

Especificidad de péptidos sintéticos del virus de la hepatitis C con muestras positivas de sífilis

Ivonne Gómez Cordero, Milenen Hernández Marín, Carlos Martínez Ortiz* y Antonio Melchor Rodríguez.*

Laboratorio de Síntesis de Péptidos, *Laboratorio de Purificaciones, División de Inmunoquímica, Centro de Inmunoensayo, Calle 134 y Avenida 25, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 13 de mayo de 1999. Aceptado: 24 de diciembre de 1999.

Palabras clave: VHC, sífilis, péptidos sintéticos, UMELISA HCV.
Key words: HCV, syphilis, synthetic peptide, UMELISA HCV.

RESUMEN. La hepatitis C, se ha convertido en la forma más común de hepatitis post-transfusional y es la responsable de más del 70 % de las enfermedades virales del hígado. A pesar de los avances alcanzados en su diagnóstico, el uso de proteínas recombinantes, péptidos sintéticos o ambos (ensayos de tercera generación), continúa siendo la única opción para el desarrollo de sistemas de diagnóstico. Sin embargo, existen datos sobre reacciones falsas positivas al virus de hepatitis C (VHC) en pacientes sífilíticos y reacciones falsas positivas a sífilis en pacientes con infección de VHC. El objetivo de este estudio fue comprobar si existían reacciones falsas positivas de anti-VHC en pacientes con sífilis al utilizar péptidos sintéticos para la detección de este virus. Se estudiaron 40 muestras anti-VHC positivas y negativas de los paneles de Boston Biomedica Inc. (PVH103 y PVH204), 38 muestras positivas a sífilis y cuatro muestras negativas de recién nacidos. La infección por sífilis fue determinada por la prueba del Laboratorio de Investigación de Enfermedad Venérea. Anticuerpos a VHC fueron determinados en el ensayo UMELISA HCV tercera generación (TecnoSuma Internacional, S.A., Cuba), para la detección de anticuerpos de VHC. Todos los ensayos se realizaron en todas las muestras. No se observó ninguna reacción falsa positiva anti-VHC, en los pacientes sífilíticos al utilizar péptidos sintéticos. Solamente se obtuvo una muestra que fue positiva por varios péptidos, pero esta muestra fue verdaderamente positiva por el UMELISA HCV y por el ensayo confirmatorio Deciscan HCV. Estos resultados permiten concluir que estos péptidos sintéticos se pueden emplear para el diagnóstico al VHC.

ABSTRACT. Hepatitis C has become the most common way of post-transfusional hepatitis and it is the responsible for more than 70 % of hepatitis diseases. Despite the achievements while diagnosing this disease the use of recombinant protein and/or synthetic peptides (3rd generation assays) are still the only possibility to develop diagnostic system. There are data about false-positive reactions against hepatitis C virus (HCV) in syphilitic patients and false-positive reactions against syphilis in patients with HCV infection. The aim of this study was to verify the false-positivity of anti-HCV in patients with syphilis when using synthetic peptides for the detection of this disease. Forty samples with positive and negative anti-HCV antibodies of Boston Biomedica Inc. panels, 38 samples of positive for syphilis and four negative samples of neonates, were studied. Syphilis infection was determined by the VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) test. HCV antibodies were determined by a third generation UMELISA HCV (TecnoSuma International S.A., Cuba) test for HCV antibodies. All assays were performed on all samples. Not false-positive anti-HCV tests in syphilitic patients have been observed. Only one sample was positive with several peptides, but this sample was really positive by UMELISA HCV and confirmatory assay Deciscan HCV. These results allow to conclude that synthetic peptides that were obtained can be used for HCV diagnosis.

INTRODUCCION

Desde años recientes, el virus de la hepatitis C (VHC) se ha convertido en la forma más común de Hepatitis post-transfusional, cuya transmisión se realiza fundamentalmente por transfusiones sanguíneas y uso de drogas intravenosas.^{1,2} Aunque muchas veces no produce síntomas durante mucho tiempo, puede llegar a causar cirrosis, cáncer de hígado e incluso la muerte. Aún no se cuenta con un tratamiento efectivo contra este virus.³

Su diagnóstico fue posible en 1989 con la descripción del virus mediante técnicas de ingeniería genética,⁴ pero a pesar de los avances alcanzados en ese proceso, el uso de proteínas recombinantes, péptidos sintéticos o ambos, continúa siendo la opción más viable para el desarrollo de sistemas de diagnóstico.⁵

Se encontró un reporte sobre reacciones falsas positivas al VHC en pacientes sífilíticos y reacciones falsas positivas a sífilis en pacientes con infección de VHC.⁶ Por eso, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la especificidad de diferentes péptidos sintéticos de la región estructural y no estructural del VHC, frente a muestras de pacientes con VDRL (Laboratorio de Investigación de Enfermedad Venérea) positivos.

Los péptidos sintéticos se utilizan como reactivos importantes en el ensayo diagnóstico UMELISA HCV, el cual es desarrollado y producido en el Centro de Inmunoensayo, Cuba. Este ensayo de tercera

generación se comenzó a aplicar a partir de octubre de 1998 y se utiliza para la detección de anticuerpos al VHC en donantes de sangre y en Epidemiología.

MATERIALES Y METODOS

Síntesis química de los péptidos

Los péptidos se sintetizaron en fase sólida, por el método descrito por Merrifield en 1963, siguiendo la estrategia Boc- en bolsas de polipropileno (Biotech. Instruments, USA).⁷ Se utilizaron 100 mg de la resina 4-metilbencilhidrilamina (MBHA) (100 a 200 mallas, 1 a 1,2 mmol/g, Bachem).⁸ Los aminoácidos protegidos con el grupo Boc- (Bachem, Suiza), se utilizaron a 0,2 mol/L. Todos los disolventes (diclorometano, isopropanol, *N,N'*-dimetilformamida) y los reactivos empleados (ácido trifluoroacético, *N*-etil-diisopropilamina, *N,N'*-diisopropilcarbodiimida, dimetilsulfuro, 1,2-etanoditiol, *p*-cresol, anisol) fueron puros para síntesis (Merck, Alemania) y se utilizaron sin ningún tratamiento previo.

Las reacciones de acoplamiento se realizaron por activación del grupo carboxilo de cada aminoácido con cantidades equivalentes de *N,N'*-diisopropilcarbodiimida 0,2 mol/L en diclorometano. La eficiencia del acoplamiento de los aminoácidos protegidos se verificó con ayuda del ensayo de ninhidrina. La eliminación de la protección temporal (Boc-), incluyendo la del NH_2 -terminal, se realizó por un tratamiento con ácido trifluoroacético 37,5% en diclorometano.⁹

El procedimiento empleado para la ruptura final fue el conocido como el "Low-High". Para este fin, se utilizó ácido fluorhídrico puro para análisis (Fluka, Suiza) con las mezclas correspondientes de agentes nucleofílicos.⁹ Posteriormente, las bolsas se lavaron con éter dietílico y se secaron al vacío. Al producto final crudo se le realizó la extracción del péptido con ácido acético al 30% en H_2O destilada. El extracto final se diluyó con agua y se liofilizó, en un equipo Edwards de tecnología inglesa de 9 kg de capacidad en el condensador. Se logró obtener una pastilla homogénea.

Purificación de los péptidos sintéticos

En la determinación de la pureza de los péptidos sintéticos se empleó el sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución mediante cromatografía de fase reversa.¹⁰ Se aplicaron 200 μL de las muestras (0,2 mg de péptido) en una Columna Biotech RP18 (Pharmacia); la disolución A fue

TFA 0,1%, acetonitrilo 2% en H_2O y la disolución B TFA 0,05% en acetonitrilo. Se empleó un gradiente entre 0 y 60% B (33'); una velocidad de flujo de 0,5 mL/min; una velocidad del papel de 2 mm/min; una sensibilidad de 0,1 UA (unidades de absorbancia) y una temperatura de 22 °C.

Caracterización de los péptidos sintéticos

Los péptidos sintéticos también se caracterizaron mediante la espectrometría de masas MALDI-TOF.¹¹ Para el bombardeo con láser, se empleó un equipo Bruker Protein TOF-TM, USA con un campo eléctrico de 3 ns, a una longitud de onda de 337 nm.

Etapas del recubrimiento de la fase sólida

Con cada uno de los péptidos por separado se preparó una disolución a 2 mg/mL en carbonato-bicarbonato 0,05 mol/L; pH 9,6. Con ella, se recubrió la fase sólida empleada, constituida por placas de poliestireno con capacidad para 10 μL (placas UMELISA, Greiner labortechnik, Alemania). Se recubrió la fase sólida, con 15 mL/pocillo y se incubó durante 4 h a 37 °C. La fase sólida se lavó con una disolución amortiguadora de PBS-T (8 g de NaCl; 1,215 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g de KH_2PO_4 ; 0,2 g de NaN_3 ; 0,5 mL de Tween-20; para 1 000 mL de agua destilada y pH de 7,3 a 7,5) y posteriormente, se bloqueó con una disolución de preservio (sacarosa 5% y BSA al 1% en PBS-Tween), durante toda la noche a temperatura ambiente (20 a 25 °C). Se aspiró la disolución de preservio y la fase sólida se dejó secar a 37 °C durante 2 h. Las placas recubiertas se conservaron a 4 °C, en una cubierta protectora, hasta el momento de su empleo.

Ensayo UMELISA

Las muestras a evaluar se diluyeron 1:20 en suero de carnero 5% en una disolución amortiguadora Tris-HCl (15 mmol/L de Tris; pH 7,8 y 0,05% Tween-20) y se incubaron 30 min a 37 °C en las placas de reacción. Después de lavar tres veces con la disolución amortiguadora Tris-HCl, con el objetivo de eliminar los componentes no fijados, se adicionó un conjugado anti-IgG humana en carnero marcado con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania) y se incubó nuevamente durante 30 min a 37 °C.

Se realizó un nuevo lavado en las mismas condiciones, para eliminar el conjugado en exceso. Se añadió

entonces el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferilfosfato (Koch Light Ltd. Haverhill, Suffolk, England) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente.¹² La fluorescencia emitida fue medida en un equipo de la serie SUMA* (PR-521, Centro de Inmunoensayo, Cuba) (excitación a 365 nm y emisión a 450 nm). En todos los experimentos, se incluyeron controles positivos y negativos. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado y las muestras se analizaron por duplicado.

Muestras

Se analizaron 40 muestras pertenecientes a los paneles PVH103 (bajo título) y PVH204 (mezclado) de Boston Biomedica Inc., 38 muestras positivas por VDRL y cuatro muestras negativas de recién nacidos.

Como controles positivos y negativos se emplearon los del ensayo UMELISA HCV.

Indicadores de evaluación clínica

Según estudios previos, se determinó como nivel de corte 0,3. Con él, se evaluaron los paneles de Boston Biomedica Inc. y se calculó la relación de corte como:

$$R = \frac{(F_m - X_b)}{(F_{\text{menor}} - X_b)} \cdot 0,3$$

donde:

R relación de corte.

F_m fluorescencia de la muestra.

X_b media del blanco.

F_{menor} fluorescencia menor del positivo.

Se consideraron positivas todas las muestras donde:

$$\frac{R}{N_c} \text{ fuera mayor que } 1.$$

donde:

N_c nivel de corte.

La zona gris se calculó como el grupo de valores cuya relación se encontraba entre 5 y 95% de resultados positivos. Con estos valores, se realizó un gráfico de porcentaje de resultados positivos contra valores de Relación y se determinó la zona gris. El nivel de corte correspondió al 50% de resultados positivos.¹³

Se consideraron como muestras "Border Line" (BL) aquellas cuyos valores estaban por debajo del 15% del nivel de corte. Las muestras comprendidas entre este y el 95% de resultados positivos, a pesar de estar comprendidas en la zona gris, se consideraron positivas.

Entre los indicadores de evaluación clínica se seleccionaron la sensibilidad y la especificidad.¹²

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN} \cdot 100 (\%)$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP} \cdot 100 (\%)$$

donde:

VP verdaderos positivos.

VN verdaderos negativos.

FP falsos positivos.

FN falsos negativos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se lograron sintetizar 30 péptidos de diferentes regiones del VHC, incluyendo cuatro quiméricos (NS3(11)/NS3(15), NS3/NS4(25), NS3/NS4(26) y NS4/NS5), que incluían tres regiones no estructurales del virus (NS3, NS4 y NS5). Las secuencias de todos los péptidos fueron seleccionadas a partir del aislamiento 1 (HCV 1) según Choo QL, y col. en 1991.¹⁴ Se escogieron los péptidos de mejores resultados para el grupo de muestras analizadas que fueron: Core1 (región del núcleo): PKPQ KKNKRNTNRRPQDVKF; NS3(11): GREILLGPADDGMVSKGWRL y NS3(15): TLPQDAVSRTQRRGRTGRGKPGIYRFVA ambos de la región no estructural NS3; NS4(c-16) (región no estructural NS4): VPESDAAARVTAILSSLT; NS5(H4) (región no estructural NS5): DYEPV VHGCPPLPPP; y los quiméricos, uni-

dos por un brazo espaciador Gly-Gly: NS3(11)/NS3(15): GREILLGPAD DGMVSKGWRLKKTLPQDAVSRT QRRGRTGRGKPGIYRFVA; NS3/ NS4(25): GREILLGPADDGMVSKG WRLKKVPESDAAARVTAILSS LT; NS3/NS4(26): TLPQDAVSRT QRRGRTGRGKPGIYRFVAKKVP ESDAAARVTAILSSLT, y NS4/NS5: VPESDAAARVTAILSSLTKKDYEP PVVHGCPLPPP. Además, se realiza- ron algunas mezclas (Core1-NS3/ NS4(25), Core1-NS3/NS4(26) y Co re1-NS4/NS5).

Los nueve péptidos selecciona- dos fueron purificados a través del sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución mediante cromatografía de fase reversa y se obtuvo en todos los cromatogramas una señal principal, que se correspondía con la máxima actividad en el UMELISA, además, se caracteriza- ron por espectrometría de masas MALDI-TOF en la que los pesos moleculares obtenidos se correspon- dieron con los teóricos.

La actividad de cada uno de los péptidos por separado, se analizó mediante el empleo de 40 muestras, positivas y negativas, de dos panc- les de Boston Biomedica Inc. (PVH103 y PVH204). Los resultados de sensibilidad de los péptidos indi- viduales fueron superiores al 90 % con Core1 y al 85 % con NS5(H4),

mientras que para los péptidos de las regiones no estructurales NS3 y NS4 fueron entre 5 y 40 %, lo que coinci- de con lo reportado por otros auto- res.¹⁵ Con los quiméricos la sensibi- lidad fue superior al 70 %, excepto el quimérico NS3(11)/NS3(15) que pre- sentó baja sensibilidad para estas muestras. La mezcla de mejores re- sultados fue Core1-NS4/NS5 con la que se obtuvo una sensibilidad del 100 %. Para el resto de las mezclas, los valores fueron superiores al 70 %.

Sonmez y col. en 1997, pudieron comprobar la existencia de reaccio- nes falsas positivas al VHC en pa- cientes sifilíticos y reacciones falsas positivas a la sífilis en pacientes con infección de VHC. Con el objetivo de verificar si existía reacción inespecí- fica con muestras positivas a sífilis, en los péptidos de VHC, se analiza- ron 38 muestras positivas por VDRL y cuatro reportadas como negativas de recién nacidos (7m1, 7m2, 8m y 9m), frente a los nueve péptidos de mejores resultados (Figuras 1 a 3) y con las mezclas seleccionadas (Fig. 4).

En todos los ensayos se evalua- ron controles positivos y negativos, los ensayos se realizaron por cuadri- plicado y las muestras se analizaron por duplicado.

Con el péptido Core1 se obtuvo una especificidad del 89,47 % para el grupo de muestras analizadas, ya

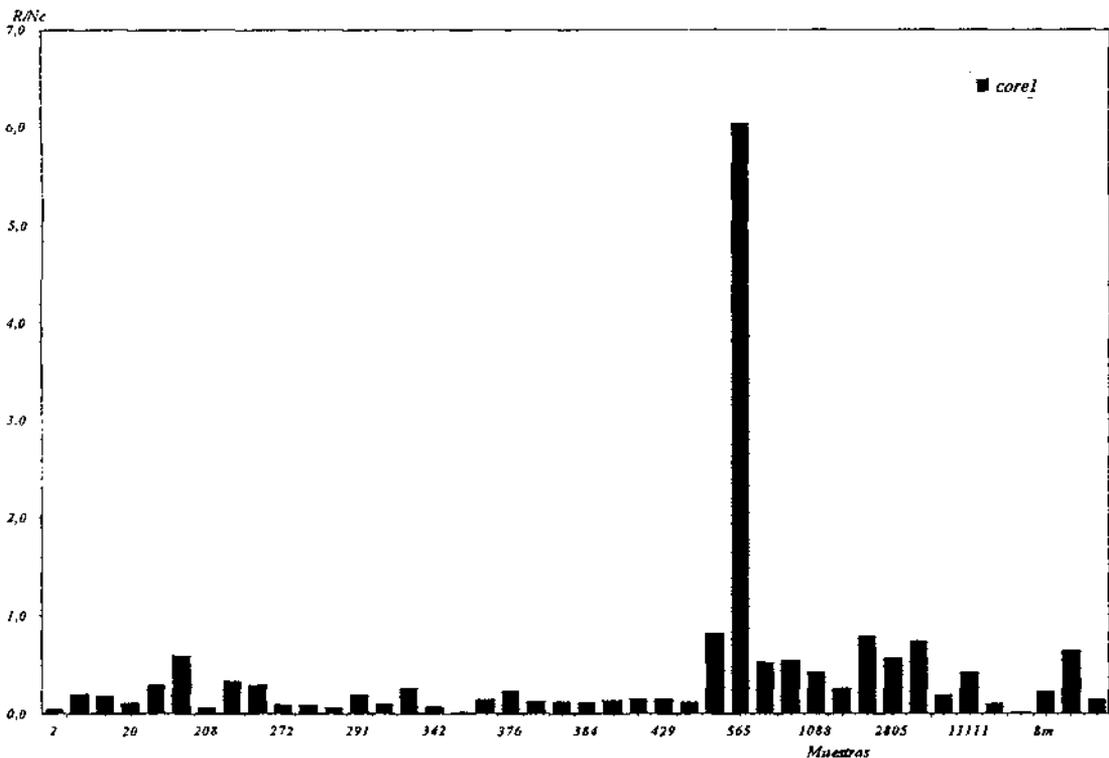


Fig. 1. Comportamiento del péptido de la región estructural (Core1) del VHC frente a muestras positivas por VDRL.

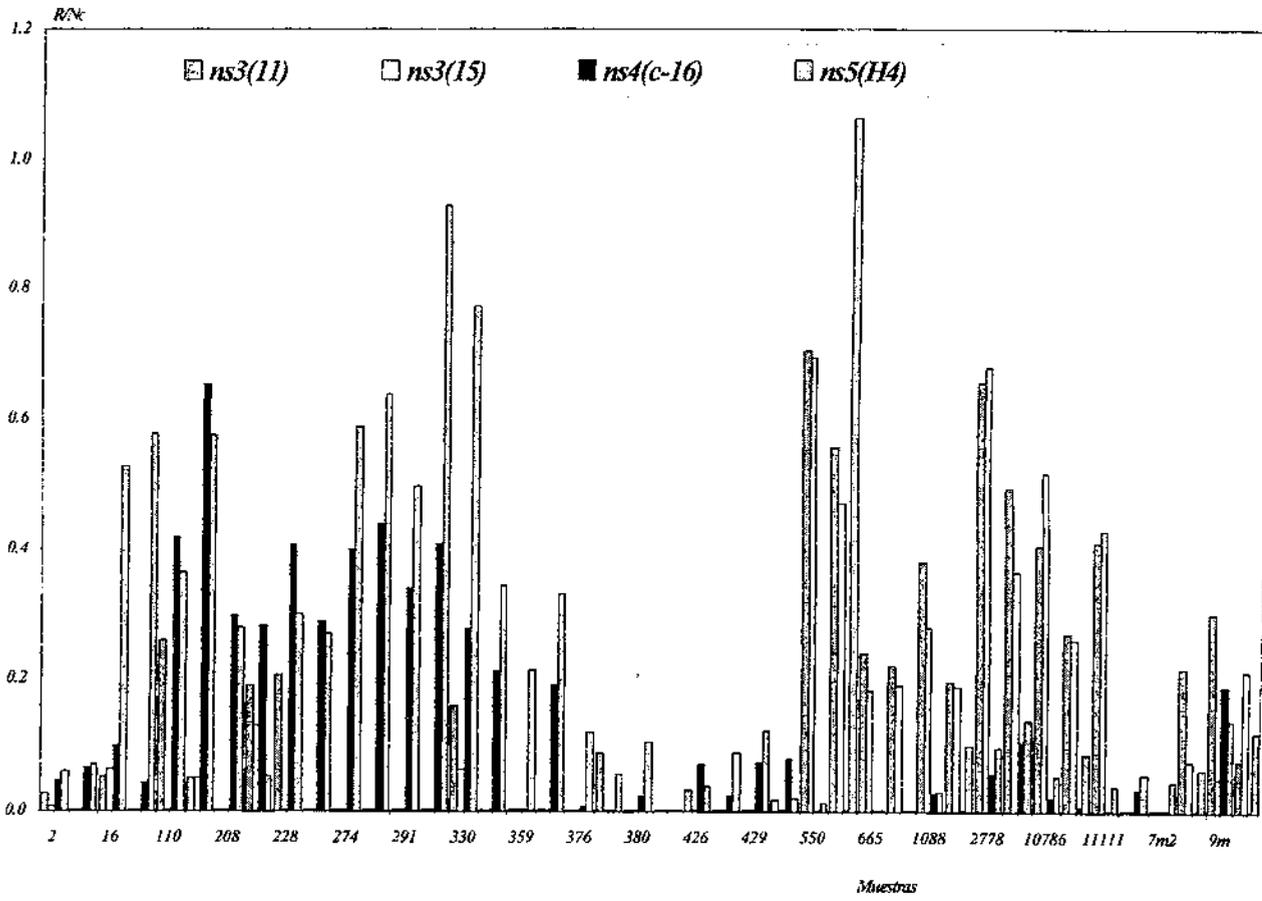


Fig. 2. Comportamiento de los péptidos de las regiones no estructurales (NS3(11), NS3(15), NS4 (c-16) y NS5(H4)) del VHC frente a muestras positivas por VDRL.

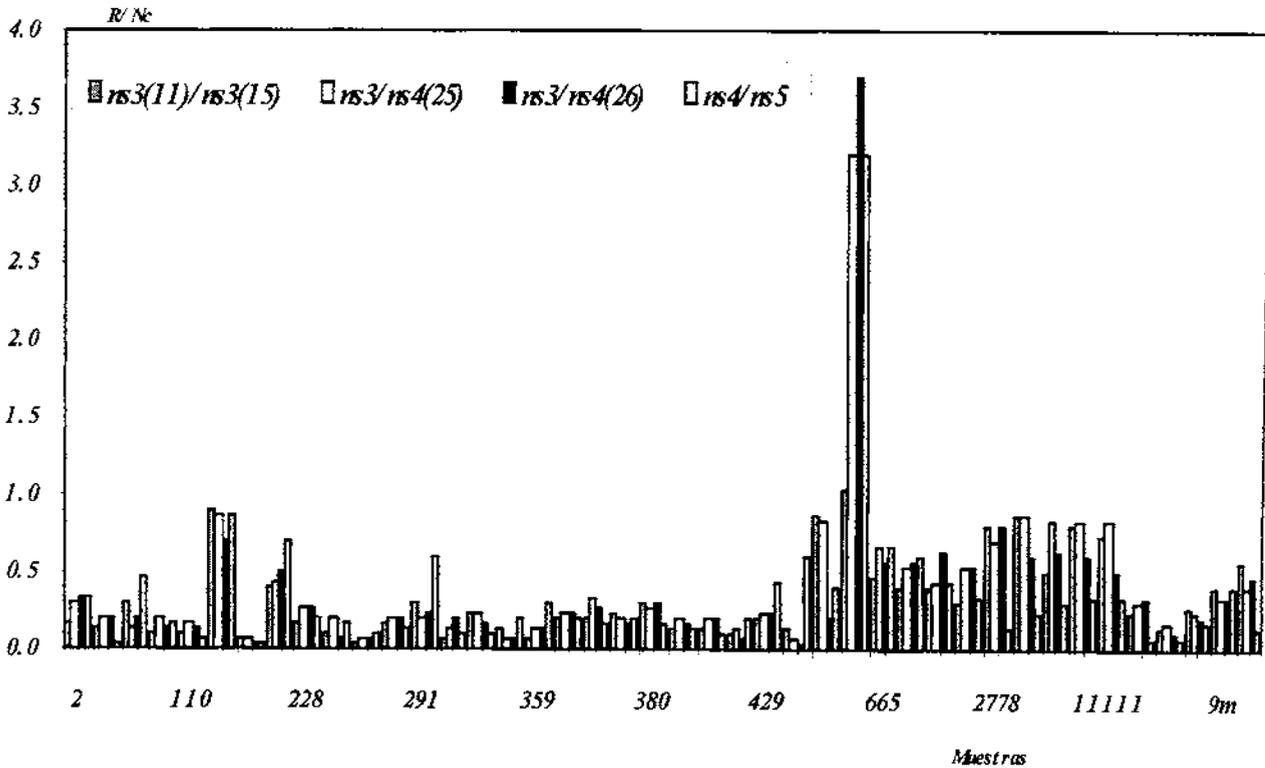


Fig. 3. Comportamiento de los péptidos quiméricos de las regiones no estructurales (NS3(11)/NS3(15), NS3/NS4(25), NS3/NS4(26) y NS4/NS5) del VHC frente a muestras positivas por VDRL.

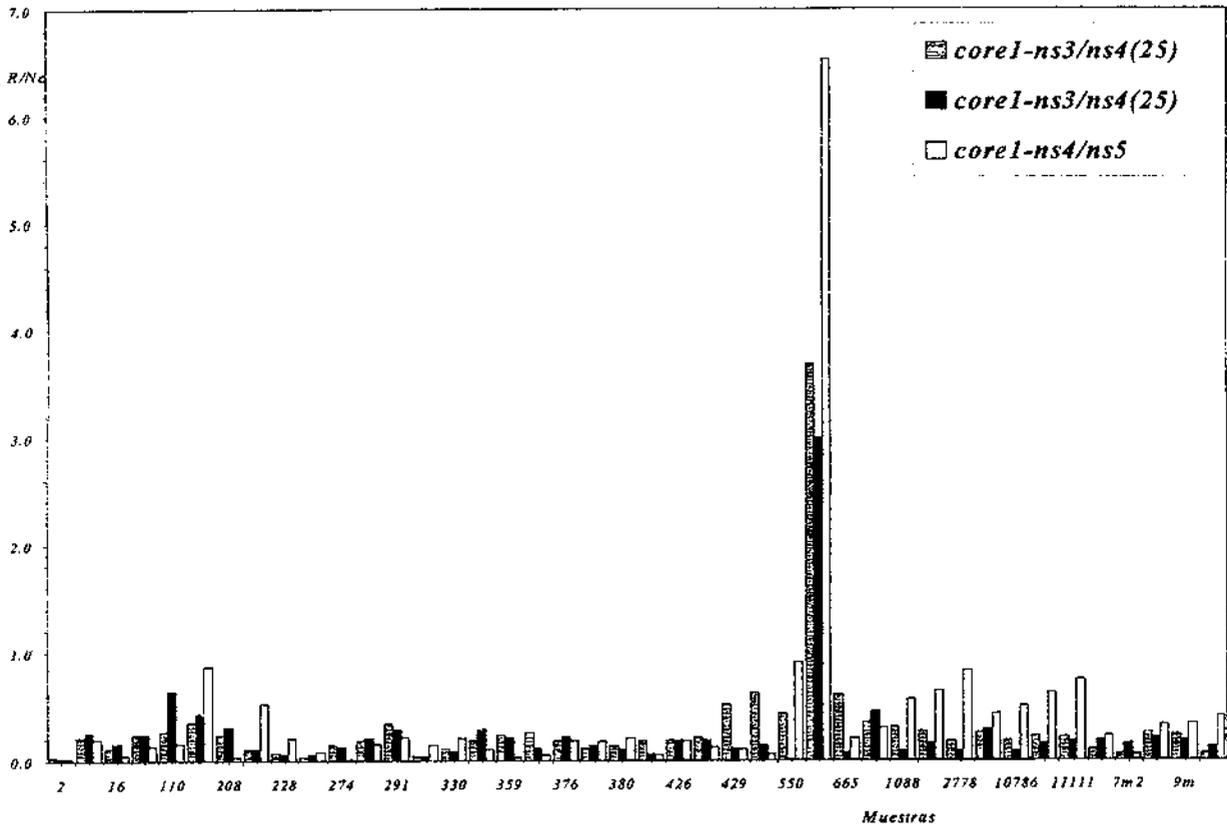


Fig. 4. Comportamiento de las mezclas de diferentes péptidos del VHC frente a muestras VDRL positivas.

que se detectó una muestra (565) reportada como VDRL positiva. A ella, le correspondió un valor de R/Nc de 6,03. Para el resto de las muestras, los valores siempre fueron inferiores a 0,8.

Con los péptidos NS3(11), NS3(15) y NS4(c-16) la especificidad fue del 100 %, ya que no se observó reacción inespecífica frente a las muestras positivas por VDRL. Los valores de R/Nc oscilaron entre 0,003 y 0,7. Con el péptido NS5(H4), la especificidad obtenida fue del 89,47 %, ya que se volvió a obtener la misma muestra (565) como positiva, con una R/Nc de 1,03.

Con los péptidos quiméricos NS3(11)/NS3(15), NS3/NS4(25), NS3/NS4(26), NS4/NS5, se obtuvo una especificidad del 89,47 % para el grupo de muestras analizadas, ya que nuevamente la misma muestra reportada como positiva a VDRL fue positiva para esos péptidos. Su R/Nc fue de 1,01; 3,2; 3,69 y 3,19 respectivamente.

La muestra 565 fue también positiva frente a las mezclas Core1-NS3/NS4(25) (R/Nc = 3,67), Core1-NS3/NS4(26) (R/Nc = 2,98), Core1-NS4/NS5 (R/Nc = 6,53), por lo que igualmente se obtuvo una especificidad del 89,47 %.

La muestra 565, que resultó positiva con los péptidos Core1,

NS5(H4), NS3(11)/NS3(15), NS3/NS4(25), NS3/NS4(26), NS4/NS5 y las mezclas Core1-NS3/NS4(25), Core1-NS3/NS4(26), Core1-NS4/NS5, se evaluó con un estuche comercial (UMELISA HCV de tercera generación), siendo también positiva.

Además, esta muestra fue confirmada por un ensayo comercial Deciscan HCV de Sanofi Diagnostic Pasteur (DECISCAN 72304), en el que se obtuvieron bandas positivas a las regiones estructural y no estructurales del VHC (4+ a Core; 2+ a NS3, 1+ a NS4 y 3+ a NS5), por lo que resultó una muestra verdaderamente positiva. Debido a lo anterior, se puede plantear que los péptidos Core1, NS5(H4), NS3(11)/NS3(15), NS3/NS4(25), NS3/NS4(26), NS4/NS5 y las mezclas Core1-NS3/NS4(25), Core1-NS3/NS4(26), Core1-NS4/NS5, presentan un 100 % de especificidad.

Según los resultados, todos los péptidos sintetizados son específicos frente a muestras positivas a sífilis.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron péptidos sintéticos en fase sólida, de diferentes regiones del virus de la hepatitis C, todos de gran especificidad frente a muestras VDRL positivas.

Se obtuvo una muestra positiva, por los péptidos Core1, NS5(H4), NS3(11)/NS3(15), NS3/NS4(25), NS3/NS4(26), NS4/NS5, la cual fue confirmada como verdadera positiva. Esto permite concluir que estos péptidos pueden ser empleados en un ensayo para la detección de anticuerpos al virus de la hepatitis C, por su elevada sensibilidad y especificidad.

BIBLIOGRAFIA

1. Cuthbert J.A. Hepatitis C: Progress and Problems. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 505, 1994.
2. Purcell R. The hepatitis C virus: Overview. *Hepatology*, 26, Suppl. 1, S11, 1997.
3. Podolsky D.K. and Isselbacher J. Alteraciones del metabolismo hepático. In: McGraw Hill Book Company, ed. Harrison: Principios de medicina interna. USA. Tomo II, 1604-1611, 1989.
4. Choo Q.L., Kuo G., Weiner A.J., Overby L.R., Bradley D.W. and Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244, 359, 1989.
5. Padrón G.J., Lemos G., Sánchez G., Arús E., Domínguez R., Chiuea G., Tórrés B., Rivera L., Pérez M., Blanco V., Alfonso O., Carrazana N., López L. and Rodríguez Z. Evaluación de un sistema para la detección de anticuerpos contra un antígeno sintético del core del virus de Hepatitis C y su prevalencia en donantes de sangre. *Biología Aplicada*, 11, 165, 1994.

6. Sonmez E., Ozerai I.H., Senol M., Kizilkaya N., Sahin K. and Ozbilge H. False positive reaction between syphilis and Hepatitis C infection. *Journal of Medical Science*, 33, 724, 1997.
7. Mernfield R.B. Peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149, 1963.
8. Houghten R.A. Simultaneous multiple peptide synthesis: The rapid preparation of large numbers of discrete peptides for biological, immunological and methodological studies. *Biotechniques*, 4, 522, 1986.
9. Reyes O., Figueroa I., Garay H.E., González L.J. and Cruz L.J. Síntesis en fase sólida de un péptido fluorescente para la determinación cualitativa de proteasas. *Biología Aplicada*, 13, 101, 1996.
10. Stone K.L., LoPresti M.B., Myron J., DeAngelis R. and Williams K.R. Enzymatic digestion of proteins and HPLC peptide isolation. In: Academic press, editors. A practical guide to protein and peptide purification for Microsequencing, Academic Press, Inc., 31-47, 1989.
11. Holle A, Mayer FJ. Matrix-Assisted Laser Desorption on the REFLEX™ time of flight mass spectrometry system. *Mass Spectrometry*, 18-20, 1993.
12. Gómez I., Cazanave J., Solís R.L., Machado C., Bécquer D. and Fernández J.L. A new UMELISA format for the quantification of maternal serum alpha-fetoprotein. *Biología Aplicada*, 13, 109, 1996.
13. Broughton P.M.G., Bergonzi C., Lindstedt G., Loeber J.G. and Malan P.G. Guidelines for the evaluation of diagnostic Kits. General principles and outline procedures for the evaluation of Kits for qualitative tests. Part 2. European Committee for Clinical Laboratory Standards, 1987.
14. Choo Q.L., Richman K.H., Han J.H., Berger K., Lee C., Dong C., Gallegos C., Coit D., Medina-Selby A., Barr P.J., Weiner A.J., Bradley D.V., Kuo G. and Houghton M. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, 2451, 1991.
15. Gómez I. Obtención y evaluación de péptidos sintéticos inmunodominantes de la región estructural y no estructural del virus de la Hepatitis C. Tesis en opción al grado de Maestro en Ciencias, Facultad de Biología, 1999.

¿Problemas con el sueño?

La Clínica de Sueño le puede ayudar a resolverlos felizmente.



Es conocido que siempre han existido personas que sufren trastornos relacionados con el sueño, pero sólo en la última década, se le ha dado a las alteraciones del sueño la significación requerida como problema de salud que causa no sólo serias enfermedades médicas, sino también, que afecta las relaciones sociales y los negocios de las personas, sin límites de edad o profesión.

La Clínica de Sueño reúne a un colectivo profesional multidisciplinario con más de 20 años de experiencia en el estudio del Sistema Nervioso Humano y está dotada con moderna tecnología que le permite un rápido y eficaz diagnóstico y con novedosas técnicas de tratamiento de los diferentes trastornos del sueño.

Esta institución ha sido concebida para la evaluación y rehabilitación de los pacientes con trastornos del sueño aquejados de:

- Dificultades para iniciar o mantener el sueño o sueño no restaurador (insomnios) de todos los tipos y en todas las edades.
- Somnolencia excesiva diurna (hipersomnias) con sospecha de narcolepsia, síndrome de apnea de sueño y otras causas.
- Sospecha de alteraciones asociadas al sueño como crisis epilépticas, asma nocturna, movimientos periódicos de las piernas, etcétera.
- Alteraciones del ciclo normal día-noche (cambio de huso horario y en los turnos laborales, patrones de sueño-vigilia irregulares, síndromes de fase atrasada y adelantada de sueño, etc.).
- Parasomnias mal soportadas, con riesgos de accidente o de larga evolución (sonambulismo, terrores nocturnos, pesadillas, etc.).
- Problemas del sueño relacionados con enfermedades neuropsiquiátricas

(asociadas a enfermedades neurológicas, traumas craneales, depresiones enmascaradas).



CENTRO INTERNACIONAL
DE RESTAURACIÓN NEUROLÓGICA

Teléfonos: 33 6003; 21 9966.
Fax: (537) 33 6339; 33 2420; 33 6302.
Telefax: 33 6028.