (Internacional Unión of Pure and Applied Chemistry). Las unidades deben seguir las Normas del Sistema Internacional de Unidades.

Leyendas, Gráficos y Tablas: Deben ser incluidas en el texto final tamaño y tipo de letra (Times New Roman 10), en colores blanco y negro. Cada figura, gráfico y tabla se anexarán al final del manuscrito en hojas separadas, sólo en el caso de arbitraje.

Tablas – Construidas con la herramienta Tabla del pro-

cesador MS Word, deberán ser numeradas consecutivamente, referidas en el texto e insertadas en el lugar correspondiente. Para su incorporación en el texto, dejar una línea en blanco antes de la tabla y dos líneas en blanco después de ella. Cada tabla debe tener un título breve. Las aclaratorias deben estar al pie, no en el título. Los encabezamientos de las columnas serán cortos, abreviados y cuando sea necesario, serán explicadas en notas al pie.

Títulos de tablas – Deberán ser incluidos en una línea inmediata superior de la Tabla y alinearlos a la izquierda, coincidiendo con el margen izquierdo de la tabla. Utilice fuente Times New Roman, tamaño 10. Ejemplo:

Tabla 1. Parámetros técnicas analíticas utilizadas.

Parámetro	Técnica Analítica	Unidad
pH	Directo, Potenciométrico	-----
SST	SM, Gravimétrico	mg/L
SSV	SM, Gravimétrico	mg/L
DQO	SM, Reflujo Abierto	mg/L

SM: Standard Methods

Figuras / Fotografías – Todas las figuras, gráficos, ilustraciones y fotografías serán consideradas como figuras en formato JPG 300Dpi y deberán ser numeradas consecutivamente con números arábigos, referidas en el texto e insertadas en el lugar correspondiente. Su presentación se hará a color o en blanco y negro. Las fotomicrografías deben incluir una escala gráfica. En caso de requerir leyendas, éstas deberán escribirse utilizando fuente Times New Roman, tamaño 10. Para su incorporación en el texto, dejar una línea en blanco antes de la figura y dos líneas en blanco después de ella.

Título de Figura / Fotografía – Deberá ser incluido en la línea inmediatamente inferior de la Figura, alineado a la izquierda, coincidiendo con el margen izquierdo de la Figura y utilizando fuente Times New Roman, Tamaño 10.

Ejemplo:

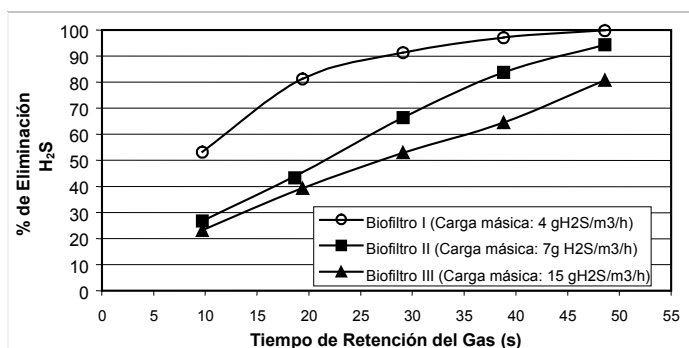


Figura 1. Eliminación de H₂S en función del tiempo de retención para diferentes cargas máscicas en los biofiltros.

Fórmulas o Ecuaciones – Deberán ser generadas por editores de ecuaciones actualizados, utilizando fuente Times New Roman, tamaño 10, negritas y centradas. También deberán ser numeradas en secuencia y referidas en el texto. Para su incorporación dejar una línea en blanco, antes y después de la ecuación. Ejemplo:

$$\frac{\partial(\epsilon v)}{\partial t} + \frac{\partial(\rho u)}{\partial x} + \frac{\partial(\rho v)}{\partial y} = 0 \quad (1)$$

Referencias: Las referencias deben limitarse a trabajos publicados pertinentes al artículo y citadas en el texto. Un “Abstract” identificado adecuadamente / Abs..) puede ser citado sólo cuando sea la única fuente bibliográfica disponible. Los autores son responsables de la exactitud de las referencias. Las referencias deben ser ordenadas alfabéticamente. La cita de cada referencia debe ser incluida en el texto por el apellido del autor y año de publicación. Cuando la cita de cada referencia tenga más de un autor se colocará según el ejemplo: (Acosta et al. 2004). El estilo de citación debe ser el siguiente:

Artículos: Apellido del primer autor, seguido por las iniciales de su nombre, iniciales del nombre y apellido de cada coautor, año, título del trabajo (solamente con

la primera letra en mayúscula), nombre de la revista (abreviado como en Word List of Scientific Periodicals y en letras cursivas o subrayado, volumen número (N°) (si es necesario) y página inicial – página final. Se debe utilizar fuente Times New Roman 10, efecto versal para el nombre del o los autores. Alineación de párrafo justificado y sangría de 0,7 cm a la izquierda a partir de la segunda línea del párrafo. Ejemplos:

PIERMATTEI D., (1996). “*Atlas de abordajes quirúrgicos de huesos y articulaciones. Perros y gatos*”. 3a. Edición. Interamericana Mc Graw-Hill, México. p. 298-299.

KYLE R.F., SCHAFFHAUSEN J.M., BECHTOLD J.E., (1991). “*Biomechanical characteristics of interlocking femoral nails in the treatment of complex femoral fractures*”. Clinical Orthopaedics 267(15): 169-173 y/o 267:169-173.

KAPANDJI A., (1998). “*Fisiología Articular, Miembro Superior*”. Editorial Medica Panamericana; 5ta Edición; Tomo I, Madrid, España.

Zimmer Internal fracture fixation, Catálogo, sección B. U.S.A, (1998). www.zimmer.com. Consultado el 10/10/2010.

NOTA: Las contribuciones no deben exceder a las siguientes extensiones:

Ensayos, artículos de opinión y reseñas (5 páginas, Times New, letra 12, a doble espacio, máximo una figura y una tabla.

Para **Artículos de revisión y artículos científicos** (15 páginas).

Comunicaciones cortas (hasta 7 páginas) bajo las mismas especificaciones.

INSTRUCCIONES A LOS ÁRBITROS

La revisión de los pares es el elemento central del proceso de arbitraje. Para que el proceso sea imparcial se aplica el sistema doble ciego (autores y árbitros son anónimos). Todo trabajo debe ajustarse a las normas exigidas por la Revista Tribuna del Investigador. Los árbitros deberán considerar la pertinencia del artículo para el área. Exigir que el trabajo tenga claridad, coherencia, buena ortografía, originalidad y vigencia o importancia de la investigación desarrollada. Los árbitros deberán regirse por la guía anexa (Planilla de Evaluación) explicando en el formulario aquellos aspectos que considere necesarios para orientar y hacer sugerencias que considere necesarias a los autores y podrá utilizar hojas adicionales si lo estiman conveniente para brindar una información amplia a los autores. El arbitraje debe ser un proceso didáctico que permita calidad de los artículos publicados.

Aspectos a considerar	Criterios de evaluación
Título	<ol style="list-style-type: none"> 1. El título debe resumir la idea principal del trabajo. 2. Debe expresar el objeto e intención de investigación. 3. La extensión no debe exceder de doce palabras. 4. Una buena opción para determinar un buen título, es que sea la expresión del resultado más importante de la investigación
Resumen	<ol style="list-style-type: none"> 1. No debe exceder de 250 palabras y ser un sumario completo del contenido del trabajo. 2. Toda información debe proceder del texto del trabajo, que permita a los lectores reconocer con rapidez el contenido. 3. Debe ser preciso, que refleje de manera correcta el objetivo y contenido del manuscrito. 4. Deben definirse todas las abreviaturas (excepto las unidades de medida) y los acrónimos. 5. Sólo debe incluirse información que aparezca en el cuerpo del escrito. Debe contener: breve introducción que justifique la temática, objetivos generales de la investigación, metodología (métodos y técnicas utilizados) en el proceso de investigación, resultados y una síntesis de las conclusiones del trabajo.
Palabras clave	<ol style="list-style-type: none"> 1. Deben ser representativas del trabajo para facilitar su consulta en bases de datos. Debe evitarse el uso de palabras genéricas.
Introducción	<ol style="list-style-type: none"> 1. Debe representar el trabajo a través de una justificación sustentada. 2. Debe dar cuenta de la importancia del trabajo
Desarrollo del Trabajo	<ol style="list-style-type: none"> 1. Consideraciones teóricas y metodológicas que sustentan el trabajo. 2. Uso correcto del idioma (sintaxis, gramática) 3. Cuando se utilicen abreviaturas, la primera vez que aparezcan en el texto, deben ser precedidas por el significado en extenso. 4. Organización interna coherente y equilibrada. 5. Toda información empírica debe tener la fuente y referente teórico. 6. Se recomienda que los trabajos teóricos confronten autores. 7. Debe quedar claro cuál es el aporte del o los autores del artículo

Notas a pie de página	1. Son sólo para aclarar o ampliar aspectos. No se debe incluir referencias bibliográficas.
Conclusiones	1. Deben constituir una reflexión de los resultados y derivarse del cuerpo del trabajo.
Bibliografía	1. Dependiendo de la temática, debe reflejar uso de publicaciones recientes.

OPINIÓN GENERAL:

Calificativo	Criterios de evaluación
Publicable sin modificaciones	El trabajo no tiene observación, ni de forma ni de fondo
Publicable con ligeras modificaciones	El trabajo amerita modificaciones de forma
Publicable con modificaciones sustanciales	El trabajo amerita importantes modificaciones de fondo
NEGADO	El trabajo tiene problemas de forma y fondo cuya corrección implica reelaboración del trabajo.

Tribuna del Investigador

VOLUMEN 19, NÚMERO 1, 2018

EDITORIAL

Belkisyolé Alarcón de Noya

4

ARTÍCULOS

El Instituto de Medicina Tropical explora caminos hacia el multidagnóstico simultáneo de enfermedades infecciosas y parasitarias / *The Tropical Medicine Institute explores ways towards the simultaneous multidagnosis of infectious and parasitic diseases.*

7

Oscar Noya, María Angelita Lorenzo, Sandra Losada, Marilyan Toledo, Adriana Gauna, Henry Bermúdez.

Medicina Tropical y su proyección actual: un breve panorama / *A brief overview: Tropical Medicine and its current projection.*

15

Nathalie Chacón Fonseca y Luis Alfonso Colmenares Suárez.

La Cátedra de Microbiología en sus 125 años / *The Chair of Microbiology in its 125 years.*

24

María Eugenia Landaeta, Zobeida Uzcátegui, Sofía Mata Essayag.

Recuento histórico del departamento de microbiología, parasitología y Medicina Tropical / *Historical record of the department of microbiology, parasitology and Tropical Medicine.*

33

Zobeida Uzcátegui, Sofía Mata Essayag.

El problema de la tuberculosis multiresistente (tb-mdr) y extremadamente resistente (tb-xdr) a fármacos: implicaciones epidemiológicas y técnicas rápidas para el diagnóstico / *The problem of multidrug-resistant (tb-mdr) and extensively drug-resistant tuberculosis (tb-xdr): epidemiological implications and rapid techniques for diagnosis.*

47

Ana Antonietta Guspini, Irani Pérez, Giorgina Mendoza, Andreina Duarte, Susana González Rico.

Tratamiento de la leishmaniasis tegumentaria americana con meglumina en pacientes con inmunoterapia previa / *Treatment of american tegumentary leishmaniasis with meglumine in patients with previous immunotherapy.*

57

Pedro Navarro, Luis A. Colmenares, Olinda Delgado, María A. De La Parte, Mariana Rivas, Romy Plaza, Ana Graciela Angulo, Nathalie Chacón Fonseca.

Clonación, expresión y purificación de una proteína masp de trypanosoma cruzi / *Cloning, expression and purification of a masp protein from trypanosoma cruzi.*

64

Alí Agudelo, Marielys Laurens, Belkisyolé Alarcón De Noya, Teresa Abate.

La planificación de un álbum virtual de parásitos intestinales / *The planning of a virtual album of intestinal parasites.*

70

Nathalie Chacón, Darling Sánchez.

Caracterización de casos atendidos de toxocariasis visceral y ocular en el Instituto de Medicina Tropical, Caracas, Venezuela, 2011-2016 / *Characterization of cases treated for visceral and ocular toxocariasis of the Tropical Medicine Institute, Caracas, Venezuela, 2011-2016.*

77

Olinda Delgado, María Ana Rivas, Virginia Coraspe, Sylvia Silva, María Laura Dos Santos, Yalitz Centeno, Alfonso J. Rodríguez-Morales

Histoplasmosis en Venezuela: un enemigo no sospechado / *Histoplasmosis in Venezuela: an unsuspected enemy.*

85

Sofía Mata-Essayag, María Eugenia Landaeta, Rommie Merino, Liseloth Garrido, David Mota, Jacinto Pineda, María Teresa Colella, Vanessa Pineda, Antonio Serrano, Saúl Quijada, María Elena Savino, Jesús Dawaher, Omar Linares, Elías Kassisse, Sylvia Magaldi, Jessica Martínez.

Arbovirus, miocarditis e insuficiencia cardíaca / *Arbovirus, myocarditis and heart failure.*

97

Ivan Mendoza, Igor Morr, Ivan Mendoza Britto, Yolimar Meza, Nahir Martínez, Jaime Torres, Francesca Misticchio, Vicente Finizola, Juan Marques, Karina Gonzalez Carta.

Enfermedad de chagas: un diagnóstico olvidado de serias consecuencias / *Chagas disease: a forgotten diagnosis of serious consequences.*

109

Belkisyolé Alarcón De Noya, Luciano Mauriello, Arturo Muñoz-Calderón, Zoraida Díaz-Bello, Milagros Aponte, Eyleen Moronta, Paola Fratarolli, Yerly Mendoza, Jefferson Muñoz, Sara Pérez, Laurelys Vasquez, Cecilia Colmenares, Raiza Ruiz-Guevara.

Emergencia del virus zika en latinoamérica. Aprendiendo en el camino / *Emergence of zika virus in latin america. Learning on the fly.*

124

Jaime R Torres R.

Alteración histológica y del perfil proteico en la cardiotoxicidad crónica inducida por adriamicina en ratas sprague dawley / *Histological and the protein profile alteration in chronic cardiotoxicity induced by adriamycin in rats sprague dawley.*

131

Rosa Maíta, Mirian Strauss, María De Los Angeles Narváez, Tomás Hermoso.

Malaria. Eficacia terapéutica de medicamentos contra plasmodium vivax y plasmodium falciparum. Estado Bolívar, Venezuela 2017 / *Malaria. Therapeutic efficacy of first-line medicines against plasmodium vivax and plasmodium falciparum. Bolivar State, Venezuela 2017.*

144

Rubén A. Vallenilla, José L. Cáceres.

Comportamiento frente a insecticidas organosintéticos en anopheles nuñez tovari gabaldon 1940, de una zona malárica minera del Estado Bolívar, Venezuela / *Behavior to organosynthetic insecticides in anopheles nuñez tovari gabaldon 1940 of a malarious mining zone from Bolívar State, Venezuela.*

158

Darjaniva Molina De Fernández, Luisa Elena Figueroa Acosta, Danny Bastidas, Nieves Molina, Víctor Sánchez, William Anaya, Claudia Domínguez & Jorge Moreno.

Muscarinic receptors regulate intracellular cgmp levels at airway smooth muscle / *Regulación por los receptores muscarínicos de los niveles intracelulares de gmpc en el músculo liso de las vías aéreas*

166

Marcelo J. Alfonso, Ramona González De Alfonso, Marcelo Andrés Alfonso González, Itala Lippo De Bécemborg, Elizabeth Cardillo.

Derecho a la salud. Emergencia humanitaria compleja en Venezuela. Reporte nacional septiembre 2018 / *Right to health. Complex humanitarian emergency in Venezuela. National report, september 2018.*

187

Adiós a un Gran Ucevista: Jesús Alberto González Vegas.

201

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

204

INSTRUCCIONES A LOS ARBITROS/PLANILLA

207

PROGRESO DE
LA INVESTIGACIÓN
UNIVERSITARIA
www.apiu.com.ve

