

ISSN 0120-4157

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

Volumen 36, No. 2 - Junio de 2016

Bogotá, D.C., Colombia, S.A.



Portada: Antígenos del virus de influenza A H1N1/v09 en células infectadas de tejido pulmonar. Inmunohistoquímica mediante el sistema de fosfatasa alcalina, fotomicroscopio Axiphot, Carl Zeiss, 1000X

Jorge Alonso Rivera, Grupo de Morfología Celular, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 36, No. 2, Bogotá, D.C., Colombia - Junio de 2016

Comité Editorial

EDITORES

LUIS ALBERTO GÓMEZ
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

CARLOS ARTURO HERNÁNDEZ
Bogotá, D.C., Colombia

RUBÉN SANTIAGO NICHOLLS
Organización Panamericana de la Salud
Washington, D.C., Estados Unidos

EDITORES ASOCIADOS

ENRIQUE ARDILA
Bogotá, D.C., Colombia

MIGUEL A. GUZMÁN
Investigador Emérito
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

NANCY GORE SARAVIA
Centro Internacional de Entrenamiento
e Investigaciones Médicas
Cali, Colombia

RAÚL PARDO
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

LEONARD MUNSTERMANN
Yale University School of Medicine
New Haven, CT, Estados Unidos

GUSTAVO C. ROMÁN
Methodist Neurological Institute
Houston, TX, Estados Unidos

OMAR SEGURA
Federación Médica Colombiana
Bogotá, D.C., Colombia

ORLANDO TORRES-FERNÁNDEZ
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

Comité Científico

ARNOLDO BARBOSA
Universidad del Tolima
Ibagué, Colombia

ANTONIO BERMÚDEZ
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

JORGE H. BOTERO
Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia

VÍCTOR CÁRDENAS
University of Texas
El Paso, TX, Estados Unidos

ALBERTO CONCHA-EASTMAN
Guatapé, Colombia

ZOILO CUÉLLAR
Academia Nacional de Medicina
Bogotá, D.C., Colombia

LUIS GABRIEL CUERVO
Organización Panamericana
de la Salud
Washington, D.C., Estados Unidos

PATRICIA DEL PORTILLO
Corpogén
Bogotá, D.C., Colombia

ANDRÉS DE FRANCISCO
Organización Mundial de la Salud
Ginebra, Suiza

FERNANDO DE LA HOZ
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, D.C., Colombia

JOSÉ LUIS DI FABIO
Organización Panamericana de la Salud
Washington, D.C., Estados Unidos

JORGE HERNANDO DONADO
Universidad Pontificia Bolivariana
Medellín, Colombia

JOSÉ FIGUEROA
World Health Organization
Ginebra, Suiza

LUIS FERNANDO GARCÍA
Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia

ALBERTO GÓMEZ
Pontificia Universidad Javeriana
Bogotá, D.C., Colombia

ENRIQUE GONZÁLEZ
University of Texas Health Science Center
at San Antonio
San Antonio, TX, Estados Unidos

JOHN MARIO GONZÁLEZ
Universidad de los Andes
Bogotá, D.C., Colombia

FELIPE GUHL
Universidad de los Andes
Bogotá, D.C., Colombia

ANTONIO IGLESIAS
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, D.C., Colombia

JORGE JARA
Centers for Disease Control and
Prevention, Regional Office for
Central America and Panama,
CDC-CAP
Ciudad de Guatemala, Guatemala

ERNESTO JARAMILLO
Organización Mundial de la Salud
Ginebra, Suiza

MARCELO LABRUNA
Universidade de São Paulo
São Paulo, Brasil

JAIRO LIZARAZO
Hospital Universitario Erasmo
Meoz
Cúcuta, Colombia

JUAN GUILLERMO McEWEN
Corporación para Investigaciones
Biológicas
Medellín, Colombia

ROBERTO MENDOZA
The Hospital for Sick Children
Toronto, Ontario, Canada

ÁLVARO MONCAYO
Universidad de los Andes
Bogotá, D.C., Colombia

RICARDO NEGRONI
Hospital de Infecciosas
Francisco Javier Muñiz
Buenos Aires, Argentina

MARÍA TERESA OCHOA
University of California Los Ángeles
Los Ángeles, CA, Estados Unidos

JUAN P. OLANO
University of Texas Medical Branch
Galveston, TX, Estados Unidos

BLANCA RESTREPO
University of Texas
Brownsville, TX, Estados Unidos

VÍCTOR E. REYES
University of Texas Medical Branch
Galveston, TX, Estados Unidos

PEDRO ROMERO
Ludwig Center for Cancer Research
University of Lausanne
Lausana, Suiza

GERZAÍN RODRÍGUEZ
Investigador Emérito
Instituto Nacional de Salud
Universidad de la Sabana
Bogotá, D.C., Colombia

ÁLVARO RUIZ
Pontificia Universidad Javeriana
Bogotá, D.C., Colombia

GIOCONDA SAN BLAS
Instituto Venezolano de
Investigaciones Científicas
Caracas, Venezuela

ÁLVARO SANABRIA
Hospital Pablo Tobón Uribe
Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia
Universidad de la Sabana
Chía, Colombia

RICARDO SÁNCHEZ
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, D.C., Colombia

ROBERT TESH
University of Texas
GALVESTON, TX, ESTADOS UNIDOS

BRUNO TRAVI
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

GUSTAVO VALBUENA
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

JUAN MIGUEL VILLALOBOS
Universidade Federal de Rondônia
Porto Velho, Brasil

MOISÉS WASSERMAN
Investigador Emérito
Instituto Nacional de Salud
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, D.C., Colombia

CARLOS ARTURO HERNÁNDEZ
Edición y corrección de estilo

LINDA GRACE MOLANO
Asistencia editorial

MARTHA RENZA
Corrección de estilo

ELIZABETH GUZMÁN
Mercadeo digital

JOHANNA MORALES
Diagramación

© Instituto Nacional de Salud

La revista *Biomédica* del Instituto Nacional de Salud es una publicación trimestral, eminentemente científica. Está amparada por la resolución número 003768 de 1981, emanada del Ministerio de Gobierno, y con tarifa postal reducida según resolución número 1128 del 5 de mayo de 1982.

Ninguna publicación, nacional o extranjera, podrá reproducir ni traducir sus artículos ni sus resúmenes sin previa autorización escrita del editor. Ni la revista, ni el Instituto asumen responsabilidad alguna por los puntos de vista expresados por los autores. La revista no publicará ningún tipo de propaganda comercial. Los nombres de equipos, materiales y productos manufacturados que eventualmente puedan mencionarse, no implican recomendación ni propaganda para su uso y sólo se mencionan como identificación genérica.

La revista *Biomédica* aparece reseñada en *Index Medicus/Medline de la National Library of Medicine*, en el *Science Citation Index Expanded (also known as SciSearch®)* y *Journal Citation Reports/Science Edition de Thomson Scientific*, en *SciELO Colombia (Scientific Electronic Library Online)*, en el índice de la *Literatura Latinoamericana en Ciencias de la Salud (LILACS)*, en la Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (*RedAlyC*), en el *Índice Mexicano de Revistas Biomédicas Latinoamericanas (Imbiomed)*, en *Scopus* de Elsevier B.V., en el *Sistema de Información Bibliográfica Regional Andina (SIBRA)*, en *CAB Abstracts*, *Review of Medical and Veterinary Entomology*, y forma parte del *Índice Nacional de Publicaciones Seriadas Científicas y Tecnológicas Colombianas* de Colciencias y del *Índice Latinoamericano de Revistas Científicas y Tecnológicas (LATINDEX)*.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Avenida Calle 26 No. 51-20
Apartado aéreo 80334 y 80080
Bogotá, D.C., Colombia, S.A.

URL: <http://www.ins.gov.co>
biomedica@ins.gov.co

Impresión: Imprenta Nacional de Colombia

Contenido

Editorial

- Aedes aegypti* en el área rural: implicaciones en salud pública
Víctor Alberto Olano 169

Imágenes en biomedicina

- Virus de la influenza
Jorge Rivera, Marcela Neira, Ladys Sarmiento, Edgar Parra, María Leonor Caldas 174

Presentación de caso

- Eritema necrolítico migratorio y glucagonoma pancreático
Gerzain Rodríguez, Elga Vargas, Claudia Abaúnza, Sergio Cáceres 176

- Síndrome de Li-Fraumeni
Carlos Andrés Ossa, Gustavo Molina, Alicia María Cock-Rada 182

Ensayo

- Multimorbilidad: bases conceptuales, modelos epidemiológicos y retos de su medición
Julián A. Fernández-Niño, Eduardo Bustos-Vázquez 188

Artículo original

- Reconstitución inmune exitosa mediante trasplante de células madre hematopoyéticas en un paciente colombiano con enfermedad granulomatosa crónica
Yermis Carolina Rocha, Juan Álvaro López, Julio César Orrego, Yadira Coll, Amado Karduss, Sergio Rosenzweig, José Luis Franco 204

- La lipocalina asociada con la gelatinasa de neutrófilos como factor temprano de predicción de la función retardada del injerto renal
John Fredy Nieto-Ríos, Lina María Serna-Higueta, Catalina Ocampo-Kohn, Arbey Aristizábal-Alzate, Catalina Vélez-Echeverry, Juan José Vanegas-Ruiz, Ana María Bedoya, Sandra Lucía Lopera, Nury Rojano-Held, Nelson Darío Giraldo, Gustavo Adolfo Zuluaga-Valencia 213

- Factores asociados con la anemia en niños menores de tres años en Perú: análisis de la Encuesta Demográfica y de Salud Familiar, 2007-2013
José Enrique Velásquez-Hurtado, Yuleika Rodríguez, Marco Gonzáles, Laura Astete-Robilliard, Jessica Loyola-Romaní, Walter Eduardo Vigo, Ángel Martín Rosas-Aguirre 220

- Acción de la estreptozotocina en un modelo experimental de inducción neonatal de la diabetes
Leticia Bequer, Tahiry Gómez, José Luis Molina, Daniel Artilés, Rosa Bermúdez, Sonia Clapés 230

- Las células dendríticas generadas en presencia de vitamina D3 y activadas con lipopolisacáridos incrementan la producción de IL-1 β , IL-8 e IL-10 y disminuyen su capacidad de inducir LT CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺
Sindy M. Muñoz, Luz Stella Rodríguez 239

- Errores de medicación en pacientes atendidos en servicios ambulatorios de Colombia, 2005-2013
Jorge E. Machado-Alba, Juan Carlos Moncada, Paula Andrea Moreno-Gutiérrez 251

- Asociación entre la fuerza de las piernas y el área de sección muscular transversal del músculo cuádriceps femoral y el grado de actividad física en octogenarios
Pedro Á. Latorre-Román, Juan Manuel Arévalo-Arévalo, Felipe García-Pinillos 258

- Pérdida de seguimiento y factores asociados en pacientes inscritos en el programa de HIV/sida del Hospital Universitario San Ignacio, Colombia, 2012-2013
José Roberto Támara-Ramírez, Carlos Arturo Álvarez, Jesús Rodríguez 265

- Tratamiento farmacológico y deterioro de la función pulmonar en pacientes con diabetes de tipo 2: un estudio de corte transversal
Henry A. Vargas, Martín Rondón, Rodolfo Dennis 276

- Polimorfismo del gen del transportador de serotonina (5-HTT) y trastorno de depresión mayor en pacientes en Bogotá, Colombia
Isabel Pérez-Olmos, Delia Bustamante, Milciades Ibáñez-Pinilla 285

Comunicación breve

- Comparación y utilidad de las regiones mitocondriales de los genes 16S y COX1 para los análisis genéticos en garrapatas (Acari: Ixodidae)
Luis Enrique Paternina, Daniel Verbel-Vergara, Eduar Elías Bejarano 295

- Presencia de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) y su infección natural con el virus del dengue en alturas no registradas para Colombia
Freddy Ruiz-López, Ana González-Mazo, Andrés Vélez-Mira, Giovan F. Gómez, Luisa Zuleta, Sandra Uribe, Iván Darío Vélez-Bernal 303

Revisión de tema

- Biomarcadores moleculares para evaluar el riesgo para la salud debido a la exposición a contaminantes ambientales
Irais Poblete-Naredo, Arnulfo Albores 309

Instrucciones a los autores

Contents

Editorial

- Aedes aegypti* in rural areas: public health implications
Victor Alberto Olano 169

Images in biomedicine

- Influenza virus
Jorge Rivera, Marcela Neira, Ladys Sarmiento,
Édgar Parra, María Leonor Caldas 174

Case presentation

- Necrolytic migratory erythema and pancreatic
glucagonoma
Gerzaín Rodríguez, Elga Vargas, Claudia Abaúnza,
Sergio Cáceres 176

- Li-Fraumeni syndrome
Carlos Andrés Ossa, Gustavo Molina,
Alicia María Cock-Rada 182

Essay

- Multimorbidity: conceptual basis, epidemiological
models and measurement challenges
Julián A. Fernández-Niño, Eduardo Bustos-Vázquez 188

Original articles

- Successful immune reconstitution by means of
hematopoietic stem cell transplantation in a
Colombian patient with chronic granulomatous disease
Yermis Carolina Rocha, Juan Álvaro López,
Julio César Orrego, Yadira Coll, Amado Karduss,
Sergio Rosenzweig, José Luis Franco 204

- Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an
early predictor of delayed graft function
John Fredy Nieto-Ríos, Lina María Serna-Higuera,
Catalina Ocampo-Kohn, Arbey Aristizábal-Alzate,
Catalina Vélez-Echeverry, Juan José Vanegas-Ruiz,
Ana María Bedoya, Sandra Lucía Lopera,
Nury Rojano-Held, Nelson Darío Giraldo,
Gustavo Adolfo Zuluaga-Valencia 213

- Factors associated with anemia in children under
three years of age in Perú: analysis of the *Encuesta
Demográfica y de Salud Familiar*, ENDES, 2007-2013
José Enrique Velásquez-Hurtado, Yuleika Rodríguez,
Marco Gonzáles, Laura Astete-Robilliard,
Jessica Loyola-Romaní, Walter Eduardo Vigo,
Ángel Martín Rosas-Aguirre 220

- Streptozotocin diabetogenic action in an
experimental neonatal induction model
Leticia Bequer, Tahiry Gómez, José Luis Molina,
Daniel Artiles, Rosa Bermúdez, Sonia Clapés 230

- Dendritic cells generated in the presence of vitamin
D3 and stimulated with lipopolysaccharide secrete
IL-8, IL-1 β , IL-10 and induce relatively low levels of
CD4+CD25hiFoxp3+ T cells
Sindy M. Muñoz, Luz Stella Rodríguez 239

- Medication errors in outpatient care in Colombia,
2005-2013
Jorge E. Machado-Alba, Juan Carlos Moncada,
Paula Andrea Moreno-Gutiérrez 251

- Association between leg strength and muscle
cross-sectional area of the quadriceps femoris
with the physical activity level in octogenarians
Pedro Á. Latorre-Román, Juan Manuel Arévalo-Arévalo,
Felipe García-Pinillos 258

- Loss of follow-up and associated factors in patients
enrolled in the HIV/AIDS program of the *Hospital
Universitario San Ignacio*, Colombia, 2012-2013
José Roberto Támara-Ramírez, Carlos Arturo Álvarez,
Jesús Rodríguez 265

- Pharmacological treatment and impairment of
pulmonary function in patients with type 2 diabetes:
a cross-sectional study
Henry A. Vargas, Martín Rondón, Rodolfo Dennis 276

- Serotonin transporter gene (*5-HTT*) polymorphism and
major depressive disorder in patients in Bogotá, Colombia
Isabel Pérez-Olmos, Delia Bustamante,
Milcíades Ibáñez-Pinilla 285

Brief communication

- Comparison of *16S* and *COX1* genes mitochondrial
regions and their usefulness for genetic analysis
of ticks (Acari: Ixodidae)
Luis Enrique Paternina, Daniel Verbel-Vergara,
Eduar Elías Bejarano 295

- Presence of *Aedes (Stegomyia) aegypti*
(Linnaeus, 1762) and its natural infection with
dengue virus at unrecorded heights in Colombia
Freddy Ruiz-López, Ana González-Mazo, Andrés
Vélez-Mira, Giovan F. Gómez, Luisa Zuleta, Sandra
Uribe, Iván Darío Vélez-Bernal 303

Topic review

- Molecular biomarkers to assess health risks due to
environmental contaminants exposure
Irais Poblete-Naredo, Arnulfo Albores 309

Instructions for authors

Editorial

***Aedes aegypti* en el área rural: implicaciones en salud pública**

El mosquito *Aedes aegypti* (L) es considerado como el vector primario de los virus del dengue, del chikungunya, del zika y de la fiebre amarilla urbana en el continente americano (1). La especie también ha sido incriminada como posible vector urbano de la encefalitis equina venezolana (2). El papel de *A. aegypti* como transmisor de enfermedades al hombre fue demostrado por el médico estadounidense Walter Reed en 1901, confirmando la hipótesis planteada por el médico cubano Carlos Finlay en el sentido de que *A. aegypti* era el vector de la fiebre amarilla (3).

Este mosquito es originario de África, en donde su forma ancestral se desarrollaba en huecos de árboles, y las hembras del mosquito presentaban hábitos zoofílicos (4). Según Gast-Galvis (5), el insecto fue introducido al continente americano en los barcos que transportaban esclavos y atracaban en las costas americanas durante la época de la Conquista y la Colonia, y allí adquirió hábitos domésticos, desarrollándose fundamentalmente en depósitos artificiales fabricados por el hombre, aunque también en depósitos naturales en áreas urbanas.

Aedes aegypti penetró al interior del país desde Cartagena cuando se estableció la navegación por el río Magdalena, y la especie se detectó en Neiva (Huila) en 1880, en Bucaramanga (Santander) en 1906 y en El Socorro (Santander) en 1929, lugar en donde ocurrió la última epidemia de fiebre amarilla urbana en el país. Para 1949, el mosquito ya se encontraba en la Costa Atlántica, en Buenaventura y en los valles de los ríos Magdalena y Cauca. En 1950 se inició una agresiva campaña de eliminación de *A. aegypti* en el país en el marco del plan continental de erradicación de *A. aegypti* en las Américas (5), y el país permaneció libre del mosquito entre 1961 y 1967, excepto en la ciudad de Cúcuta, hecho que, conjuntamente con el deterioro y descuido en las actividades de vigilancia del vector, probablemente contribuyó a la reinfestación de la costa norte colombiana a partir de 1968. Para 1997, el vector se encontraba en 29 departamentos del país, con excepción de Amazonas, Vaupés y Guainía (6), y en el 2010, ya se registraba en todo el país, generalmente en áreas urbanas por debajo de los 1.800 msnm (7), aunque fue detectado a 2.200 msnm en Málaga (Santander) (8) y, recientemente, en zona rural del municipio de Bello (Antioquia) a 2.302 msnm, el registro de mayor altitud para este insecto en Colombia hasta el momento (9).

Los principales sitios de cría de *A. aegypti* en áreas urbanas son las albercas, los tanques de almacenamiento de agua para consumo, las llantas, los floreros, las latas y las botellas, los canales de desagüe en los techos, las cisternas, las cortezas de coco, los sumideros de agua lluvia y los criaderos naturales como las axilas de las hojas de las plantas. Por lo general, esta especie de mosquito se cría en agua limpia (10,11), pero el insecto está colonizando nuevos hábitats, como se ha descrito en Puerto Rico, en donde los pozos sépticos con alto contenido de materia orgánica en descomposición producen cantidades importantes del mosquito (12,13).

En algunos países de Latinoamérica, como Brasil y Cuba, la especie se ha hallado en áreas rurales (14,15), y también en el territorio indígena del estado Bolívar de Venezuela, lo cual constituye una alarma ante el riesgo de introducción del dengue en áreas selváticas ya que podría tener graves efectos en la salud de la población indígena (16).

En Colombia, el primer sitio en área rural en donde se encontró fue en la vereda Santa Bárbara, municipio de La Mesa (Cundinamarca), en 1981, hallazgo que tuvo gran importancia por sus implicaciones para los programas de control del insecto (17). En una encuesta realizada al año siguiente en áreas rurales de algunos departamentos del país, se registró infestación rural por *A. aegypti* en nueve municipios de Cundinamarca, uno del Tolima, uno del Huila, dos del Cesar y dos de Santander (18). En estudios

posteriores en viviendas y escuelas del área rural de los municipios de Anapoima y Apulo (Cundinamarca), se determinó una alta infestación de este vector (Olano VA, Vargas SL, Matiz MI, Jaramillo JF. Distribución de *Aedes aegypti* y casos probables de dengue en el área rural del municipio de Anapoima, Cundinamarca. XV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Biomédica. 2011;31(Supl.3):29; Cabezas L, Salas S, Matiz MI, Jaramillo JF, Sarmiento D, Olano VA. Residuos sólidos como criaderos potenciales de *Aedes aegypti* en escuelas y viviendas aledañas en el área rural del municipio de Apulo. XV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Biomédica. 2011;31(Supl.3):25).

Su hallazgo en escuelas rurales plantea la importancia epidemiológica de determinar el papel de las escuelas y otros entornos diferentes a las viviendas, tales como sitios de trabajo, hospitales y aeropuertos, ya que pueden ser sitios con hábitats potenciales para la cría de *A. aegypti* y desempeñar un importante papel en la transmisión del dengue, entre otras enfermedades (19-21). Los resultados de un estudio en las escuelas rurales de los municipios de La Mesa y Anapoima indicaron que estos sitios pueden ser focos de transmisión del dengue y de otras enfermedades transmitidas por mosquitos (22). En estos mismos municipios se detectó la circulación de los cuatro serotipos del dengue en *A. aegypti*, en lo que constituye el primer reporte de infección de esta especie en áreas rurales de Colombia (23).

En estudios recientes se sugiere que en algunos países latinoamericanos, como México, Perú, Paraguay, Ecuador y Bolivia, se presenta la transmisión rural de dengue (Connors R. Road access linked to dengue fever risk in rural Ecuador. ASTMH 57th Annual Meeting, New Orleans, December 7-11, 2008) (24-28). En Colombia, según un estudio llevado a cabo en Urabá (Antioquia), 17,2 % de los casos procedía del área rural (29) y, según el Instituto Nacional de Salud, 9,6 y 10,7 % de los casos de dengue y dengue grave registrados en el país son de procedencia rural (30).

La transmisión de enfermedades como el dengue, la fiebre de zika y la del chikungunya podría hacerse más compleja en las áreas rurales del país ante la presencia de la especie *Aedes albopictus* (S), considerada vector competente de estas arbovirosis (31-32). Este mosquito predomina en áreas rurales y se desarrolla en los mismos criaderos artificiales mencionados para *A. aegypti*, y también en criaderos naturales, aunque se adapta mejor a estos últimos (31). En un estudio en Buenaventura, se encontraron formas inmaduras infectadas con el virus 1 de dengue, lo que sugeriría la transmisión vertical de este virus (33). Este mosquito es originario de Asia y su presencia en el continente americano se remonta a 1903, cuando se le detectó en Hawaii (34); posteriormente, en 1985, se registró en Estados Unidos en llantas usadas provenientes de Asia (35). En Colombia fue detectado por primera vez en Leticia (Amazonas) en 1998 (36) y actualmente se encuentra en diez departamentos (37).

La vigilancia entomológica de *A. aegypti* como componente de la vigilancia en salud pública del dengue, se ha venido realizando en el país generalmente en las viviendas de las áreas urbanas, donde se han identificado los sitios de cría más productivos de este mosquito (38,39), pero no en las áreas rurales, por lo cual los programas de control de vectores no las contemplan en sus actividades de prevención de enfermedades transmitidas por vectores. Hay algunos aspectos que condicionan y proporcionan hábitats para que los vectores colonicen exitosamente las áreas rurales: la falta de un suministro continuo de agua para consumo humano obliga a las personas a almacenarla en forma inadecuada, lo que facilita la cría del vector; la inadecuada disposición de los residuos sólidos también facilita la aparición de criaderos potenciales para el mosquito y, aunque esta situación es común en diferentes poblaciones de nuestro país, se hace mucho más crítica en las áreas rurales.

En América Latina y el Caribe, el 6 % de la población no tiene acceso a una fuente mejorada de agua potable y el 17 % no tiene acceso a servicios mejorados de saneamiento. La situación es especialmente grave en las zonas rurales, donde solo el 83 % cuenta con fuentes mejoradas de agua potable en comparación con el 88 % de la población urbana. A su vez, solo el 63 % de la población rural tiene acceso a instalaciones mejoradas de saneamiento en comparación con el 88 % de la población urbana (40).

En Colombia, el 9 % de la población no cuenta con una fuente mejorada de agua potable (3 % de la población urbana y 26 % de la rural) y el 19 % no tiene acceso a instalaciones mejoradas de saneamiento (15 % de la población urbana y 32 % de la rural) (41). Por otra parte, el 21 % de los municipios carece de programas de recolección de residuos sólidos, lo cual obliga al uso de métodos de disposición final a cielo abierto y ello proporciona sitios de cría para *A. aegypti* (41,42).

Las vías de comunicación y de transporte han facilitado también la dispersión de *A. aegypti* al área rural, lo cual ha facilitado la entrada del dengue a comunidades de áreas rurales. La presencia de *A. aegypti* en áreas rurales próximas a las áreas endémicas de transmisión del virus de la fiebre amarilla selvática es un factor de riesgo para que este virus ingrese a localidades urbanas y retorne la fiebre amarilla urbana.

Lo anterior evidencia la necesidad de fortalecer los programas estatales para garantizar la cobertura de agua potable, saneamiento y buena disposición de los residuos sólidos en áreas rurales, así como también los programas de vigilancia y control de *A. aegypti*. Asimismo, se debe integrar la vigilancia entomológica de *A. aegypti* en áreas rurales a los programas regulares de vigilancia entomológica de este vector en áreas urbanas, así como la vigilancia de *A. albopictus* ante la evidencia de su participación en la transmisión de algunos arbovirus como el dengue y el chikungunya en el continente americano (31).

Por último, cabe señalar que, si bien es cierto que la magnitud de la transmisión del dengue en áreas rurales no es comparable con la de las áreas urbanas, ello no implica que no sea necesario mantener un sistema de vigilancia activo y eficiente (epidemiológico, por laboratorio y entomológico) en estas comunidades. Como se mencionó previamente, los estudios recientes sugieren que se está presentando la transmisión de dengue en áreas rurales en algunos países latinoamericanos, lo cual ha ocasionado incluso brotes y muerte. En Colombia hay evidencia de transmisión rural de esta enfermedad. Ante la presencia de nuevos virus en el país como el del chikungunya y el zika, que tanto impacto han causado en la salud pública, y ante el riesgo de la llegada de otros virus, es necesario implementar y fortalecer la vigilancia epidemiológica, entomológica y por el laboratorio en áreas rurales.

Víctor Alberto Olano

Investigador Emérito, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Instituto de Salud y Ambiente, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia

olanovictor@unbosque.edu.co

Referencias

1. **Pan American Health Organization.** Scientists studying intensified vector control measures to combat zika, dengue and chikungunya in the Americas. Fecha de consulta: 11 de marzo de 2016. Disponible en: http://www2.paho.org/HQ/index.php?option=com_content&view=article&id=11780%3Ascientists-studying-intensified-vector-control-measures-to-combat-zika-dengue-chikungunya-americas&Itemid=1926&lang=en.
2. **Suárez OM, Bergold GH.** Investigations of an outbreak of Venezuelan equine encephalitis virus in towns of eastern Venezuela. *Am J Trop Med Hyg.* 1968;17:875-80.
3. **Cristophers SR.** *Aedes aegypti* (L). The yellow fever mosquito. Cambridge: University Press; 1960.
4. **Powell JR, Tabachnick WJ.** History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108:11-7. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276130395>
5. **Gast-Galvis A.** Historia de la fiebre amarilla en Colombia. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 1982.
6. **Olano VA, Padilla JC, Sáenz R, Morales A, Pinzón E, Ferro C, et al.** Distribución del *Aedes aegypti* 1997. *Inf Quin Epidemiol Nac.* 1998;2:94-6.
7. **Padilla JC, Rojas DP, Sáenz-Gómez R.** Dengue en Colombia. Epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia. Primera edición. Bogotá: Guías de Impresión, Ltda.; 2012.
8. **Suárez MF, Nelson MJ.** Registro de altitud del *Aedes aegypti* en Colombia. *Biomédica.* 1981;1:225. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v1i4.1809>
9. **Ruiz-López F, González-Mazo A, Vélez-Mira A, Gómez GF, Zuleta L, Uribe S, et al.** Presencia de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) y su infección natural con el virus dengue en alturas no registradas para Colombia. *Biomédica.* 2016;36:303-8. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.3301>
10. **Tinker M, Olano VA.** Ecología del *Aedes aegypti* en un pueblo de Colombia, Sur América. *Biomédica.* 1993;13:5-14. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v13i1.2041>
11. **González R, Gamboa R, Perafán O, Suárez MF, Montoya J.** Experience of an entomological analysis of the breeding sites of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* in Cali, Colombia. *Rev Colomb Entomol.* 2007;33:148-56.
12. **Barrera R, Amador M, Díaz A, Smith J, Muñoz-Jordán JL, Rosario Y.** Unusual productivity of *Aedes aegypti* in septic tanks and its implications for dengue control. *Med Vet Entomol.* 2008;22:62-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2915.2008.00720.x>

13. **Mackay AJ, Amador M, Díaz A, Smith J, Barrera R.** Dynamics of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* in septic tanks. *J Am Mosq Control Assoc.* 2009;25:409-16. <http://dx.doi.org/10.2987/09-5888.1>
14. **De Lima-Tamara TN, Honório NA, Lourenco-de-Oliveira R.** Frequency and spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) in Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saúde Pública.* 2006;22:2079-84. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2006001000013>
15. **Marquetti MC, Bisset J, Leyva M, García A, Rodríguez M.** Comportamiento estacional y temporal de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en La Habana, Cuba. *Rev Cubana Med Trop.* 2008;60:62-7.
16. **Rubio-Palis Y, Guzmán H, Espinoza J, Cárdenas L, Bevilacqua M, Medina D.** Primer registro de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) en áreas remotas del estado Bolívar. *Bol Mal Salud Amb.* 2011;51:89-91.
17. **Morales A.** *Aedes aegypti* en zona rural del municipio de La Mesa (Cundinamarca) Colombia. *Biomédica.* 1981;1:223-4. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v1i4.1806>
18. **Nelson JM, Suárez MF, Morales A, Archila L, Galvis E.** *Aedes aegypti* in rural areas of Colombia. Geneva: WHO/VBC; 1984.
19. **García-Rejón JE, Lorono-Pino MA, Farfán-Ale JA, Flores-Flores LF, López-Urbe MP, Nájera-Vásquez MR, et al.** Mosquito infestation and dengue virus infection in *Aedes aegypti* females in schools in Mérida, México. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84:489-96. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0654>
20. **Morrison AC, Sihuincha M, Stancil JD, Zamora E, Astete H, Olson JG, et al.** *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) production from non-residential sites in the Amazonian city of Iquitos, Peru. *Ann Trop Med Parasitol.* 2006;100(Suppl.1):S73-86.
21. **Dos Reis IC, Honório NA, Codeço CT, Magalhães Mde A, Lourenço-de-Oliveira R, Barcellos C.** Relevance of differentiating between residential and non-residential premises for surveillance and control of *Aedes aegypti* in Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop.* 2010;114:37-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.01.001>
22. **Olano VA, Matiz MI, Lenhart A, Cabezas L, Vargas SL, Jaramillo JF, et al.** Schools as potential risk sites for vector-borne disease transmission: Mosquito vectors in rural schools in two municipalities in Colombia. *J Am Mosq Control Assoc.* 2015;31:212-22. <http://dx.doi.org/10.2987/moco-31-03-212-222.1>
23. **Pérez-Castro R, Castellanos JE, Olano VA, Matiz MI, Jaramillo JF, Vargas SL, et al.** Detection of all four dengue serotypes in *Aedes aegypti* female mosquitoes collected in a rural in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;111:233-40. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760150363>
24. **Sosa-Cabrera TJ, Santos-Pérez M.** Caracterización clínica y de laboratorio de un brote de dengue en un área rural de Campeche, México. *Rev Cubana Med Trop.* 2008;60:136-40.
25. **Escobar-Mesa J, Gómez-Dantés H.** Determinantes de la transmisión de dengue en Veracruz: un abordaje ecológico para su control. *Salud Pública Méx.* 2003;45:43-53.
26. **Troyes L, Villegas Z, Troyes M.** Expansión del *Aedes aegypti* a localidades rurales de Cajamarca. *Rev Perú Med Exp Salud Pública.* 2006;23:163-7.
27. **Carpinelli M, Picaguá E, Rovira C, Giménez V, Ferreira L, Rodas J.** Frecuencia de dengue durante el brote epidémico en individuos que acudieron al Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS), desde febrero a abril del 2007. *Mem Inst Investig Cienc Salud.* 2009;5:15-20.
28. **Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL).** Evaluación de la epidemia de dengue en el Estado Plurinacional de Bolivia en 2009. Santiago de Chile; Naciones Unidas: 2010.
29. **Arboleda M, Campuzano M, Restrepo B, Cartagena G.** Caracterización clínica de los casos de dengue hospitalizados en la E.S.E. Hospital "Antonio Roldán Betancur", Apartadó, Antioquia, Colombia. *Biomédica.* 2006;26:286-94. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v26i2.1418>
30. **Instituto Nacional de Salud.** Informe final dengue, Colombia, 2014. Fecha de consulta: 11 de marzo de 2016. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/Dengue%202014.pdf>
31. **Rey JR, Lounibus P.** Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. *Biomédica.* 2015;35:177-85. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v35i2.2514>
32. **Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A.** Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg.* 1969;18:411-5.
33. **Méndez F, Barreto M, Arias JF, Rengifo G, Muñoz J, Burbano ME, et al.** Human and mosquito infections by dengue viruses during and after epidemics in a dengue-endemic region of Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74:678-83.
34. **Bonnet DD, Worcester DJ.** The dispersal of *Aedes albopictus* in the territory of Hawaii. *Am J Trop Med Hyg.* 1946;26:465-76.
35. **Sprenger D, Wuithiranyagool T.** The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas. *J Am Mosq Control Assoc.* 1986;2:217-8.

36. **Vélez ID, Quiñones ML, Suárez M, Olano V, Murcia L, Correa E. et al.** Presencia de *Aedes albopictus* en Leticia, Amazonas, Colombia. *Biomédica*. 1998;18:182-98. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v18i3.990>
37. **Carvajal JJ, Honorio N, Díaz SP, Ruiz ER, Asprilla J, Ardila S, et al.** Detección de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) en el municipio de Istmina, Chocó, Colombia. *Biomédica*. 2016;36. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2805>
38. **Quintero J, Brochero H, Manrique-Saide P, Barrera-Pérez M, Basso C, Romero S, et al.** Ecological, biological and social dimensions of dengue vector breeding in five urban settings of Latin America: A multi-country study. *BMC Infect Dis*. 2014;14:38. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-14-38>
39. **Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud.** Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión del dengue. Colombia. Fecha de consulta: 14 de abril de 2016. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/dengue/03%20vigilancia%20entomo%20dengue.pdf>
40. **Organización Panamericana de la Salud.** PAHO WHO: Data and Statistics. 2015. Fecha de consulta: 14 de abril de 2016. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=2470%3A2010-data-statistics&catid=1900%3Adata-statistics-home&Itemid=2003&lang=es.
41. **Rodríguez LA, Ramos Hidalgo CX.** Situación de la disposición final de los residuos sólidos en Colombia. Bogotá: Superintendencia de Servicios Públicos Domiciliarios; 2013.
42. **Sidalc B.** Proyecto selección de tecnologías para la recolección, transporte, recuperación, tratamiento y disposición final en torno al manejo integral de residuos sólidos en municipios menores de 50.000 habitantes. Informe de políticas y normatividad. Cali: IDEAM, UNICEF & CINARA; 2005.

IMÁGENES EN BIOMEDICINA

Virus de la influenza

Jorge Rivera¹, Marcela Neira², Ladys Sarmiento¹, Édgar Parra², María Leonor Caldas¹

¹ Grupo de Morfología Celular, Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

² Grupo de Patología, Subdirección de la Red Nacional de Laboratorios, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

El virus de la influenza es un importante agente patógeno humano que causa infecciones respiratorias y una considerable morbimortalidad anual a nivel mundial (1,2). El virus puede circular esporádicamente durante brotes locales como parte de una epidemia estacional o puede generar una pandemia mundial. Durante las epidemias estacionales, la mortalidad se reporta principalmente entre personas muy jóvenes y adultos mayores; la Organización Mundial de la Salud estima que cada año se presentan entre tres y cinco millones de casos de enfermedad grave y de 250.000 a 500.000 muertes en el mundo (3,4). Las pandemias de influenza se presentan cuando se produce un reordenamiento genético del virus (*antigen shift*) que da lugar a una variante antigénicamente novedosa para la cual no hay anticuerpos en la población. Hasta la fecha se han reportado pandemias en 1918, 1957, 1968 y 2009, las cuales causaron la muerte de 60 millones de personas, aproximadamente (5-8).

El virus de la influenza pertenece a la familia Orthomixoviridae y comprende tres tipos (A, B y C), cuyas diferencias radican en la base de un antígeno soluble (antígeno S) que se asocia con la ribonucleoproteína interna del virión; el tipo viral puede diferenciarse a partir de las propiedades biológicas de las proteínas proyectadas en la superficie de la envoltura, las glucoproteínas hemaglutinina (H) y neurominidasa (N) (9), diferenciación

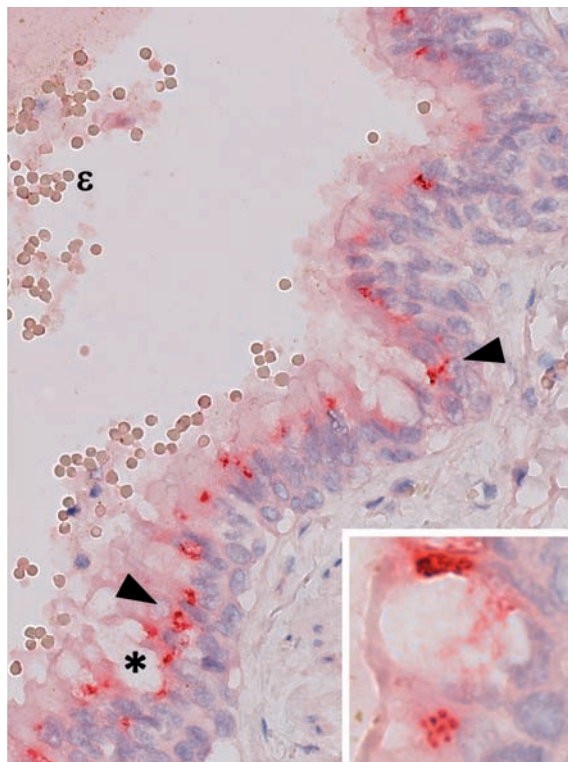


Figura 1. Antígenos del virus de influenza A H1N1/v09 en células infectadas de tejido pulmonar de un paciente fallecido por la influenza, cuyo caso fue reportado en la pandemia de 2009 en Colombia.

Se observa inmunorreacción en las células del epitelio pseudo-estratificado (puntas de flecha) y en las células caliciformes (*) del bronquiolo pulmonar. El epitelio bronquiolar está cubierto a lo largo de toda su superficie con moco rico en polisacáridos, y sus células presentan el antígeno viral con una distribución homogénea y persistente en la superficie apical del citoplasma. En la región basal del epitelio se observan células que descansan sobre la lámina propia sin ningún cambio morfológico evidente. En el inserto sobresale la presencia del antígeno viral en las células caliciformes del epitelio bronquiolar. Se observan eritrocitos en la luz del bronquiolo (ε). Inmunohistoquímica mediante el sistema de fosfatasa alcalina; anticuerpo usado: anti-influenza A para antígeno viral (Chemicon International), 1.000X; inserto, 3.200X.

Correspondencia:

María Leonor Caldas, Avenida calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia

Teléfono: 220 7700; extensión 1262

mcaldas@ins.gov.co

Recibido: 23/11/15; aceptado: 01/03/16

Contribución de los autores:

Jorge Rivera: selección y análisis del caso, procesamiento de las muestras para el estudio inmunohistoquímico y escritura del manuscrito

Marcela Neira: procesamiento de las muestras para el estudio inmunohistoquímico

Ladys Sarmiento: análisis del caso, revisión y edición del manuscrito

Édgar Parra: diagnóstico histopatológico mediante microscopía de luz convencional

María Leonor Caldas: revisión y edición del manuscrito

que da lugar a 15 subtipos de H y nueve subtipos de N. Sin embargo, solo tres subtipos de la hemaglutinina (H1, H2 y H3) y dos subtipos de la neurominidasa (N1 y N2) se han establecido en la población humana (10).

El diagnóstico clínico de la infección por el virus de la influenza es presuntivo, por lo cual se requiere la confirmación por el laboratorio. Los métodos tradicionales de diagnóstico incluyen el aislamiento viral o la serología (11,12), la detección del genoma viral mediante la hibridación *in situ* o PCR de transcripción inversa en tiempo real (*real-time reverse transcriptase PCR*, rRT-PCR) para evaluar la expresión génica en los tejidos y células (13,14,15), y la detección de antígenos mediante anticuerpos monoclonales y policlonales en los tejidos fijados con formol e incluidos en parafina utilizando métodos inmunohistoquímicos (16-18).

Uno de los principales tipos de células que el virus infecta son las células ciliadas del epitelio bronquiolar, como se ilustra en la figura 1. En este tipo celular, la localización de los antígenos virales en el epitelio bronquiolar está asociada a la presencia de los receptores ácido siálico y galactosa α -2,6. Estos receptores son reconocidos por la hemaglutinina de la partícula viral que media la formación del endosoma en la célula huésped (19,20), y se encuentran distribuidos principalmente en el epitelio bronquiolar y en menor medida en las áreas alveolares (21).

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no existen conflictos de intereses.

Financiación

Este trabajo fue financiado por la Dirección de Investigación en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud.

Referencias

- Schnitzler SU, Schnitzler P.** An update on swine-origin influenza virus A/H1N1: A review. *Virus Genes*. 2009;39:279-92. <http://dx.doi.org/10.1007/s11262-009-0404-8>
- Taubenberger J, Morens D.** The pathology of influenza virus infections. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:499-522. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154316>
- World Health Organization.** Influenza (seasonal). Fact sheet N° 211, March, 2014. Fecha de consulta: 14 de octubre de 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en>.
- Barker W, Mullooly J.** Pneumonia and influenza deaths during epidemics: Implications for prevention. *Arch Intern Med*. 1982;142:85-9. <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.1982.00340140087016>
- Michaelis M, Doerr HW, Cinatl J Jr.** An influenza A H1N1 virus revival - pandemic H1N1/09 virus. *Infection*. 2009;37:381-9. <http://dx.doi.org/10.1007/s15010-009-9181-5>
- Sullivan SJ, Jacobson RM, Dowdle WR, Poland GA.** 2009 H1N1 influenza. *Mayo Clin Proc*. 2010;85:64-76. <http://dx.doi.org/10.4065/mcp.2009.0588>
- Craighead J.** Influenza viruses. En: Craighead J, editor. Pathology and pathogenesis of human viral disease. First edition. St. Louis: Academic Press; 2000. p. 35-46.
- Instituto Nacional de Salud.** Semana epidemiológica número 18 de 2010. Boletín Epidemiológico Semanal del 2 al 8 de mayo de 2010. Bogotá, D.C.: INS; 2010.
- Hinrichs S, Harrison C, Haggerty S.** Viral diseases. En: Damjanov I, Linder J, editors. Anderson's pathology. Tenth edition. St. Louis: Mosby Yearbook Inc.; 1996. p. 922-3.
- Nicholson K, Wood J, Zambon M.** Influenza. *Lancet*. 2003;362:1733-45. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14854-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14854-4)
- Teichtahl H, Buckmaster N, Pertnikovs E.** The incidence of respiratory tract infection in adults requiring hospitalization for asthma. *Chest*. 1997;112:591-6. <http://dx.doi.org/10.1378/chest.112.3.591>
- Mäkelä MJ, Nikkari S, Meurman O, Laine M, Arvilommi H.** Virus-specific, antibody-secreting cells during upper respiratory infections. *J Med Virol*. 1995;47:416-20.
- Guarner J, Shieh W, Dawson J, Subbarao K, Shaw M, Ferebee T, et al.** Immunohistochemical and *in situ* hybridization studies of influenza A virus infection in human lungs. *Am J Clin Pathol*. 2000;114:227-33. <http://dx.doi.org/10.1309/HV74-N24T-2K2C-3E8Q>
- Cheon S, Chae C, Lee Y.** Detection of nucleic acids of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the lungs of naturally infected piglets as determined by *in-situ* hybridization. *J Comp Pathol*. 1997;117:157-63.
- World Health Organization.** CDC protocol of real time RT-PCR for influenza H1N1. Geneva: WHO Fecha de consulta: 19 de noviembre de 2015. Disponible en: <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimeptcr/en/>.
- Haines D, Waters E, Clark E.** Immunohistochemical detection of swine influenza virus in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Can J Vet Res*. 1993;57:33-6.
- Vincent L, Janke B, Paul P, Halbur P.** A monoclonal antibody-based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Vet Diagn Invest*. 1997;9:191-5. <http://dx.doi.org/10.1177/104063879700900214>
- Guarner J, Paddock C, Shieh W, Packard M, Patel M, Montague J, et al.** Histopathologic and immunohistochemical features of fatal influenza virus infection in children during the 2003-2004 season. *Clin Infect Dis*. 2006;43:132-40. <http://dx.doi.org/10.1086/505122>
- Rogers G, Paulson J.** Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: Differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology*. 1983;127:361-73.
- Gagneux P, Cheriyan M, Hurtado-Ziola N, van der Linden E, Anderson D, McClure H, et al.** Human-specific regulation of alpha 2-6-linked sialic acids. *J Biol Chem*. 2003;278:48245-50. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M309813200>
- Nelli R, Kuchipudi S, White G, Pérez B, Dunham S, Chang K.** Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig. *BMC Vet Res*. 2010;6:4. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-6-4>

PRESENTACIÓN DE CASO

Eritema necrolítico migratorio y glucagonoma pancreático

Gerzaín Rodríguez¹, Elga Vargas², Claudia Abaúnza², Sergio Cáceres³

¹ Grupo de Microbiología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Chía, Colombia

² Grupo de Patología Quirúrgica, Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Chía, Colombia

³ Clínica de la Piel, Cúcuta, Colombia

El eritema necrolítico migratorio es una dermatosis paraneoplásica infrecuente que puede ser la primera manifestación clínica del glucagonoma, el cual se caracteriza por erupción mucocutánea, intolerancia a la glucosa, hipoaminoacidemia, hiper glucagonemia y glucagonoma pancreático.

Se presenta el caso clínico de una mujer de 45 años que presentó pérdida de peso, polidipsia, polifagia, vómito posprandial, caída abundante del cabello y dolor abdominal de dos meses de evolución. Tenía, además, placas eritematosas, descamativas y migratorias en tronco, periné, codos, manos, pies, pliegues submamaros y antecubitales de 20 días de evolución.

En la biopsia de piel se observaron células epidérmicas altas con cambio vacuolar notorio, extensa necrosis y delgada capa córnea ortoqueratósica, hallazgos interpretados como eritema necrolítico migratorio.

Se sugirió investigar un glucagonoma pancreático. En los exámenes de laboratorio se encontró anemia moderada, hiperglucemia e importante hiperglucagonemia. La ecografía abdominal reveló una masa de 6 x 5 x 5 cm en la cola pancreática, la cual fue resecada. El diagnóstico histopatológico fue de glucagonoma confirmado por inmunohistoquímica. Los síntomas cutáneos desaparecieron a los 10 días de la resección tumoral.

Se concluye que los cambios histológicos observados pueden ser claves en la búsqueda de una enfermedad distante de la piel y permiten hacer su diagnóstico. El patrón histológico de vacuolización y necrosis epidérmica subcórnea debe llevar a sospechar la presencia de un glucagonoma pancreático.

Palabras clave: eritema necrolítico migratorio, glucagonoma, neoplasias pancreáticas, síndromes paraneoplásicos, eritema, manifestaciones cutáneas.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2723>

Necrolytic migratory erythema and pancreatic glucagonoma

Necrolytic migratory erythema is a rare paraneoplastic dermatosis that may be the first clinical manifestation of the glucagonoma syndrome, a disorder characterized by mucocutaneous rash, glucose intolerance, hypoaminoacidemia, hyperglucagonaemia and pancreatic glucagonoma.

The clinical case of a 45-year-old woman is presented. She had been experiencing weight loss, polydipsia, polyphagia, postprandial emesis, excessive hair loss and abdominal pain for two months. Erythematous, scaly and migratory plaques with 20 days of evolution were found on her trunk, perineum, elbows, hands, feet, inframammary and antecubital folds. The skin biopsy revealed noticeable vacuolar changes in high epidermal cells, extensive necrosis and thin orthokeratotic cornified layer.

These findings pointed to a diagnosis of necrolytic migratory erythema. A suggestion was made to investigate a pancreatic glucagonoma. Laboratory tests showed moderate anemia, hyperglycemia and marked hyperglucagonaemia. Abdominal ultrasound revealed a mass in the tail of the pancreas measuring 6 x 5 x 5 cm which was resected. The histopathological findings were compatible with a diagnosis of glucagonoma, as confirmed by immunohistochemistry. Skin symptoms disappeared 10 days after the tumor resection.

We can conclude that the histological changes defined may be clues that can lead the search for a distant skin disease and allow for its diagnosis. The histological pattern of vacuolation and epidermal necrosis should arouse suspicion of pancreatic glucagonoma.

Key words: Necrolytic migratory erythema, glucagonoma, pancreatic neoplasms, paraneoplastic syndromes, erythema, skin manifestations.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2723>

Contribución de los autores:

Sergio Cáceres: manejo clínico del paciente, toma de las biopsias y de las fotografías clínicas

Gerzaín Rodríguez: estudio histológico de las biopsias, revisión de la literatura y redacción del artículo

Elga Vargas y Claudia Abaúnza: revisión de la literatura, redacción del artículo y toma de fotografías histológicas

Caso clínico

Se trata de una mujer de 45 años con polidipsia, polifagia, vómito posprandial, dolor abdominal, pérdida de peso, astenia, bradipsiquia y caída del cabello, de dos meses de evolución. Veinte días antes de la consulta habían aparecido placas eritematosas, descamativas, migratorias, con centro hiperpigmentado y escamocostras en los bordes, localizadas en su tronco, región perineal, codos, manos, pies y pliegues antecubitales (figura 1). La paciente medía 152 cm y pesaba 43 kg. La madre y una hermana padecían diabetes mellitus y un hermano había fallecido con manifestaciones clínicas semejantes a las suyas.

En la biopsia de una lesión cutánea se observó epidermis acantósica con capa córnea delgada ortoqueratósica, vacuolización y necrosis de los queratinocitos espinosos y de los granulocitos con formación de una banda eosinófila con algunos neutrófilos polimorfonucleares. En la dermis se observó infiltrado inflamatorio linfocítico perivascular superficial (figura 2). Se diagnosticó como eritema necrolítico migratorio y se sugirió investigar la presencia de un glucagonoma pancreático.

En los exámenes de laboratorio se informó anemia (hemoglobina: 10 g/dl; hematocrito: 30 %), hiperglucemia (130 mg/dl), cetonuria e hiperglucagonemia (1.000 pg/ml; normal: 50-100 pg/ml). En la ecografía abdominal se evidenció una masa de 6 x 5 x 5 cm en la cola pancreática. Se practicó pancreatectomía distal con esplenectomía y el estudio histopatológico del tumor correspondió a un glucagonoma confirmado por inmunohistoquímica (figura 3). No se demostraron metástasis.

Las lesiones cutáneas se resolvieron 10 días después de la resección quirúrgica del tumor. En el control posoperatorio a los pocos meses se encontró una mejoría gradual del estado general de la paciente.

Discusión

Las dermatosis paraneoplásicas son infrecuentes, de difícil diagnóstico (1) y se clasifican en enfermedades hiperqueratósicas, vasculares del tejido



Figura 1. Placas eritematosas, descamativas e hiperpigmentadas

conjuntivo, proliferativas dérmicas, alteraciones de depósito dérmico, dermatosis neutrofilicas, ampollas y eritemas reactivos. En este último grupo está incluido el eritema necrolítico migratorio (2).

El eritema necrolítico migratorio se presenta con lesiones mucocutáneas que pueden preceder el diagnóstico de un glucagonoma pancreático, en un año, en promedio (3); es frecuente que su diagnóstico sea tardío (3 a 12 años) (3,4), lo que aumenta la posibilidad de metástasis. El caso que se describe es excepcional, ya que el diagnóstico se hizo a los 20 días de aparecer la erupción cutánea.

El eritema necrolítico migratorio se caracteriza por parches eritematosos irregulares que evolucionan en placas anulares erosionadas, coalescentes y recubiertas por ampollas y costras. La erupción es evanescente, dolorosa, pruriginosa (2-8) y simula otras afecciones, como el eccema, la dermatitis seborreica, la dermatitis de contacto, la psoriasis, y el intertrigo o candidiasis (5,9). En 95 % de los casos compromete las zonas intertriginosas (ingles,

Correspondencia:

Gerzain Rodríguez, Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Campus del Puente del Común, Km 7 Autopista Norte de Bogotá, Chía, Colombia

Teléfono: (571) 861 5555, extensión 23339; fax: (571) 861 5555, extensión 2626

gerzainrodriguez@gmail.com

Recibido: 26/02/15; aceptado: 30/12/15

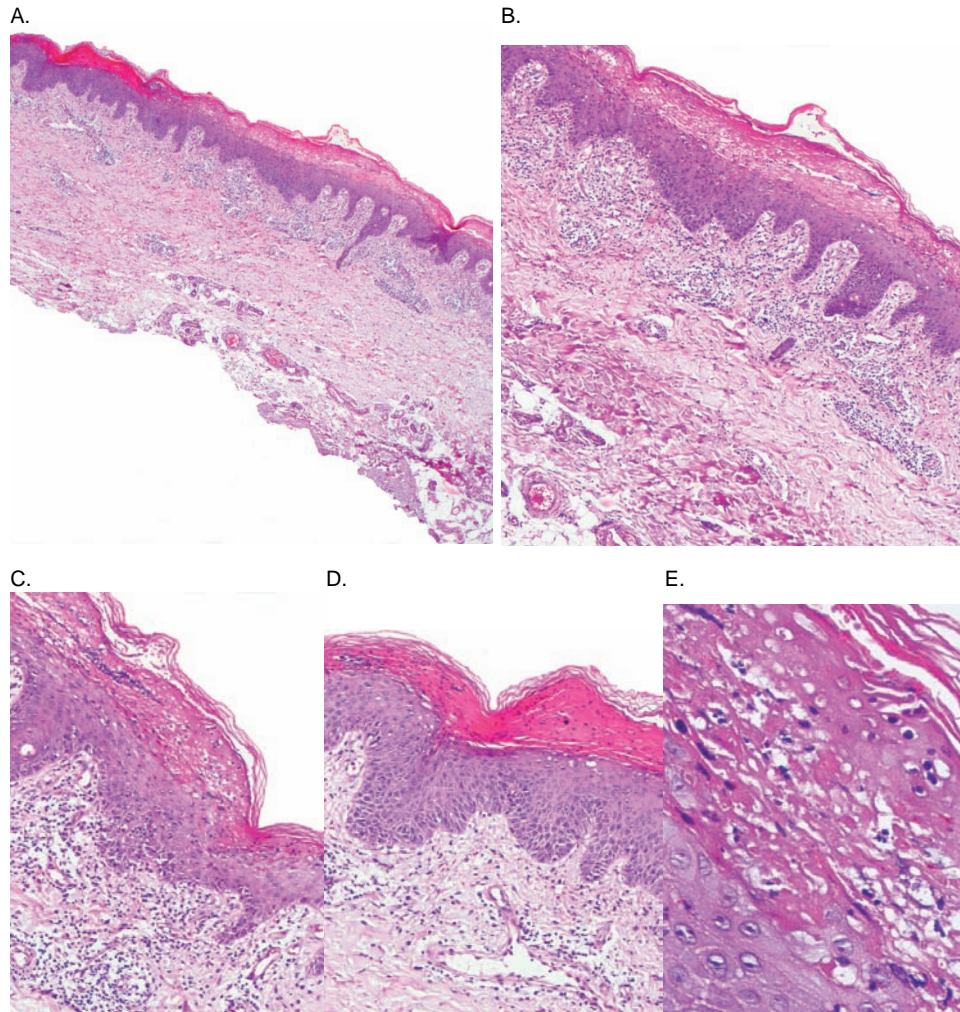


Figura 2. Imágenes de una lesión reciente. **A, B y C.** Epidermis acantósica con cambio vacuolar y necrosis de los queratocitos superficiales, con capa córnea delgada ortoqueratósica. A: hematoxilina y eosina, 2X; B: hematoxilina y eosina, 4X; C: hematoxilina y eosina, 10X. **D y E.** Se observa cambio vacuolar de los queratocitos y necrosis extensa superficial que forma una banda eosinófila con algunos neutrófilos polimorfonucleares. D: hematoxilina y eosina, 10X; E: hematoxilina y eosina, 40X. En la dermis superficial (**A-D**) se aprecian telangiectasias e infiltrado inflamatorio linfocítico perivascular moderado.

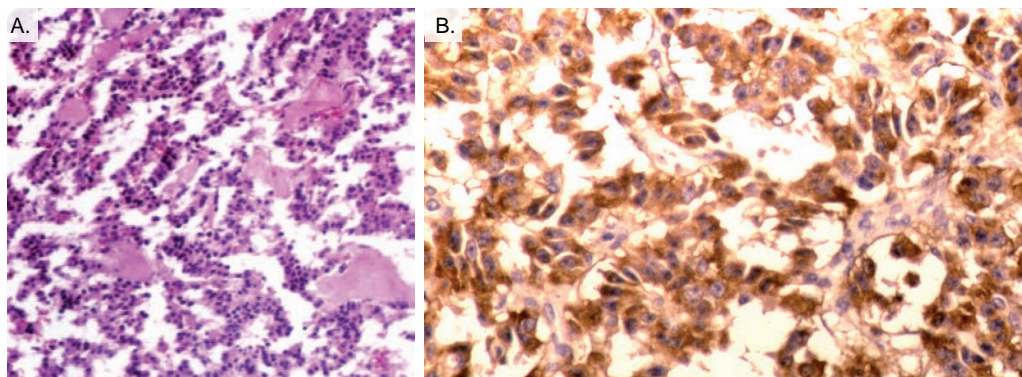


Figura 3. **A.** Se aprecia una neoplasia endocrina de patrón trabecular compuesta por células cúbicas monótonas con núcleo redondo central y sin actividad mitótica. **B.** Células tumorales positivas con la técnica de inmunohistoquímica para glucagón. A: hematoxilina y eosina, 10X. B: inmunohistoquímica, 20X

glúteos, periné, abdomen inferior), la región perioral y las extremidades inferiores, como ocurrió en la paciente cuyo caso se presenta. El compromiso mucoso se manifiesta como estomatitis, glositis y queilitis angular (2,3,5,6,9,10).

El hallazgo histopatológico más frecuente del eritema necrolítico migratorio es la hiperqueratosis con paraqueratosis difusa (71 %), seguido de espongirosis y edema de los queratocitos superficiales malpighianos y granulosa (65 y 53 %, respectivamente) (3). Los cambios tempranos que se observan son infiltrado linfocítico perivascular leve, capa córnea delgada y ortoqueratósica, células epidérmicas edematosas con citoplasma vacuolado claro y necrosis de la epidermis superficial que genera una banda delgada eosinófila; la espongirosis y la muerte celular pueden producir una hendidura por debajo del estrato córneo o dentro del tercio superior de la epidermis (3,9,11). La infección concomitante por *Candida albicans* o *Staphylococcus aureus* es frecuente y genera infiltrado de neutrófilos polimorfonucleares (3,12); con el tiempo se incrementa el infiltrado linfocítico perivascular y la dermis papilar se torna edematosa (3,9). El proceso inflamatorio activo aparece en ciclos de siete a catorce días (9), y en la fase crónica se aprecia dermatitis psoriasiforme con paraqueratosis y ausencia de la capa granular (2).

Debe hacerse el diagnóstico diferencial con otras dermatosis por deficiencia, particularmente con la pelagra (bajos niveles de niacina), el déficit de cinc y el síndrome de Harnup (13). El déficit de cinc, que semeja la acrodermatitis enteropática, presenta hallazgos histopatológicos similares al eritema necrolítico migratorio, como vacuolización de los queratocitos superficiales, necrosis de queratocitos y paraqueratosis (6,8,14).

La similitud clínica e histológica con condiciones como el déficit de vitamina B y las del tipo de la acrodermatitis enteropática, sugiere que las alteraciones cutáneas del eritema necrolítico migratorio se deben a un déficit nutricional causado por el exceso de glucagón (5).

El eritema necrolítico migratorio es la primera manifestación clínica en el 70 % de los pacientes con glucagonoma (2,4,11,14). El primer caso de este síndrome fue descrito por Becker, Kahn y Rotman en 1942, en una mujer de 45 años con erupciones eritematosas y vesiculares diseminadas asociadas con glositis, queilitis, pérdida de peso, anemia normocítica, hiperglucemia e hipoproteïnemia. En la autopsia se encontró una neoplasia

pancreática con metástasis en los ganglios linfáticos adyacentes e invasión de la glándula suprarrenal izquierda, así como trombosis de las venas cava, iliaca y femoral izquierdas (15). Las manifestaciones cutáneas fueron denominadas eritema necrolítico migratorio por Wilkinson en 1973, y Mallison, *et al.*, introdujeron el término "síndrome de glucagonoma" para describir la asociación entre el eritema necrolítico migratorio y el glucagonoma pancreático (14,16).

La incidencia estimada del síndrome es de 1 en 20 millones y se han informado alrededor de 400 casos en la literatura científica (14). Afecta por igual a ambos sexos y se presenta principalmente entre la cuarta y la sexta décadas de la vida (4,17).

Los criterios diagnósticos de un síndrome de glucagonoma comprobado fueron propuestos en 1981 (16) e incluyen los siguientes: 1) masa tumoral detectada por visualización directa o por técnicas radiográficas; 2) tumor compuesto por células que contienen glucagón; 3) niveles séricos elevados de glucagón, y 4) al menos, uno de los siguientes hallazgos: erupción cutánea, intolerancia a la glucosa e hipoaminoacidemia (16). Las manifestaciones del síndrome incluyen, además, pérdida de peso, diarrea, debilidad, trastornos neuropsiquiátricos, diabetes mellitus y cardiomiopatía dilatada (2,6,17). La trombosis venosa profunda y la tromboembolia pulmonar se presentan en 10 a 30 % de los casos y son la causa de muerte en 50 % de estos pacientes (18).

Las alteraciones en los resultados de los exámenes de laboratorio incluyen importante aumento del glucagón sérico, anemia normocítica normocrómica y disminución de la albúmina, los aminoácidos y el colesterol (2,6). Los pacientes con síndrome de glucagonoma presentan valores de glucagón sérico de entre 1.000 y 5.000 pg/ml (16). Nuestra paciente tenía 1.000 pg/ml, con un control normal de laboratorio de 50 a 100 pg/ml. Es posible que las concentraciones séricas de glucagón no se correlacionen con la edad, el sexo, las alteraciones clínicas o metabólicas, o el tamaño o la localización del tumor, ya que el potencial biológico de cada forma de glucagón depende de su peso molecular (14,16).

Las manifestaciones clínicas del síndrome se atribuyen a los efectos metabólicos por exceso de glucagón, es decir, el aumento de la glucogenólisis, la lipólisis y la gluconeogénesis a partir de aminoácidos, y la inhibición de la glucólisis (2,8,19). Se

cree que al disminuirse los niveles de aminoácidos séricos se aumentan los niveles cutáneos de ácido araquidónico, lo que incrementa la producción de mediadores inflamatorios como prostaglandinas y leucotrienos (2,12). La asociación del eritema necrolítico migratorio y la diabetes mellitus son claves útiles para sospechar la presencia de un glucagonoma (20).

En el momento del diagnóstico, 50 a 100 % de los pacientes con glucagonoma tienen metástasis (3,5,6,9,16,19). El hígado es el órgano más afectado (80 % de los casos) (11,17), seguido por los ganglios linfáticos peripancreáticos, los huesos, la glándula suprarrenal, el riñón y el pulmón (3,11,18). La supervivencia media es de 3 a 7 años desde el momento del diagnóstico del tumor (11). El seguimiento de esta paciente no fue suficiente para valorar la supervivencia.

La cirugía es el tratamiento óptimo para los pacientes con síndrome de glucagonoma, (3,7,18), ya que la resección del tumor antes de la aparición de metástasis es curativa. En los pacientes con tumores metastásicos o que no se pueden reseccionar, suelen emplearse análogos de la somatostatina (2,6) y suplementos nutricionales (2). La normalización de los niveles séricos de glucagón con tratamiento quirúrgico o médico, generalmente produce la desaparición de las lesiones cutáneas (8,11). El diagnóstico precoz del eritema necrolítico migratorio puede disminuir las consecuencias catabólicas y el riesgo de metástasis (4,14).

En el síndrome de pseudoglucagonoma se presenta el eritema necrolítico migratorio sin evidencia de tumor pancreático, y está asociado a otras condiciones de base, como pancreatitis, enfermedad celíaca, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome de malabsorción, carcinoma de intestino delgado, hepatitis C, cirrosis, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, carcinoma de células pequeñas de pulmón, síndrome mielodisplásico, consumo de heroína y quimioterapia (2,4,6,9,11,21,22). Las manifestaciones cutáneas del síndrome de glucagonoma y pseudoglucagonoma son indistinguibles (23).

Conclusión

El trabajo conjunto del dermatólogo y el patólogo facilita el diagnóstico del eritema necrolítico migratorio, clave clínica e histopatológica que puede conducir al diagnóstico del glucagonoma pancreático.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan que no existe ningún tipo de conflicto de intereses financiero, académico ni personal, para la publicación de este artículo.

Financiación

Universidad de La Sabana

Referencias

1. **Ortega-Loayza A, Ramos W, Gutiérrez EL, Chávez P, Bobbio L, Galarza C.** Cutaneous manifestations of internal malignancies in a tertiary health care hospital of a developing country. *An Bras Dermatol.* 2010;85:736-42. <http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962010000500026>
2. **DeWitt CA, Buescher LS, Stone SP.** Cutaneous manifestations of internal malignant disease: Cutaneous paneoplastic syndromes. In: Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ, Wolff K, editors. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine.* Eighth edition. New York: McGraw-Hill; 2012. p. 1493-507.
3. **Pujol RM, Wang CY, el-Azhary RA, Su WP, Gibson LE, Schroeter AL.** Necrolytic migratory erythema: Clinicopathologic study of 13 cases. *Int J Dermatol.* 2004; 43:12-18. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-4632.2004.01844.x>
4. **Lobo I, Carvalho A, Amaral C, Machado S, Carvalho R.** Glucagonoma syndrome and necrolytic migratory erythema. *Int J Dermatol.* 2010;49:24-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-4632.2009.04220.x>
5. **Cowen EW, Callen JP.** Skin signs of internal malignancy. In: Callen JP, Jorizzo JL, Bologna JL, Piette WW, Zone JJ, editors. *Dermatological signs of internal disease.* Fourth edition. Hong Kong: Elsevier; 2009. p. 107-16.
6. **Compton NL, Chien AJ.** A rare but revealing sign: Necrolytic migratory erythema. *Am J Med.* 2013; 126:387-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2013.01.012>
7. **Tseng H-C, Liu CT, Ho JC, Lin SH.** Necrolytic migratory erythema and glucagonoma rising from pancreatic head. *Pancreatol.* 2013;13:455-57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pan.2013.03.011>
8. **van Beek AP, de Haas E, van Vloten W, Lips C, Roijers J, Canninga-van Dijk M.** The glucagonoma syndrome and necrolytic migratory erythema: A clinical review. *Eur J Endocrinol.* 2004;151:531-7.
9. **Pearce DJ, Greer KE, Jorizzo JL.** Pancreatic disease. In: Callen JP, Jorizzo JL, Bologna JL, Piette WW, Zone JJ, editors. *Dermatological signs of internal disease.* Fourth edition. Hong Kong: Elsevier; 2009. p. 243-6.
10. **Grewal P, Salopek T.** Is necrolytic migratory erythema due to glucagonoma a misnomer? A more apt name might be mucosal and intertriginous erosive dermatitis. *J Cutan Med Surg.* 2012;16:76-82.
11. **Ormaechea-Pérez N, Arregui-Murua MA, López-Pestaña A, López-Núñez M, Jaka-Moreno A, Tuneu-Valls A.** Eritema necrolítico migratorio como marcador de síndrome del glucagonoma. *Med Cutan Iber Lat Am.* 2013;41:70-3.
12. **Da Silva JA, De Carvalho K, De Souza AC, Rodrigues IC, Ferreira A, De Oliveira SM, et al.** Paraneoplastic cutaneous manifestations: Concepts and updates. *An Bras Dermatol.* 2013;88:9-22. <http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962013000100001>

13. **Rezvani I.** Defects in metabolism of amino acids. In: Kliegman R, Stanton B, Geme J, Schor N, Behrman R, editors. Nelson textbook of pediatrics. Nineteenth edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011. p. 429.
14. **Arellano MI, Alcántara VD, Báez JA, Mercadillo P, Vargas B.** Eritema necrolítico migratorio asociado con síndrome pseudoglucagonoma. *Dermatol Rev Mex.* 2013;57:49-56.
15. **Becker W, Kahn D, Rothman S.** Cutaneous manifestations of internal malignant tumors. *Arch Dermatol Syphilol.* 1942;45:1069-80.
16. **Stacpoole PW.** The glucagonoma syndrome: Clinical features, diagnosis, and treatment. *Endocr Rev.* 1981;2:347-61. <http://dx.doi.org/10.1210/edrv-2-3-347>
17. **Sahoo MK, Gupta S, Singh I, Pahwa S, Durgapal P, Bal CS.** Necrolytic migratory erythema associated with glucagonoma syndrome diagnosed by ⁶⁸Ga-DOTANOC PET-CT. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2014;10:190-3. <http://dx.doi.org/10.1111/ajco.12048>
18. **Granero P, Miyar A, Granero J, Álvarez P, Álvarez J, Fernández J, et al.** Glucagonoma syndrome: A case report. *J Med Case Rep.* 2011;5:402-6. <http://dx.doi.org/10.1186/1752-1947-5-402>
19. **Qadan M, Visser B, Kim J, Pai R, Triadafilopoulos G.** Abdominal mass, anemia, diabetes mellitus, and necrolytic migratory erythema. *Dig Dis Sci.* 2012;57:1465-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s10620-011-1967-5>
20. **Halvorson S, Gilbert E, Hopkins S, Liu H, López C, Chu M, et al.** Putting the pieces together: Necrolytic migratory erythema and the glucagonoma syndrome. *J Gen Intern Med.* 2013;28:1525-9. <http://dx.doi.org/10.1007/s11606-013-2490-5>
21. **Chiyomaru K, Takai T, Ohashi A, Nishigori C.** Necrolytic migratory erythema with cholangiocarcinoma: Pseudoglucagonoma syndrome. *Eur J Dermatol.* 2010;20:238-9. <http://dx.doi.org/10.1684/ejd.2010.0878>
22. **Gronau M, Jäger D, Enk AH, Hassel J.** Necrolytic migratory erythema in a patient with neuroendocrine carcinoma. *Intern Med.* 2012; 52:151-2. <http://dx.doi.org/10.2169/internalmedicine.52.8499>
23. **Langan EA, Mansoor W, Brabant G, Young HS, Jamieson LA.** A painful blistering rash on the lower legs and perineum. *Clin Exp Dermatol.* 2012;38:209-11. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2230.2012.04355.x>

PRESENTACIÓN DE CASO

Síndrome de Li-Fraumeni

Carlos Andrés Ossa^{1,2}, Gustavo Molina¹, Alicia María Cock-Rada^{1,2,3}

¹ Departamento de Cirugía Oncológica de Mama y Mastología, Instituto de Cancerología Las Américas, Medellín, Colombia

² Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

³ Unidad de Investigación Científica, Instituto de Cancerología Las Américas, Medellín, Colombia

El síndrome de Li-Fraumeni se caracteriza por la aparición de tumores en múltiples órganos, generalmente a temprana edad. Esta condición hereditaria es causada por mutaciones germinales en el gen *TP53*, que codifica el gen supresor tumoral *p53*.

Se presenta el caso de una paciente de 31 años con diagnóstico clínico y molecular de síndrome de Li-Fraumeni, que presentó dos tumores sincrónicos a los 31 años: un leiomiোসarcoma de antebrazo y un tumor filoides de mama.

Tenía el antecedente de un hijo con diagnóstico de carcinoma cortical suprarrenal a los tres años, que falleció a los cinco años debido a la enfermedad. Además, su abuela y su bisabuela maternas habían fallecido de cáncer gástrico a los 56 y 60 años, respectivamente, y la madre y una hermana de su abuelo materno presentaron cáncer de mama pasados los 60 y los 40 años de edad, respectivamente.

Después de una asesoría genética, se ordenó hacer la secuenciación completa y el análisis de duplicaciones y deleciones en el gen *TP53*. El estudio molecular en una muestra de ADN proveniente de linfocitos de sangre periférica reveló la mutación germinal c.527G>T (p.Cys176Phe) en el exón 5 del gen, mutación deletérea descrita anteriormente en tejidos tumorales. Hasta donde se sabe, este es el primer caso que se publica en Colombia de síndrome de Li-Fraumeni con diagnóstico molecular confirmado.

El diagnóstico y el manejo del síndrome de Li-Fraumeni deben estar a cargo de un equipo multidisciplinario, y debe contarse con asesoría genética para el paciente y sus familiares.

Palabras clave: síndrome de Li-Fraumeni, gen *TP53*, asesoramiento genético, síndromes neoplásicos hereditarios, tumor filoides, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2793>

Li-Fraumeni syndrome

The Li-Fraumeni syndrome is characterized clinically by the appearance of tumors in multiple organs generally at an early age. This hereditary condition is caused by germinal mutations in the *TP53* gene, which codifies for the tumoural suppressor gene *p53*.

We present the case of a patient aged 31 with clinical and molecular diagnosis of Li-Fraumeni syndrome who presented two synchronous tumors: a leiomyosarcoma on the forearm and a phyllodes breast tumour.

She had a family history of cancer, including a son diagnosed with a cortical adrenal carcinoma when he was three years old, who died at five from the disease. Furthermore, her maternal grandmother and great-grandmother died of stomach cancer at 56 and 60 years old, respectively, while her other great-grandmother and a great aunt presented with breast cancer at the ages of 60 and 40, respectively. After genetic counseling, complete sequencing and analysis of duplications and deletions in the *TP53* gene were ordered prior to diagnosis. The molecular analysis of a DNA sample taken from peripheral blood lymphocytes revealed the germinal mutation c.527G>T (p.Cys176Phe) on exon 5 of the *TP53* gene, a deleterious mutation described previously in tumoural tissues. To our knowledge, this is the first published case in Colombia of Li-Fraumeni syndrome with confirmed molecular diagnosis.

The diagnosis and management of Li-Fraumeni syndrome should be performed by a multidisciplinary team, and genetic counselling should be offered to patients and their relatives.

Key words: Li-Fraumeni syndrome; genes, *TP53*; genetic counseling; neoplastic syndromes, hereditary; phyllodes tumor, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2793>

Contribución de los autores:

Carlos Andrés Ossa: médico tratante, coordinación del estudio clínico y paraclínico del paciente

Gustavo Molina: médico tratante

Alicia María Cock-Rada: valoración oncogenética e interpretación de los resultados moleculares

Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito y en la búsqueda de bibliografía.

El síndrome de Li-Fraumeni, también conocido como síndrome SBLA (*Sarcoma, Breast, Leukemia, and Adrenal gland*, SBLA), fue descrito en 1969 por Li y Fraumeni (1). Se caracteriza por la aparición de tumores en múltiples órganos, generalmente a edad temprana, entre los cuales los sarcomas de tejidos blandos, los osteosarcomas, el cáncer de mama en mujeres premenopáusicas, los tumores cerebrales, las leucemias agudas y el cáncer de la corteza suprarrenal, son los más frecuentes (2).

Esta condición genética infrecuente se hereda con un patrón autosómico dominante y presenta una 'penetrancia' de ~70 % en los hombres y de casi 100 % en las mujeres. El 70 % de los pacientes con diagnóstico clínico de síndrome de Li-Fraumeni tiene una mutación germinal en el gen *TP53* y quienes cumplen con los criterios de Chompret tienen 20 % de probabilidades de presentar una mutación identificable en dicho gen (3) (cuadro 1).

La enfermedad se presenta en dos formas clínicas: el síndrome de Li-Fraumeni clásico y el síndrome de tipo Li-Fraumeni (cuadro 1), cuyos criterios clínicos de clasificación difieren, ya que en el síndrome de tipo Li-Fraumeni la prevalencia de mutaciones germinales en el gen *TP53* es menor (3,4).

A continuación se presenta el primer caso clínico de síndrome de Li-Fraumeni con diagnóstico molecular confirmado que se publica en Colombia, caso que se presentó en el Instituto de Cancerología de la Clínica Las Américas.

Caso clínico

Se trata de una paciente de 31 años de edad, natural de Ebéjico, Antioquia, y residente en Medellín, que fue remitida al Servicio de Ortopedia Oncológica del Instituto de Cancerología de la Clínica Las Américas por presentar una masa en el codo derecho, de seis meses de evolución. En el estudio histopatológico se reportó un tumor del estroma fusocelular. El resultado del estudio inmunohistoquímico fue positivo para actinas del músculo liso y H-caldesmon en las células neoplásicas, así como para desmina y Ki-67 en 20 % de estas, en tanto que fue negativo para CD34, proteína S100, CD31, calretinina y CD57.

Correspondencia:

Carlos Andrés Ossa, Departamento de Cirugía Oncológica de Mama, Instituto de Cancerología Clínica Las Américas, Carrera 70 N° 1-135, torre 5, Medellín, Colombia
Teléfono: (574) 340 9393; fax: (574) 342 3307
info@drandresossa.com

Recibido: 09/04/15; aceptado: 07/01/16

Diagnóstico de leiomioma subcutáneo

En el examen físico se detectó, asimismo, una lesión de mama, por lo que la paciente fue remitida al Servicio de Cirugía Oncológica de Mama, donde se confirmó la presencia de una lesión sólida de 5 cm en el cuadrante superior externo de la mama derecha.

Se practicaron una mamografía y una ecografía mamaria, las cuales evidenciaron una masa de categoría 4 según el *Breast Imaging Reporting and Data System* (BI-RADS). Posteriormente, en la biopsia con aguja gruesa, se reportó una lesión de tipo sarcomatoso que indicaba un tumor filoides de alto grado frente a un diagnóstico diferencial de leiomioma. Dado el antecedente de un tumor en el antebrazo derecho detectado dos meses antes, cuya biopsia por escisión fue de leiomioma primario del antebrazo, se planteó como primera opción la metástasis en mama de un leiomioma y, como segunda posibilidad, la presencia sincrónica de un segundo tumor primario.

Antecedentes familiares

La paciente tuvo dos hijos: uno de ellos fallecido a la edad de cinco años debido a un carcinoma cortical suprarrenal diagnosticado a los tres años, y una hija de 13 años de edad sin antecedentes de cáncer. Por línea materna, su abuela y su bisabuela presentaron cáncer gástrico a los 56 y 60 años de edad, respectivamente. La madre de su abuelo materno presentó cáncer de mama después de los 60 años, al igual que una hermana de ese abuelo, después de los 40 años de edad (figura 1).

Se programó una cuadrantectomía central como parte de una mastoplastia oncológica y ampliación de márgenes en el antebrazo derecho (la cirugía previa se había llevado a cabo en otro hospital). En el estudio de histopatología quirúrgica se reportó un tumor filoides maligno de 7 cm, con bordes infiltrantes, importante aumento de células del estroma, conteo de 21 mitosis por campo de mayor aumento, crecimiento anormal del estroma y presencia de elementos heterólogos del tipo del liposarcoma. Los márgenes de resección eran extensos debido al tumor y los márgenes quirúrgicos del tumor en el antebrazo fueron negativos.

El caso se presentó en la Junta Médico-Quirúrgica del Instituto de Cancerología de la Clínica Las Américas, en la cual se decidió hacer una mastectomía simple sin reconstrucción, seguida de radioterapia. No se consideró necesaria la radioterapia en el antebrazo ni la quimioterapia

Cuadro 1. Criterios diagnósticos del síndrome de Li-Fraumeni y de la prueba genética

<p>Criterios clásicos</p> <p>Se deben cumplir todos los siguientes criterios:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Diagnóstico de sarcoma antes de los 45 años - Pariente en primer grado con diagnóstico de cáncer antes de los 45 años - Pariente en primer o segundo grado con cualquier cáncer y edad de aparición menor de 45 años o sarcoma a cualquier edad
<p>Criterios de Birch</p> <p>Caso comprobado de cáncer en la infancia, o sarcoma, tumor cerebral o carcinoma corticosuprarrenal que aparece en persona menor de 45 años y pariente en primer o segundo grado con un cáncer asociado a síndrome de Li-Fraumeni (sarcoma, cáncer de mama, tumor cerebral, carcinoma corticosuprarrenal o leucemia) detectado en cualquier edad, y pariente en primer o segundo grado con cualquier cáncer detectado antes de los 60 años de edad</p>
<p>Criterios de Eales</p> <p>Dos parientes en primer o segundo grado con tumores relacionados con el síndrome de Li-Fraumeni (sarcoma, cáncer de mama, tumor cerebral, carcinoma corticosuprarrenal, leucemia o cáncer pulmonar broncoalveolar) a cualquier edad</p>
<p>Criterios de Chompret, 2009</p> <ul style="list-style-type: none"> • Caso comprobado de tumor relacionado con el síndrome de Li-Fraumeni (sarcoma, cáncer de mama, tumor cerebral, carcinoma corticosuprarrenal, leucemia o cáncer pulmonar broncoalveolar) en persona menor de 46 años y, al menos, un pariente en primer o segundo grado con un tumor relacionado con el síndrome de Li-Fraumeni (excepto cáncer de mama si la persona del caso comprobado lo tiene) detectado antes de los 56 años de edad, o con múltiples cánceres primarios a cualquier edad. • O un caso comprobado con múltiples tumores (excepto cáncer de mama múltiple), dos de los cuales estén relacionados con el síndrome de Li-Fraumeni y el primero haya aparecido antes de los 46 años • Caso con diagnóstico de tumor corticosuprarrenal o un carcinoma de plexo coroides, independientemente de la historia familiar

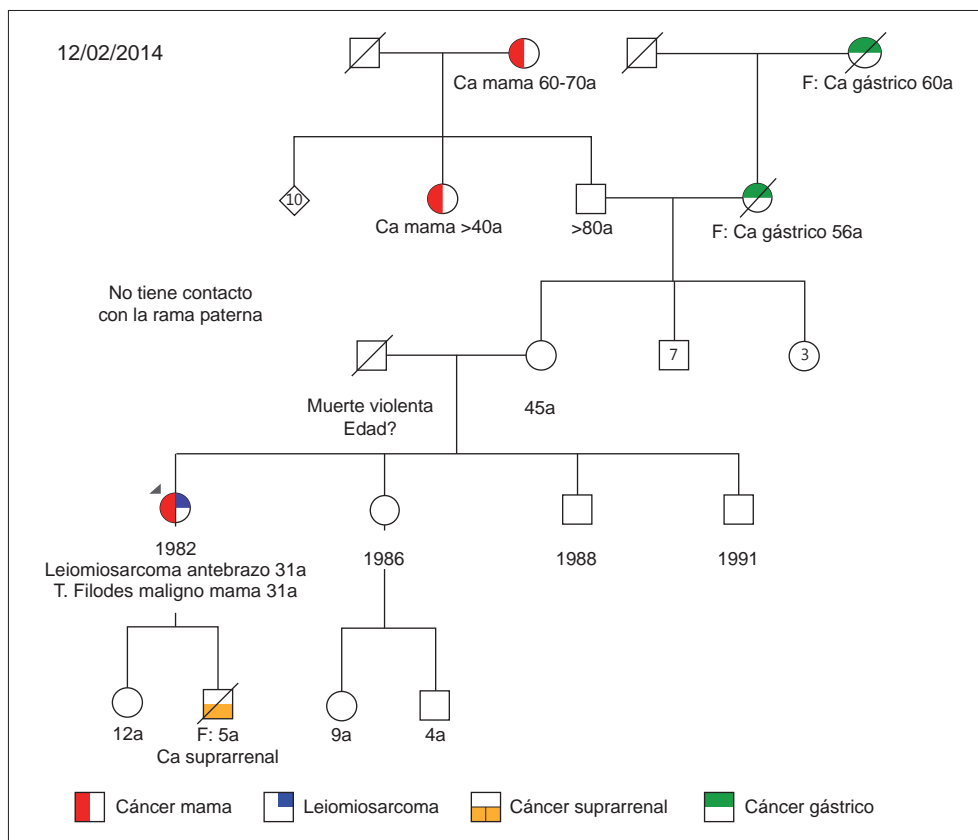


Figura 1. Genealogía del grupo familiar

sistémica, dada la poca información que se encontró en la literatura científica sobre dicho procedimiento.

Ante la presencia sincrónica de dos tumores de origen sarcomatoso y el antecedente de un hijo con carcinoma cortical suprarrenal a una edad temprana, la paciente se envió a valoración al Servicio de Oncogenética para descartar o confirmar la presencia de un síndrome de Li-Fraumeni. Previa asesoría genética, se ordenó la secuenciación completa y el análisis de duplicaciones y deleciones en el gen *TP53* de la paciente.

El estudio molecular se hizo en un laboratorio comercial con una muestra de ADN de la paciente, extraída de linfocitos de sangre periférica. Se amplificaron los exones codificantes del gen *TP53* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se visualizaron los fragmentos en un gel de agarosa al 3 % y se purificaron los productos amplificados para la secuenciación directa con el método de Sanger. Las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia de referencia de la plataforma Ensembl ENSG00000141510. El análisis de las variantes encontradas se hizo con herramientas bioinformáticas (PolyPhen-2, SIFT, Align GVDG).

Se detectó la mutación deletérea c.527G>T (p.Cys176Phe) en el exón 5 del gen *TP53*. Este cambio de guanina por timina en el codón 527 genera un cambio del aminoácido cisteína por fenilalanina. Dicha mutación, ya descrita con anterioridad en tejido somático en diversos tipos de tumores (base de datos www.iarc.fr/p53) (5), se confirmó como una mutación germinal deletérea en la paciente.

El caso se discutió nuevamente en la Junta Médico-Quirúrgica, la cual hizo las siguientes recomendaciones basadas en las guías de la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) (6): mastectomía contralateral o seguimiento con mamografía y resonancia magnética anual; colonoscopia cada dos a cinco años; evaluación clínica anual con evaluación neurológica y dermatológica; estudio de la mutación puntual de los familiares en primer grado de consanguinidad, previa asesoría genética, para establecer estrategias de tamización o prevención del cáncer en portadores de la mutación, y hacer el estudio genético de la hija de la paciente.

Discusión

El gen *TP53* es un gen supresor tumoral que se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13). Se le conoce como el “guardián del

genoma” porque se activa como reacción a los daños del ADN y ante señales de estrés celular (por ejemplo, la radiación, la activación de oncogenes y los acortamientos teloméricos, entre otras) para mantener la estabilidad del genoma. El gen *TP53* codifica la proteína p53, que induce la transcripción de genes involucrados en la reparación del material genético, el control del ciclo celular y la apoptosis. Es común encontrar mutaciones en dicho gen aproximadamente en 50 % de los cánceres (7).

Se han descrito más de 250 mutaciones germinales en este gen, las cuales son causantes del síndrome de Li-Fraumeni. En los pacientes con sospecha del síndrome solía estudiarse únicamente la región que codifica el dominio de unión al ADN (exones 5 a 8), por ser un “punto caliente” para mutaciones deletéreas (5,8); no obstante, actualmente se recomienda estudiar toda la región codificante, así como las deleciones y duplicaciones, puesto que estas se encuentran en 1 a 5 % de los casos de síndrome de Li-Fraumeni.

Con el advenimiento de las técnicas de secuenciación de nueva generación es común encontrar variantes no reportadas en la literatura científica o en las bases de datos, o alteraciones de significado clínico desconocido, lo cual representa un reto para el manejo clínico de los pacientes y sus familiares, puesto que los riesgos de desarrollar cáncer son inciertos.

El síndrome de Li-Fraumeni se caracteriza por la gran heterogeneidad de manifestaciones y el amplio intervalo de edad en el cual se presentan los casos, lo cual hace difícil establecer guías únicas de detección temprana, cribado y tratamiento. Sin embargo, el conocimiento epidemiológico que se ha logrado sobre esta enfermedad en los últimos años permite determinar la edad y los sitios más frecuentes de presentación de algunos tumores, entre los cuales los más comunes en el grupo de 0 a 10 años de edad son los sarcomas de tejidos blandos, los tumores cerebrales (9) y el carcinoma cortical suprarrenal; en el grupo de 11 a 20 años, los tumores óseos, y en mayores de 20 años, el cáncer de mama y los tumores cerebrales (10,11).

Síndrome de Li-Fraumeni y cáncer de seno

Las mujeres con síndrome de Li-Fraumeni tienen un riesgo muy elevado de desarrollar cáncer de mama antes de la menopausia. La mediana de edad para su aparición es de 33 años (11). En una serie publicada por Birch, *et al.*, en 1994, 32 % de las mujeres menores de 30 años con cáncer de

Cuadro 2. Recomendaciones internacionales de cribado en portadores de mutaciones en el gen *TP53*

Estados Unidos NCCN (6)	<ul style="list-style-type: none"> • Examen clínico de mama y mamografía anuales (con resonancia magnética o sin ella) a partir de los 25 años de edad • Discusión de la mastectomía reductora de riesgo • Examen físico anual • Colonoscopia cada 2 a 5 años • Otras medidas de vigilancia basadas en la historia familiar de cáncer
Australia Hottinger (10)	<ul style="list-style-type: none"> • Resonancia magnética de la mama a partir de los 20 o 25 años; contemplar la mamografía con ecografía o sin ella según si ha habido acceso a la resonancia magnética • Contemplar la ecografía de mama en mujeres embarazadas o lactantes • Contemplar la mastectomía reductora del riesgo seguida de autoexamen mamario • Contemplar los medicamentos para reducción del riesgo (moduladores selectivos del receptor de estrógenos) • Colonoscopia cada 5 años si no hay historia familiar; si hay historia de cáncer de colon, iniciar vigilancia cada 2 a 5 años a partir de los 25 años o 10 años antes del primer caso de cáncer de colon observado en la familia • Evitar la exposición a la radiación para el cribado o para propósitos terapéuticos si es posible
Francia (22)	<ul style="list-style-type: none"> • Examen físico anual • Resonancia magnética de la mama anual a partir de los 20 años • Evitar la radioterapia en este grupo de pacientes • Se recomienda la discusión del diagnóstico prenatal

mama presentaba una mutación en el gen *TP53*, comparadas con 0 % de las mujeres mayores de 50 años en la misma cohorte del estudio (12).

Las mujeres con cáncer de mama de aparición temprana (menores de 30 años) que no presentan una mutación en los genes *BRCA1* o *BRCA2* tienen una probabilidad de 4 a 8 % de ser portadoras de una mutación en el gen *TP53* (11-15).

Una característica interesante del cáncer de mama asociado a mutaciones en el gen *TP53* es que su fenotipo es positivo para los receptores hormonales y para el gen *Her2* (16-18). En el estudio de Mascari, *et al.*, 84 % de los tumores de mama asociados al síndrome de Li-Fraumeni fueron positivos para los receptores hormonales de estrógenos y progesterona, y 63 % de los tumores invasivos lo fueron para el gen *Her2/neu* (16). En otro estudio presentado en el 2012 por Melhem-Bertrand, *et al.*, en el que se estudiaron mujeres con estudio genético del gen *TP53* ante la sospecha del síndrome de Li-Fraumeni, 67 % de los casos de cáncer de mama con mutaciones en dicho gen fueron positivos también para el gen *Her2*, comparado con 25 % de las pacientes de control con cáncer de mama cuyo resultado fue negativo para las mutaciones en el gen *TP53* (18).

Los tumores filoides malignos de mama pueden estar asociados al síndrome de Li-Fraumeni, como en el caso de esta paciente; sin embargo, estos no son tan frecuentes como los tumores de

estirpe epitelial (18-20). Hasta el momento, son pocos los casos reportados de cáncer de mama masculino asociados al síndrome de Li-Fraumeni. La información y las recomendaciones para el tratamiento de estos pacientes se basan en series de casos, por lo que es necesario hacer estudios clínicos aleatorios que evalúen estrategias de cribado en portadores de mutaciones en la línea germinal del gen *Tp53*, dada la baja penetrancia de este polimorfismo (21).

Conclusión

El síndrome de Li-Fraumeni es una enfermedad hereditaria que se caracteriza por la aparición de una gran variedad de tumores a edad temprana. Aunque es una condición poco frecuente, es necesario detectar a estos pacientes para hacer su seguimiento y tratarlos adecuadamente. Además, se debe brindar asesoría genética al paciente y a sus familias, puesto que los familiares en primer grado de consanguinidad de un individuo portador de una mutación germinal en el gen *TP53* tienen una probabilidad de 50 % de ser portadores de la misma mutación.

Hasta donde se sabe, este es el primer caso publicado en Colombia de síndrome de Li-Fraumeni con diagnóstico molecular confirmado. El diagnóstico de esta condición será cada vez más frecuente debido al uso de los estudios y las pruebas de detección en varios genes. Por lo tanto, es necesario tener un conocimiento más

claro sobre las estrategias de diagnóstico, y las opciones de vigilancia y manejo del riesgo de cáncer (cuadro 2).

La población del país está poco caracterizada desde el punto de vista genético y no se cuenta con bases de datos genéticos. Por ello, la interpretación de las variantes no reportadas o de significado clínico desconocido debe hacerse con precaución. La sospecha clínica y el diagnóstico temprano de este síndrome permitirían intervenir en el pronóstico oncológico de este grupo de pacientes y de su núcleo familiar.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos no tener ningún tipo de conflicto de intereses.

Financiación

El presente trabajo se hizo con recursos del Departamento de Investigación en Cáncer del Instituto de Cancerología Clínica Las Américas de Medellín.

Referencias

1. **Li FP, Fraumeni JF.** Soft-tissue sarcomas, breast cancer and other neoplasms: A familial syndrome? *Ann Int Med.* 1969;71:747-52. <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-71-4-747>
2. **Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, et al.** A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res.* 1988;48:5358-62.
3. **Chompret A, Brugières L, Ronsin M, Gardes M, Dessarps-Freichey F, Abel A, et al.** P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals. *Br J Cancer.* 2000;82:1932-7. <http://dx.doi.org/10.1054/bjoc.2000.1167>
4. **Tinat J, Bougeard G, Baert-Desurmont S, Vasseur S, Martin C, Bouvignies E, et al.** 2009 version of the Chompret criteria for Li Fraumeni syndrome. *J Clin Oncol.* 2009;27:e108-9. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2009.22.7967>
5. **Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, et al.** Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: Lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat.* 2007;28:622-9. <http://dx.doi.org/10.1002/humu.20495>
6. **Daly MB, Pilarski R, Axilbund JE, Buys SS, Crawford B, Friedman S, et al.** Genetic/familial high-risk assessment: Breast and ovarian, version 1.2014. *J Natl Compr Canc Netw.* 2014;12:1326-38.
7. **Malkin D.** Li-Fraumeni syndrome. *Genes Cancer.* 2011;2:475-84. <http://dx.doi.org/10.1177/1947601911413466>
8. **Leroy B, Fournier JL, Ishioka C, Monti P, Inga A, Fronza G, et al.** The TP53 website: An integrative resource centre for the TP53 mutation database and TP53 mutant analysis. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:D962-9. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1033>
9. **Hottinger AF, Khakoo Y.** Neurooncology of familial cancer syndromes. *J Child Neurol.* 2009;24:1526-35. <http://dx.doi.org/10.1177/0883073809337539>
10. **MD Junction.** Clinical aspects of LFS - Criteria and screening propositions from around the world — Conference summa (2010). Fecha de consulta: 4 de febrero de 2015. Disponible en: <http://www.mdjunction.com/li-fraumeni-syndrome/articles/clinical-aspects-of-lfs--criteria-and-screening-propositions-from-around-the-world--conference-summa>.
11. **Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, Ohgaki H, Kleihues P, Hainaut P, et al.** Li-Fraumeni and related syndromes: Correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res.* 2003;63:6643-50.
12. **Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, Prosser J, Condie A, Kelsey AM, et al.** Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res.* 1994;54:1298-304.
13. **González KD, Noltner KA, Buzin CH, Gu D, Wen-Fong CY, Nguyen VQ, et al.** Beyond Li-Fraumeni syndrome: Clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *J Clin Oncol.* 2009;27:1250-6. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2008.16.6959>
14. **Mouchawar J, Korch C, Byers T, Pitts TM, Li E, McCredie MR, et al.** Population-based estimate of the contribution of TP53 mutations to subgroups of early-onset breast cancer: Australian Breast Cancer Family Study. *Cancer Res.* 2010;70:4795-800. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0851>
15. **McCuaig JM, Armel SR, Novokmet A, Ginsburg OM, Demsky R, Narod SA, et al.** Routine TP53 testing for breast cancer under age 30: Ready for prime time? *Fam Cancer.* 2012;11:607-13. <http://dx.doi.org/10.1007/s10689-012-9557-z>
16. **Masciari S, Dillon DA, Rath M, Robson M, Weitzel JN, Balmana J, et al.** Breast cancer phenotype in women with TP53 germline mutations: A Li-Fraumeni syndrome consortium effort. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;133:1125-30. <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-012-1993-9>
17. **Wilson JR, Bateman AC, Hanson H, An Q, Evans G, Rahman N, et al.** A novel HER2-positive breast cancer phenotype arising from TP53 germline mutations. *J Med Genet.* 2010;47:771-4. <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2010.078113>
18. **Melhem-Bertrandt A, Bojadziewa J, Ready KJ, Obeid E, Liu DD, Gutiérrez-Barrera AM, et al.** Early onset HER2-positive breast cancer is associated with germline TP53 mutations. *Cancer.* 2012;118:908-13. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.26377>
19. **Birch JM, Alston RD, McNally RJ, Evans DG, Kelsey AM, Harris M, et al.** Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. *Oncogene.* 2001;20:4621-8. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1204621>
20. **Ruijs MW, Verhoef S, Rookus MA, Pruntel R, van der Hout AH, Hagervorst EB, et al.** TP53 germline mutation testing in 180 families suspected of Li-Fraumeni syndrome: Mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes. *J Med Genet.* 2010;47:421-8. <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2009.073429>
21. **McBride KA, Ballinger ML, Killick E, Kirk J, Tattersall MH, Eeles RA, et al.** Li-Fraumeni syndrome: Cancer risk assessment and clinical management. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014;11:260-71. <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.41>

ENSAYO

Multimorbilidad: bases conceptuales, modelos epidemiológicos y retos de su medición

Julián A. Fernández-Niño¹, Eduardo Bustos-Vázquez²

¹ Centro de Información para Decisiones en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, México

² Escuela de Salud Pública de México, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, México

El incremento continuo de pacientes con perfiles clínicos complejos debidos a enfermedades crónicas ha favorecido el uso cada vez más extendido del término multimorbilidad. Es indispensable disponer de una medición apropiada de esta condición, dado que representa un reto para el manejo clínico de los pacientes, los sistemas de salud y la investigación epidemiológica.

En este ensayo se revisan las propuestas conceptuales subyacentes a la medición de la multimorbilidad y se discuten los retos metodológicos involucrados, tomando como referencia las definiciones clásicas de comorbilidad, sus diferencias con el concepto de multimorbilidad y su papel en los estudios epidemiológicos, así como los distintos modelos conceptuales de los que se derivan las definiciones operativas y las estrategias de medición de dicha variable.

Se pudo determinar que hay una brecha importante entre el desarrollo del concepto de multimorbilidad y las definiciones operativas, a pesar del significativo avance teórico que ha permitido trascender la concepción clásica de comorbilidad para llegar al concepto actual de multimorbilidad. Sin embargo, las estrategias de medición no se han desarrollado al mismo ritmo del concepto, por lo que se requieren nuevas propuestas metodológicas que permitan obtener información sobre su verdadero impacto en la salud de las personas y sus implicaciones para la salud pública.

Palabras clave: comorbilidad, enfermedad crónica, modelos teóricos, estudios epidemiológicos, sesgo (epidemiología), envejecimiento.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2710>

Multimorbidity: conceptual basis, epidemiological models and measurement challenges

The growing number of patients with complex clinical profiles related to chronic diseases has contributed to the increasingly widespread use of the term 'multimorbidity'. A suitable measurement of this condition is essential to epidemiological studies considering that it represents a challenge for the clinical management of patients as well as for health systems and epidemiological investigations.

In this context, the present essay reviews the conceptual proposals behind the measurement of multimorbidity including the epidemiological and methodological challenges it involves. We discuss classical definitions of comorbidity, how they differ from the concept of multimorbidity, and their roles in epidemiological studies. The various conceptual models that contribute to the operational definitions and strategies to measure this variable are also presented.

The discussion enabled us to identify a significant gap between the modern conceptual development of multimorbidity and the operational definitions. This gap exists despite the theoretical developments that have occurred in the classical concept of comorbidity to arrive to the modern and multidimensional conception of multimorbidity. Measurement strategies, however, have not kept pace with this advance. Therefore, new methodological proposals need to be developed in order to obtain information regarding the actual impact on individuals' health and its implications for public health.

Key words: Comorbidity; chronic disease; models, theoretical; epidemiologic studies; bias (epidemiology); aging.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2710>

En 1970, Feinstein llamó la atención sobre la importancia de la precisa clasificación taxonómica de lo que entonces llamó comorbilidad, con miras

a evaluar el efecto y las interrelaciones clínicas (1) y epidemiológicas (2) de la coexistencia de múltiples enfermedades en un mismo individuo. El

Contribución de los autores:

Ambos autores contribuyeron a la concepción y el diseño del ensayo, el análisis y la interpretación de las fuentes originales, así como a la redacción y la aprobación de la versión final.

constante incremento del número de pacientes con perfiles clínicos complejos debido a la presencia de enfermedades crónicas como consecuencia de la transición epidemiológica, representa un gran reto para su manejo clínico, así como para los sistemas de salud y para la investigación epidemiológica (3). En la actualidad, los pacientes con múltiples enfermedades crónicas son la regla más que la excepción, incluso en las unidades de cuidado primario (4).

En el afán de entender mejor este fenómeno, se propuso el término de multimorbilidad, el cual contendría los conceptos clásico y moderno de comorbilidad (5). La propuesta teórica detrás del término responde a la necesidad de concebir los perfiles de 'morbilidad' (*morbidity*) complejos como la relación entre diversos elementos clínicos y no clínicos, y constituye un concepto de múltiples dimensiones que más recientemente ha evolucionado hasta incorporar la funcionalidad y la esfera psicosocial (6). En este contexto, y reconociendo los diversos efectos de la multimorbilidad en la salud (7), y su potencial como elemento modificador de los resultados de los tratamientos en los ensayos clínicos (8), se planteó la urgencia de disponer de una medición apropiada de la condición en los estudios epidemiológicos. La definición operativa, como la de cualquier variable, debería derivarse del desarrollo conceptual y de los modelos teóricos existentes.

Así, el objetivo principal de este ensayo fue revisar las distintas propuestas conceptuales subyacentes a la medición de la multimorbilidad, considerando su papel epidemiológico y los retos metodológicos que se derivan de ella. Para lograrlo, primero se revisaron las definiciones clásicas de 'comorbilidad' y sus diferencias con el concepto moderno de multimorbilidad; se discutieron a continuación los diversos papeles de la multimorbilidad en los estudios epidemiológicos, y, por último, se presentaron los distintos modelos conceptuales de los que se han derivado las definiciones operativas de multimorbilidad. De esta manera se acopiaron

los elementos necesarios para revisar y discutir las distintas estrategias de medición de esta variable, y hacer recomendaciones sobre su uso en los estudios epidemiológicos.

Definición conceptual de comorbilidad y multimorbilidad

La propuesta pionera de Feinstein definía la comorbilidad como "cualquier entidad clínica que ha existido o que podría ocurrir durante el curso clínico de un paciente que tiene una enfermedad índice bajo estudio" (2). Dos aspectos llaman la atención de esta primera definición: primero, establece que la comorbilidad implica la presencia de varias enfermedades y, también, de otras condiciones relacionadas con la salud reproductiva como el embarazo o el aborto, las reacciones adversas sintomáticas, los trastornos mentales o de comportamiento, o cualquier otro cambio relevante en el perfil clínico (2); el segundo aspecto tiene especial importancia porque marca la diferencia frente a los conceptos modernos y hace mención de una enfermedad índice, lo que implica que la comorbilidad se deriva y se define a partir de una única enfermedad. Esta definición fue utilizada por décadas y para algunos autores sigue teniendo vigencia (9).

En el marco de esta perspectiva, nuestro interés inicial se centró en las implicaciones del manejo clínico de los pacientes complejos más que en los problemas epidemiológicos. Feinstein estableció el criterio de toponimia para determinar los parámetros diagnósticos, y el de cronometría para precisar el periodo a partir del inicio de la enfermedad índice en que una segunda condición clínica podría atribuirse a esta. Para ello propuso, además, principios que llamó "decisiones de atribución", los cuales permitían, como su nombre lo indica, establecer razonablemente qué condiciones clínicas podrían considerarse comorbilidades (2). El modelo empírico con el que se exploró preliminarmente esta definición fue el de la diabetes (10). Sin embargo, tempranamente se reconoció que esta definición clásica de comorbilidad contemplaba solo el modo en que una enfermedad índice (como la diabetes) incrementaba la aparición de otras (complicaciones en los órganos blanco), y cómo el conjunto de estas afectaba, a su vez, el pronóstico final de la enfermedad principal, pero sin reconocer explícitamente el papel de las otras enfermedades concomitantes presentes desde un comienzo y que también podían afectar el curso clínico y el desenlace final de la enfermedad índice (10).

Correspondencia:

Julián Alfredo Fernández-Niño, Centro de Información para Decisiones en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud Pública, Av. Universidad N° 655, Colonia Santa María Ahuacatitlán, Cerrada Los Pinos y Caminera, C.P. 62100, Cuernavaca, Morelos, México

Teléfono: (52-177) 7329 3000, extensión 1833

julian.fernandez@insp.mx

Recibido: 11/02/15; aceptado: 22/10/15

En resumen, la principal crítica a la definición clásica de comorbilidad se traduce en que necesariamente se requería de la existencia de una enfermedad índice que precediera temporal y causalmente a las demás condiciones clínicas involucradas, lo que excluía la posibilidad de que pudieran ser antecedentes unas de otras, incluso que algunas fueran independientes entre sí, o que configuraran diversos perfiles complejos con distinto grado de relación etiológica, clínica o fisiopatológica, y tuvieran importancia clínica y epidemiológica (5). La determinación de estos perfiles complejos ha favorecido el desarrollo de nuevos términos como el de “pacientes pluripatológicos”, el cual hace referencia a personas de edad avanzada, o con enfermedades de gran complejidad, o con función limitada y vulnerabilidad, que han sido especialmente útiles para la predicción de la mortalidad general y la discapacidad (11), aunque tales conceptos podrían quedar incorporados en el concepto más amplio de multimorbilidad, como se propone más adelante en este ensayo.

Por todo lo anterior, se vio la necesidad de una definición más flexible que permitiera reconocer mejor las diferentes configuraciones de la coexistencia de enfermedades crónicas y de otras condiciones clínicas y no clínicas, y se abrió el camino para el establecimiento del concepto de multimorbilidad. Aunque dicho concepto se empleó por primera vez en Alemania (12), y su uso se restringía a la literatura científica publicada en alemán, a partir de la década de los noventa comenzó a extenderse internacionalmente (6). Mientras la comorbilidad implicaba la aparición de otra entidad clínica en el curso de una enfermedad índice (9), la multimorbilidad solo implicaba la coexistencia de enfermedades con distinto grado de relación en un mismo individuo (4,9).

En esta misma perspectiva, la Organización Mundial de la Salud (OMS) definió la multimorbilidad sencillamente como “la presencia de dos o más condiciones de salud” (13). La amplitud de esta definición permitió considerar todas las “condiciones” que pudieran afectar globalmente el estado de salud de un individuo, ya que el término “condición” permite incluir no solo las enfermedades sino otros aspectos clínicos y no clínicos, aunque no es explícita la inclusión de la esfera psicosocial. Por lo anterior, en un esfuerzo muy reciente por mejorar la definición de multimorbilidad de la OMS y tomar en consideración las propuestas de otros autores, la *European General Practice Research Network* promovió una reunión de expertos en el

2013 (6). Con base en una revisión sistemática de la literatura científica, los expertos identificaron 132 definiciones en 416 documentos, y acuñaron la siguiente definición integradora: “La multimorbilidad se define como cualquier combinación de una enfermedad crónica con al menos otra enfermedad (aguda o crónica), o con un factor psicosocial (asociado o no), o con un factor somático” (traducción de los autores) (6).

Esta definición tan amplia adopta un punto de referencia conceptual muy distinto, de particular importancia en los adultos mayores, y representa un viraje conceptual con respecto a la definición centrada en la enfermedad, útil para el cuidado de las condiciones agudas, hacia una visión centrada en la funcionalidad física y social, la cual resulta importante para el cuidado a largo plazo, por cuanto la expresión “cualquier factor psicosocial o somático” necesariamente alude a múltiples dimensiones y considera el cuidado de los adultos mayores en todas las esferas (6). Así, la condición del adulto mayor no se concibe como una suma de enfermedades crónicas independientes o derivadas de una enfermedad índice (la comorbilidad), sino que se reconoce la existencia de perfiles complejos que incorporan lo psicosocial (14).

En este ensayo se hace énfasis en los adultos mayores, pues constituyen el grupo con mayor prevalencia de multimorbilidad (4), y porque la condición poco se ha estudiado en otras poblaciones como la infantil, cuyo estudio se ha centrado en condiciones derivadas de una sola enfermedad índice, como la obesidad infantil (15), o en la concurrencia de infecciones prevalentes en la infancia, como la ‘poliparasitosis’ (16), y su asociación con la anemia y la desnutrición (16) o, incluso, su relación paradójica con otros parásitos como el de la malaria (17). Solo algunos trabajos más recientes han abordado la multimorbilidad en la infancia desde múltiples dimensiones, al incorporar en estos perfiles los aspectos psicosociales, como se ha hecho, por ejemplo, en el estudio de los trastornos mentales de la infancia (18).

Para resumir lo planteado hasta el momento, la multimorbilidad se diferenciaría de la concepción clásica de comorbilidad de la siguiente manera:

- No implica necesariamente la existencia previa de una “enfermedad índice” en cuyo curso aparecen otros padecimientos o condiciones de salud.
- El grado y el tipo de relación etiológica, clínica o fisiopatológica de los padecimientos involucrados varían ampliamente. Esto quiere decir que

el término no solamente involucra aquellos perfiles en los que un padecimiento lleva a otro o complica el inicial, sino diversos modelos que pueden compartir una etiología común y cursan, o no, con complicaciones del mismo sistema o complicaciones fisiológicas que pueden interactuar clínicamente de formas muy diversas (o no hacerlo).

- Se incorporan otras “condiciones” que no constituyen enfermedades y concurren con la enfermedad crónica, tales como los factores psicosociales o somáticos, es decir, es un concepto que involucra múltiples dimensiones.
- El término aspira a la integralidad y abarca otras propuestas para denominar distintas relaciones entre enfermedades crónicas y otras condiciones de salud.

Por último, al revisar la literatura científica reciente se puede afirmar que el término multimorbilidad se ha utilizado sobre todo durante las últimas dos décadas y que el consenso sobre la pertinencia de su uso frente al de comorbilidad es cada vez más amplio (6). Prueba de ello es que al buscar en Medline puede observarse que el uso del término multimorbilidad se ha incrementado más de 10 veces en los artículos científicos publicados en la última década (19).

Importancia y papel epidemiológico de la multimorbilidad en adultos mayores

La prevalencia de la multimorbilidad, concebida como la presencia de dos o más enfermedades crónicas según la definición de la OMS (que es la más utilizada en los estudios epidemiológicos a nivel internacional), se incrementa progresivamente con la edad (20,21), y se sitúa entre 60 y 70 % en los mayores de 60 y 80 años, respectivamente, tal como se ha confirmado en diversos países con adultos mayores que no están internados en instituciones (22,23). Puede afirmarse, entonces, que esta condición es un problema emergente de salud pública global, cuya importancia obviamente se incrementa al sumar la prevalencia de cada enfermedad crónica y considerar el crecimiento y el envejecimiento de la población. En los Estados Unidos se estima, por ejemplo, que la atención de las personas que viven con multimorbilidad pasará de USD\$ 60 millones en el 2000 a USD\$ 81 millones en el 2020 (24).

Los retos que esto implica para la salud pública, los sistemas de salud y el manejo clínico de los pacientes, son enormes (3). Los adultos mayores

son un grupo particularmente vulnerable a la multimorbilidad debido a la presencia de las enfermedades crónicas adquiridas a lo largo de la vida, lo que se incrementa y se agrava con la edad (20,21). Se trata de un grupo social afectado por múltiples enfermedades que coexisten con otras condiciones clínicas y no clínicas en un contexto familiar y social poco favorable, en especial cuando el acceso a los servicios de salud es deficiente, lo que puede favorecer la aparición y la progresión de condiciones de salud asociadas a perfiles clínicos complejos, con el consecuente deterioro de la calidad de vida (24).

Desde una perspectiva epidemiológica, la multimorbilidad puede operar como variable para definir la población de interés, como variable modificadora de efecto, como variable de confusión o como variable predictora de múltiples situaciones de salud (8). Cualquiera de estas variables puede considerarse relevante como medición apropiada del constructo, aunque en algunos casos podría plantear retos específicos.

En cuanto a la primera variable mencionada, la ausencia de multimorbilidad puede considerarse como criterio de inclusión en los estudios, lo cual es muy pertinente, especialmente en el contexto de los ensayos clínicos controlados aleatorios. Se ha señalado que la mayoría de estos ensayos y de los metanálisis se hacen en personas con pocas enfermedades crónicas, o con una sola, lo cual limita la validez externa de la eficacia obtenida, ya que los estudios que responden al paradigma de la enfermedad única no se ajustarían a los perfiles complejos de multimorbilidad, tan frecuentes hoy en la práctica clínica (8).

Además, ya hay evidencia empírica de que el efecto de muchos tratamientos se modificaría por la multimorbilidad (8). En este sentido, se han desarrollado varias metodologías de análisis epidemiológico para detectar los efectos de la multimorbilidad en los tratamientos, entre las que cabe destacar el análisis estratificado por comorbilidades, el análisis bidimensional de resultados frente a la multimorbilidad y el bienestar subjetivo, el ajuste por índices ‘multidimensionales’, los modelos de predicción de riesgo (25,26) y, más recientemente, el modelo de “fraccionamiento recursivo” (8,27). Es importante mencionar que los estudios sobre la modificación del efecto consideran la multimorbilidad de manera unidimensional, es decir, no evalúan cómo determinadas combinaciones de condiciones clínicas (y no solo su número) podrían modificar la eficacia de los tratamientos.

La multimorbilidad por sí sola también puede verse como una variable predictora de diversos eventos de salud, lo cual es muy relevante, especialmente cuando se trata de adultos mayores (19). En diversos estudios longitudinales se ha determinado que la multimorbilidad (medida de muy diferentes maneras) opera como predictor de la mala percepción de salud (28), de la discapacidad física (4,29,30), de una menor calidad de vida (24,31-34) y de la depresión (35,36).

También se ha estudiado la forma en que una enfermedad puede afectar la aparición de otra, como es el caso de la gran controversia en torno a la asociación paradójica entre geohelmintiasis y malaria (17), o de la llamada “comorbilidad inversa en cáncer”, un nuevo paradigma en este campo derivado del hallazgo de que los individuos con síndrome de Down, Parkinson, esquizofrenia, diabetes, anorexia o enfermedad de Alzheimer, entre otras, están protegidos contra diversas formas de cáncer (tumores sólidos, tumores relacionados con el consumo de tabaco y cáncer de próstata) (37). Es esperable que haya interacciones impensadas y paradójicas en el marco de la concurrencia cada vez más frecuente de enfermedades, así como cambios en los perfiles epidemiológicos debidos a esta nueva situación y a las causas competitivas de morbilidad.

Se han explorado, asimismo, diversos enfoques para estudiar el impacto de la multimorbilidad cuando concurren múltiples situaciones de salud (7). Algunas de estas aproximaciones sugieren el uso de indicadores compuestos de los resultados en salud (38), incluida la supervivencia, para la cual la multimorbilidad se ha establecido como un predictor independiente muy importante en los adultos mayores (39,40).

Como posible variable de confusión, la multimorbilidad puede ser muy cambiante. En este sentido, Feinstein intuyó tempranamente que la presencia de múltiples enfermedades en los estudios de cohortes podría ser una variable “de confusión relevante, de manera que las asociaciones observadas, especialmente con el pronóstico, no se distinguirían de los efectos debidos a la ‘disparidad pronóstica inicial’” explicada por la concurrencia de varias enfermedades (2). Según el tipo de diseño y la asociación explorada, el papel de la multimorbilidad como factor de confusión puede ser más o menos relevante. Otras consecuencias de la multimorbilidad de relevancia en salud pública (que en aras de la brevedad no se desarrollan

aquí), incluyen el incremento en la demanda de servicios de salud (22,41), la hospitalización y los gastos de atención (41,42).

El papel epidemiológico y la importancia en salud pública de la multimorbilidad rebasan los alcances de este ensayo, pero cualquier revisión de los estudios actuales sobre la epidemiología de las enfermedades crónicas o sobre la utilización de los servicios de salud, refrenda la importancia de la medición y la incorporación de esta condición en la investigación, y de su ayuda en la toma de decisiones a nivel clínico y poblacional.

Modelos teóricos de multimorbilidad

Las definiciones de multimorbilidad discutidas hasta ahora abarcan un amplio espectro. Los modelos que a continuación se presentan responden a diferentes perspectivas que no son necesariamente excluyentes. Se hizo el esfuerzo de determinar las más influyentes de acuerdo con los artículos consultados, porque, ciertamente, son muchas propuestas diversas. Por respeto a los autores, se mantuvo el uso del término comorbilidad cuando así aparecía en los textos originales, pero ya se sabe que en muchos casos este término es equivalente al concepto de multimorbilidad.

La diferenciación hecha al principio de este documento entre multimorbilidad y comorbilidad se refiere, sobre todo, a la diferencia entre la primera y el concepto clásico de comorbilidad. Sin embargo, en las últimas décadas muchos autores han seguido usando el término de comorbilidad para referirse a relaciones mucho más diversas que, a nuestro juicio, corresponderían mejor al concepto de multimorbilidad. El uso del término comorbilidad podría inducir a confusión, pero consideramos que no era preciso recurrir a otro distinto al dado por los autores, aunque cuando fue necesario se hicieron las aclaraciones pertinentes.

Un primer modelo, propuesto en el ámbito de la salud mental, discrimina entre comorbilidad “homotípica” y “heterotípica” según el grado de relación etiológica y fisiopatológica entre las comorbilidades (43). La homotipia es un concepto ambiguo que se refiere a que la segunda comorbilidad constituye un mismo trastorno que evoluciona en el tiempo, o también puede referirse a la pertenencia de ambos trastornos a un mismo síndrome. La comorbilidad heterotípica, por su parte, se refiere a la coexistencia de trastornos que, aunque pueden estar relacionados entre sí, no pertenecen al mismo grupo diagnóstico (es

decir, no tienen el mismo origen fisiopatológico), ni son la extensión nosológica del otro ni de su curso clínico. Sin embargo, quienes proponen estas definiciones aceptan que los límites entre ambos subtipos suelen ser borrosos y que implican cierto grado de ambigüedad (43).

En el contexto de las enfermedades crónicas también se ha propuesto una clasificación muy relacionada con la anterior, la cual divide las comorbilidades en concordantes y discordantes según si responden al mismo “perfil de riesgo fisiopatológico” (44). Así, dos comorbilidades serían concordantes si comparten un perfil de riesgo y puede aplicárseles el mismo plan de manejo. En contraste, dos condiciones serían discordantes cuando no están vinculadas etiológica ni patológicamente, no comparten factores de riesgo subyacentes, y no tienen el mismo plan de manejo. En los artículos menos recientes, a este tipo de relaciones se le denominaba de “trastornos no relacionados” (45). En este sentido, se ha reportado que las enfermedades discordantes podrían afectar también el cuidado médico y la atención de la diabetes (46). En el contexto de la multimorbilidad, si existe una interrelación entre las enfermedades que afecte el bienestar del paciente, incluso cuando no haya un vínculo etiológico ni patológico, se presentaría un perfil complejo de interés clínico y epidemiológico. Gran parte del problema reside, precisamente, en que la mayoría de los estudios epidemiológicos hace énfasis en las comorbilidades concordantes, lo cual se ha traducido, lamentablemente, en la ausencia en las guías basadas en la evidencia de estrategias de manejo y de una discusión sobre las diferencias en el pronóstico de los pacientes con comorbilidades no relacionadas (47).

Desde el punto de vista de la relación temporal, la comorbilidad también se ha clasificada como concurrente o sucesiva (43). En la primera, los dos trastornos se presentan simultáneamente y coinciden en su fenomenología, e incluye casi todos los tipos de comorbilidad en los que coexisten dos trastornos al menos durante un periodo, aunque los tiempos de comienzo y finalización de los trastornos no se correspondan exactamente. En contraste, cuando dos trastornos no coinciden en el tiempo, es decir que no se han presentado simultáneamente, se dice que existe una comorbilidad sucesiva. Este último tipo de comorbilidad puede parecer extraño juzgado desde el sentido común, porque las definiciones operativas convencionales implican que en la

comorbilidad (o multimorbilidad) las enfermedades deben concurrir en el tiempo. Sin embargo, dos o más enfermedades podrían estar íntimamente relacionadas entre sí sin que necesariamente sean contemporáneas.

Otra definición de la comorbilidad clasifica los perfiles de acuerdo con si la presencia de una de las enfermedades modifica el riesgo de morir por la otra y utiliza los términos de comorbilidad definitoria y no definitoria (10). Sin duda, es relevante la forma en que una enfermedad concomitante modifica el riesgo de morir por otra, sin embargo, los autores señalan que se requiere de la existencia de una enfermedad índice cuyo pronóstico se vea modificado por otra condición clínica. Este enfoque podría ampliarse y considerar la muerte como resultado de la interrelación entre las diversas enfermedades, específicamente cuando existen perfiles clínicos complejos, tal como se ha planteado en algunos estudios empíricos (29,38,39).

Una propuesta integradora de los distintos modelos de multimorbilidad (aunque en ella los autores emplean el término comorbilidad), es la desarrollada por Valderas, *et al.* (5), quienes proponen cinco modelos con base en la relación etiológica de las enfermedades implicadas. Muchas de las definiciones esbozadas hasta aquí podrían contemplarse en esta propuesta integradora. A continuación se compara la propuesta de Valderas, *et al.*, con otras registradas en la literatura científica, especialmente en los artículos revisados para este ensayo. Es importante mencionar que todos estos modelos tienen la particularidad de responder a múltiples causas y de incorporar diversas interrelaciones entre los factores etiológicos, incluidos los factores sociales determinantes de los padecimientos involucrados en la multimorbilidad.

El primer modelo, llamado modelo “sin asociación etiológica”, contempla que las enfermedades coexistentes no tengan ninguna relación causal entre ellas y que sus factores de riesgo sean diferentes e independientes entre sí, como, por ejemplo, la caries y la depresión, cuya relación no es tan clara ni tan estrecha, aunque con algún esfuerzo se podrían señalar factores de riesgo comunes. El modelo de Valderas, *et al.*, probablemente es equivalente a la definición de comorbilidad discordante (44), o de “trastornos no relacionados” (45), ya citada. También, es probable que todas las comorbilidades sin asociación etiológica puedan catalogarse como “heterotípicas” (43), aunque no todas ellas carezcan de asociación etiológica. Sin

embargo, al menos en la definición y los ejemplos dados por Angold, *et al.*, no se excluye que las enfermedades puedan estar asociadas entre sí, aunque no se den en un “continuo” ni tengan el mismo origen, lo cual permitiría plantear su pertenencia al segundo modelo.

En este segundo modelo, llamado de “causalidad directa”, una enfermedad puede causar otra a pesar de que los factores de riesgo sean diferentes e independientes: en el curso de la enfermedad índice, por ejemplo la diabetes, se presenta la segunda (falla renal). Este modelo es el que mejor corresponde con la definición clásica de comorbilidad propuesta por Feinstein (2). La distinción clásica entre enfermedad ancestral (la causante, o que se convierte por sí misma en la enfermedad índice) y la enfermedad sobrevenida (aquella causada por un nuevo proceso patológico debido a efectos anatómicos, o fisiológicos, agregaríamos nosotros), también correspondería a este modelo (2). Otros autores hablan de comorbilidades primarias y secundarias (43), que también reconocen la relación causal de una y otra enfermedad.

En el tercer modelo, denominado de “factores de riesgo asociados”, los factores de riesgo de las enfermedades que configuran la comorbilidad están estrechamente relacionados entre sí, por ejemplo, el tabaco y el alcohol. Con una ligera variación, en el cuarto modelo, llamado de “heterogeneidad”, los factores de riesgo no están relacionados entre sí, sino que los de una enfermedad pueden causar la otra y viceversa. Esta diferencia es sutil, pero podría cobrar importancia en los estudios etiológicos de la comorbilidad. En últimas, ambos modelos se traducirían en que las enfermedades tienen un origen etiológico común o etiologías distintas, pero estrechamente relacionadas entre sí, por ejemplo, las enfermedades causadas por el cigarrillo o el alcohol como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y el cáncer de pulmón.

La correspondencia de estos dos modelos con el de comorbilidad concordante (44) no es del todo directa, o por lo menos no resulta tan clara, ya que el compartir un origen etiológico (para lo cual, según la lógica de Valderas, *et al.*, basta compartir un factor de riesgo o tener factores de riesgo relacionados), no implica que haya un vínculo etiológico y patológico. El problema, entonces, es que cuando hay un mismo factor de riesgo o factores de riesgo relacionados, pero los mecanismos causales son diferentes y afectan distintos sistemas fisiológicos y órganos blanco

(como el alcohol en la cirrosis y la hipertensión), no se garantiza un plan de manejo integral. Así, la relación entre ambas definiciones no es nada fácil de trazar. Se podría afirmar, no obstante, que todas las comorbilidades concordantes encajan en alguno de estos dos modelos (factores de riesgo asociados o heterogeneidad), pero que ellos no siempre equivalen a una comorbilidad concordante.

El último modelo, llamado de “independencia”, plantea que no hay asociación etiológica real, pero que las características diagnósticas de una de las enfermedades se deben a la influencia de las demás, aunque no exista una relación causal. De algún modo, este modelo ya había sido previsto por Feinstein cuando hablaba de las dificultades diagnósticas que podrían presentarse por la comorbilidad, pues una enfermedad dificultaba, potenciaba o retrasaba el diagnóstico de la segunda (2). Este modelo tiene mayores implicaciones en la clínica que en la epidemiología, por lo que no profundizaremos en él.

El aporte teórico de la propuesta de Valderas, *et al.*, es muy significativo y, aunque el modelo de causalidad directa equivaldría al de comorbilidad clásica (por la presencia de una enfermedad índice), los otros modelos van más allá al considerar las interrelaciones entre las enfermedades y contemplar la existencia de perfiles complejos. Aunque de manera esquemática puede parecer que se requiere que las enfermedades sean concurrentes, los propios autores reconocen que las comorbilidades podrían ser sucesivas y tener distintos grados de relación en el tiempo, incluso sin presentarse en el mismo periodo (5), como es el caso de la llamada “comorbilidad sucesiva” (43). Sin embargo, no se comprende por qué Valderas, *et al.*, denominan como comorbilidad a todos sus modelos, cuando ellos mismos reconocen que, en su sentido clásico, esta requiere de una enfermedad índice, en contraste con la multimorbilidad, definida de manera muy amplia por estos autores como la presencia de varias enfermedades en un mismo individuo. De hecho, como se sugería al principio de esta sección, se podría afirmar que todos los modelos, a excepción de los de causalidad directa, pueden considerarse como multimorbilidad.

Para recapitular lo discutido hasta aquí, podría afirmarse que las comorbilidades concordantes o discordantes (44), las concurrentes o sucesivas (43), las definitorias o no definitorias (10), o los diversos modelos de Valderas, *et al.* (5), no son

comorbilidades en el sentido clásico del término. Específicamente, las comorbilidades discordantes, aunque los autores las llamen así, implican que no hay un padecimiento que pueda considerarse como la enfermedad índice, puesto que el término incorpora morbilidades que “no están vinculadas etiopatológicamente, no comparten factores de riesgo subyacentes, y no tienen el mismo plan de manejo” (44), así que no serían comorbilidades en el sentido clásico del término. Ni siquiera todas las comorbilidades concordantes podrían considerarse como comorbilidades clásicas, ya que para serlo bastaría con que compartieran un perfil de riesgo u otros factores, y tampoco sería indispensable que una ocurriera como consecuencia de la otra, o en su curso, y en el caso de que existiera una enfermedad índice, esta bien podría considerarse como un tipo de comorbilidad concordante. Por las mismas razones, las comorbilidades concurrentes o sucesivas, o las definitorias o no definitorias, así como todos los modelos de Valderas, *et al.*, excepto el de causalidad directa, serían concepciones mucho más amplias y complejas, cercanas a la multimorbilidad, independientemente de cómo las hayan llamado los autores.

A nuestro juicio, la definición de multimorbilidad es mucho más amplia y puede contener todas las propuestas revisadas, incluida la de comorbilidad clásica, ya que incorpora diversas relaciones entre las condiciones involucradas. La persistencia del uso del término comorbilidad en la literatura científica es, sin embargo, inevitable debido a las tradiciones académicas y a que los consensos recientes en torno a las definiciones aún no alcanzan la aceptación de todos los autores. No obstante, más allá de la necesaria solución del problema nominativo, constituye un gran logro el reconocimiento de la existencia de modelos que expresan relaciones diferentes entre las enfermedades y configuran diversos perfiles de multimorbilidad.

Otra crítica de estos modelos es que están diseñados para las enfermedades, mientras que la definición más holística de multimorbilidad incorpora los factores de riesgo psicosociales y las situaciones no clínicas (6). Sin embargo, consideramos que los modelos de heterogeneidad y de factores de riesgo asociados podrían ampliarse para considerar todos estos factores, superando el enfoque centrado en las enfermedades e incorporando los aspectos psicosociales. Para Valderas, *et al.*, sin embargo, estas relaciones sí son importantes, y por ello desarrollan también

el concepto de “carga de la morbilidad”, definido como el impacto de distintas enfermedades según su gravedad, pero también sus factores de riesgo psicosociales (5). Este concepto ha sido desarrollado de modo paralelo y se supone que abarca un marco más amplio que la multimorbilidad, pues respondería a un concepto mucho más extenso conocido como “complejidad del paciente”, que abarca todos los factores determinantes de su bienestar y considera “otros atributos relacionados con la salud” (48). Sin embargo, es probable que estas otras definiciones fueran más necesarias cuando el concepto de multimorbilidad era muy limitado. En nuestra opinión, los conceptos de “carga de la morbilidad” y “complejidad del paciente” se ven mejor reflejados en el nuevo concepto de multimorbilidad señalado en este ensayo, el cual contempla de un modo integral los mismos componentes, pero reconoce que es mucho más que la coexistencia de diversas enfermedades (6).

Más allá de las amplias diferencias conceptuales, es claro que las definiciones operativas deben contemplar y reflejar la complejidad de las interrelaciones entre las condiciones que conforman la multimorbilidad. A continuación se revisan las distintas propuestas de medición de la multimorbilidad y su relación con el desarrollo del concepto presentado en este ensayo.

Estrategias de medición de la multimorbilidad: ¿cuál es su relación con las definiciones operativas y los modelos conceptuales?

Las definiciones operativas de multimorbilidad usadas en los estudios epidemiológicos podrían catalogarse en tres grandes grupos (figura 1). En el primero, las definiciones operativas se traducen en el plano de lo funcional mediante un proceso de medición bien definido, consistente y reproducible. Esperamos discutir en esta sección la brecha existente entre el concepto teórico y la medición de la multimorbilidad, estableciendo la relación entre los modelos conceptuales y las estrategias de medición disponibles.

Sin duda, los parámetros operativos más extendidos en la literatura epidemiológica recurren al simple conteo de enfermedades crónicas. En más de 80 % de los estudios disponibles esta fue la definición operativa y, por ello, será la más discutida en esta sección del ensayo (6,49). En otros estudios se la asume como una variable dicotómica (presencia *versus* ausencia), que permite reportar prevalencias de multimorbilidad. El problema es que así se

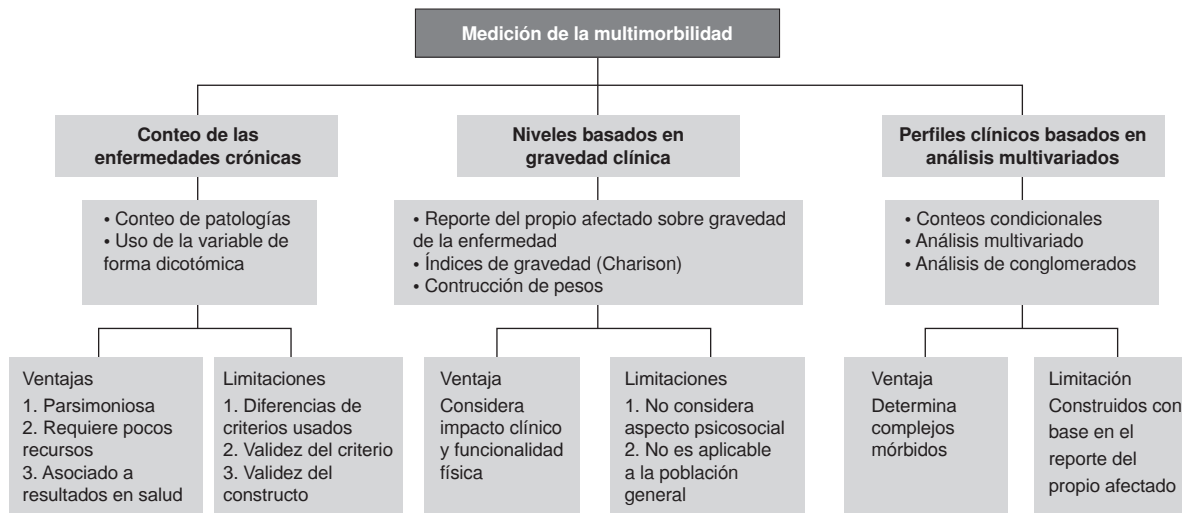


Figura 1. Estrategias de medición de la multimorbilidad

obtienen, obviamente, grandes diferencias en las estimaciones dependiendo del número de enfermedades crónicas coexistentes a partir del cual se considera que existe multimorbilidad (los puntos de corte más utilizados son, al menos, dos o tres enfermedades crónicas) (20,21). Algunos autores han señalado las ventajas de esta medida, sobre todo en el contexto de los estudios poblacionales (19) (figura 1).

Sin embargo, son múltiples las limitaciones que pueden detectarse en las definiciones operativas de la multimorbilidad (figura 1). Las críticas a las medidas de multimorbilidad se han centrado en los dos primeros aspectos de las limitaciones y mucho menos en los problemas derivados de la poca correspondencia entre el desarrollo conceptual y las definiciones operativas, lo que tendría implicaciones para la validez del constructo.

En cuanto al primer aspecto (la comparabilidad de los estudios), el principal problema, además de la heterogeneidad de las poblaciones (que no trataremos acá pues no se refiere a problemas de medición sino de representatividad y validez externa), son las diferencias en la lista de enfermedades crónicas que sirve para el conteo. Este problema se aborda más como algo relativo a la comparabilidad de resultados que a la validez de la medición, porque hasta hace muy poco no existía una propuesta de estandarización del conteo. Muestra de ello es que en una revisión sistemática reciente (19), los autores encontraron que en los diversos estudios sobre multimorbilidad el número de enfermedades consideradas para el

conteo oscilaba entre cuatro y 102 (49). En esa misma revisión, se encontró una mediana de 14 enfermedades (media de 18,5), y 87,2 % de los estudios incluía entre seis y 25 enfermedades. Es más que obvio que ni los conteos ni las definiciones basadas en puntos de corte en los diversos estudios son comparables si las listas con las que se construyen contemplan condiciones distintas (50). En el caso particular de la estimación de prevalencias basadas en el criterio de la OMS (más de dos enfermedades crónicas), obviamente la probabilidad de catalogar una condición como multimorbilidad se incrementa si el número de enfermedades en la lista es mayor.

Otro problema muy relacionado con este se refiere específicamente a cuáles son las enfermedades consideradas en la lista, ya que estas pueden ser muy distintas, incluso, si su número es el mismo en dos estudios. En la revisión de Diederichs (49), la diabetes, el accidente cerebrovascular, la hipertensión arterial, el cáncer y la enfermedad pulmonar obstructiva, se encontraron en más de 80 % de las listas utilizadas para hacer los conteos (la diabetes, en 97,4 % de ellas), pero más allá de esas cinco enfermedades, la variabilidad de las enfermedades consideradas es muy amplia. La consecuencia obvia es que, al menos, en 20 % de los estudios no se contempla ninguna de las cinco condiciones clínicas principales. Teniendo en cuenta que se trata de enfermedades muy prevalentes en casi todos los países, la exclusión de una o varias de ellas tendría obvias consecuencias sobre la comparabilidad o, incluso, sobre la validez de la medida. A esto se le sumaría

el problema de las diferencias en la consideración de otras enfermedades que, a pesar de su menor prevalencia, pueden ser importantes en determinadas poblaciones y configurar complejos mórbidos diferentes.

En otra revisión sistemática más reciente (que corroboró todos los hallazgos ya mencionados) (19), los autores recomiendan que en los estudios epidemiológicos los conteos deben hacerse con base en una lista estandarizada de 12 enfermedades. Diederichs, *et al.*, por su parte, sugieren en su revisión que sean 11 (49) y que el conteo de enfermedades debería estandarizarse con base en criterios relevantes de determinación de enfermedades crónicas, entre ellos, su larga duración, la necesidad de tratamiento continuo, su impacto sobre las personas afectadas, su gran prevalencia y, en consecuencia, su importancia para el sistema de salud y la sociedad (49). Dichas listas podrían construirse con las estadísticas de los servicios de salud y los datos de mortalidad. Para el caso de los adultos mayores, todas las listas deberían considerar, al menos, estas enfermedades: el cáncer, la diabetes mellitus, la depresión, la hipertensión, el infarto de miocardio, la enfermedad cardíaca isquémica crónica, las arritmias cardíacas, la insuficiencia cardíaca, el accidente cerebrovascular, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la artritis. Sería igualmente necesario incluir en esta lista otras enfermedades físicas y mentales que también están presentes en los adultos mayores y que representan una condición de salud relevante por su interacción frecuente con el resto de las enfermedades (51). Además, otros autores han demostrado que el uso de grandes sistemas de información (51) podría permitir la elaboración de perfiles complejos con un mayor número de enfermedades. Sin embargo, las diferencias en la calidad de los sistemas de información en los países en desarrollo constituyen una potencial limitación práctica para la generación de estimaciones comparables. Por otro lado, además del reporte de prevalencias, Fortin sugiere la adopción de dos puntos de corte (dos enfermedades o más y tres o más) una vez estandarizadas las listas, ya que ello marca diferencias sustanciales (20).

La segunda limitación relevante de los conteos son los problemas de validez de la medición. Se pueden establecer dos desventajas muy importantes a partir de los estudios disponibles: primero, las medidas se basan en informes de los propios participantes. En la mayoría de las revisiones sistemáticas

esa fue la estrategia, especialmente porque se trataba de estudios basados en encuestas de población (6,20,49). Se ha señalado que cuando se emplean exámenes médicos se pueden encontrar prevalencias más altas, por lo que el reporte de los propios participantes tendería a subestimar las prevalencias (21). En muy pocos estudios se intenta combinar este tipo de reporte con el examen físico y la información de los registros médicos (52), lo cual sería preferible para determinar la comorbilidad (20). El segundo problema derivado del reporte de los propios participantes, aunque también se podría presentar con los datos de los informes clínicos e, incluso, ser de tipo diferencial, es el sesgo de detección, el cual se presenta porque los sujetos con algunas enfermedades graves suelen acudir con mayor frecuencia a los servicios de salud y ello incrementaría la probabilidad de que se les diagnostiquen otras enfermedades menos relevantes clínicamente (53). Por supuesto, dichas diferencias se explicarían, además, por las existentes en el acceso y la calidad de los servicios de salud. El reporte de los propios participantes podría tener limitaciones adicionales de medición en los adultos mayores, en especial, cuando existen problemas de comunicación o deterioro cognitivo.

Sin embargo, el reporte de los propios afectados es una medida cada vez más utilizada en los estudios epidemiológicos y se lo considera como un indicador válido que recoge múltiples dimensiones del estado de salud (54). Además, su relación con la multimorbilidad es estrecha, ya que conforme se incrementa el número de enfermedades reportadas por los propios afectados, la percepción de la salud cambia, lo que amerita su incorporación en los estudios epidemiológicos sobre el tema (55). Por otra parte, la información sobre la percepción del estado de salud difiere en los adultos jóvenes y los adultos mayores, pues estos son más propensos a experimentar nuevos problemas de salud cuya gravedad aumenta con el tiempo, lo que se refleja en el cambio de la percepción que tienen de su salud, en la que se alternan periodos de duelo con otros procesos psicológicos adaptativos. Por esta razón, dicho tipo de reporte debe emplearse con cautela, ya que refleja una experiencia subjetiva compleja que implica aspectos de salud mental y de salud física (56).

La tercera limitación de los conteos se relacionaría con el hecho de que no recogen el gran desarrollo conceptual actual de multimorbilidad, pues en ellos no se consideran los factores de riesgo

psicosociales (apoyo social y afrontamiento), la gravedad clínica, ni el contexto de los sujetos con enfermedades múltiples.

La simple presencia de varias enfermedades que, como se ha dicho, es muy frecuente en los adultos mayores, y el hecho de no considerar los otros factores, impiden la adopción de una visión holística del bienestar del paciente que considere adecuadamente los efectos de las interrelaciones entre las diversas enfermedades. En conclusión, las medidas basadas en listas de enfermedades no superan el paradigma de la multimorbilidad basado en la enfermedad, y no permiten avanzar hacia un modelo que incorpore la funcionalidad y los aspectos sociales (57).

En el segundo grupo de estrategias de medición se encuentran aquellas basadas en el uso o la generación de índices que, además del número de enfermedades, consideran la gravedad clínica y la funcionalidad, lo cual permite identificar el impacto y no solamente la presencia de la multimorbilidad. Existen diversos enfoques, pero no nos detendremos mucho en ellos porque se orientan más a pacientes hospitalizados y no son muy útiles en la población general, por lo que se han usado menos. En términos generales, existen tres grandes perspectivas sobre las medidas (figura 1): en la primera, se pide el reporte de los propios afectados sobre la gravedad de la enfermedad de acuerdo con los síntomas (58,59). En la segunda perspectiva, se utilizan índices de gravedad previamente validados mediante modelos de regresión que estiman el peso de cada una de 19 enfermedades según el estado clínico y el riesgo de muerte asociado. El más utilizado de estos índices es el de Charlson, validado como un buen predictor de la mortalidad (60). El índice de Charlson es una escala que se usa principalmente para estimar la esperanza de vida a diez años en función de la edad en que se evalúa y de las enfermedades concomitantes. Además de la edad, consta de 19 ítems que representan cada uno una enfermedad que se pondera según la gravedad clínica del paciente (60). Otra herramienta similar es la ponderación basada en signos o hallazgos clínicos, como en el caso de la escala de la enfermedad crónica (61) u otras que incorporan datos sobre el manejo clínico (62).

Los índices clínicos se utilizan cada vez más en los estudios de epidemiología como variables explicativas en modelos de riesgo predictivos de enfermedades crónicas, y son especialmente

útiles en pacientes con cierto grado de gravedad. Específicamente, Alonso, *et al.*, refieren que los índices de multimorbilidad derivados de estos modelos demuestran una mayor precisión para establecer la relación con los resultados negativos en salud, por ejemplo, la readmisión hospitalaria, la discapacidad y los costos de la atención médica (63), y es allí donde, probablemente, radica su mayor aplicabilidad.

Además de ignorar lo psicosocial, estas aproximaciones tienen la limitación de haber sido empleadas principalmente en pacientes hospitalizados y serían más aptas para pacientes con un nivel mínimo de gravedad clínica. El peso asignado a las enfermedades en dichos índices podría no ser aplicable a la población general, la cual es mucho más heterogénea que las poblaciones clínicas cautivas para las cuales se desarrollaron y validaron estos índices. Es por eso que, aunque el uso de estas estrategias de medición representa un avance con respecto al número de enfermedades, pues consideran el impacto clínico y la funcionalidad física, se restringe a poblaciones muy específicas y no considera las innumerables dimensiones de la multimorbilidad. Además, todas las estrategias anteriores tienen otro problema fundamental y es que ninguna reconoce las relaciones etiológicas de las enfermedades entre sí, como lo sugieren los modelos de factores de riesgo asociados o de heterogeneidad (5) revisados en la sección anterior de este ensayo. Es en este punto sensible en el que existe la mayor ruptura entre el desarrollo teórico y las definiciones operativas existentes. Desde el punto de vista etiológico, el problema es que los dos primeros grupos de perspectivas (las basadas en conteos, y las basadas en criterios de gravedad y funcionalidad), asumen, en últimas, que las enfermedades son independientes entre sí (primer modelo de Valderas, *et al.*), y las del segundo grupo, aunque consideran los aspectos clínicos, tampoco incorporan su relación etiológica.

Si las enfermedades fueran independientes entre sí, sería esperable que con base en la ley estadística multiplicativa de la probabilidad, la probabilidad de la coexistencia de enfermedades fuera igual a la de cada una (prevalencia), pero tempranamente se determinó que no era así (64). Se puede comprobar fácilmente que la probabilidad conjunta observada es mayor que la esperada, de manera que es evidente que muchas veces hay un grado de relación entre la aparición de las enfermedades que va más allá del que se podría explicar por el incremento en la probabilidad de un segundo

diagnóstico en un paciente que ya tiene una enfermedad. Una posible respuesta, que abre la puerta al último grupo de estrategias de medición, es que las causas de las enfermedades están relacionadas entre sí (tercer modelo de Valderas, *et al.*) o son compartidas (cuarto modelo de Valderas, *et al.*) o, incluso, que una enfermedad es causa de otra (segundo modelo de Valderas, *et al.*), aunque esta última alternativa sí ha sido abordada desde una aproximación clásica.

El desarrollo metodológico más interesante en este campo se ha dado precisamente en torno a esta posibilidad, aunque solo ha tenido cierto auge en los últimos años. En general, este tipo de modelos recurren a diversas técnicas estadísticas, entre las cuales pueden mencionarse los conteos condicionales, las diferentes técnicas de análisis multivariado y, en especial, el análisis de conglomerados (65,66). Las precisiones estadísticas de estos métodos escapan al alcance de este ensayo, cuya perspectiva es epidemiológica, pero es fundamental resaltar el razonamiento subyacente, que consiste básicamente en analizar la estructura de correlación de las enfermedades en una población dada. Estas técnicas estadísticas se combinan con los criterios clínicos y epidemiológicos, lo que permite determinar complejos mórbidos, patrones de enfermedades o perfiles complejos, en los cuales las enfermedades podrían estar relacionadas etiológicamente.

Las técnicas de análisis multivariado permiten determinar los patrones más frecuentes de multimorbilidad en los adultos mayores, entre los que encontramos la combinación de las enfermedades cardiovasculares y metabólicas, la de estas con enfermedades mentales, y la de estas últimas con las enfermedades musculoesqueléticas (66). Al final, en cada sujeto se determina la presencia de cada perfil del complejo mórbido identificado, lo que permite establecer la multimorbilidad de una forma mucho más específica que con base en un conteo o un índice, ya que estos pueden tener el mismo valor numérico para pacientes con combinaciones de enfermedades muy diferentes, cuyas consecuencias son potencialmente diversas.

Por otro lado, es importante resaltar que la especificación del tipo de relación etiológica entre las enfermedades que configuran un patrón determinado ameritaría un análisis particular y más profundo que considere el sentido de tales relaciones y sus factores comunes de riesgo (5). Este tipo de análisis constituye, sin duda, un primer paso que

supera la consideración de la multimorbilidad como la simple coexistencia o suma de enfermedades independientes. Sin embargo, una limitación obvia es que estos patrones se construyen, por lo general, a partir del informe de los propios afectados por enfermedades crónicas, de manera que tendrían las limitaciones de medición ya discutidas.

En los adultos mayores es claro que la mayoría de las enfermedades concomitantes no son independientes unas de otras, y la naturaleza de las relaciones entre ellas es de una enorme complejidad, lo que plantea retos teóricos y metodológicos para el análisis epidemiológico. Estas técnicas de determinación de patrones de enfermedades podrían también incorporar los factores de riesgo psicosocial y otros aspectos ajenos al ámbito clínico para, así, construir patrones de multimorbilidad más cercanos a la definición moderna del concepto.

Recomendaciones y conclusiones

Como se ha querido ilustrar en este ensayo, es evidente que no existe una correspondencia total entre el desarrollo conceptual y las definiciones operativas que se emplean en la vasta mayoría de los estudios epidemiológicos. Con contadas excepciones, el prolijo desarrollo teórico ocurrido en las últimas décadas, que ha ido desde la concepción clásica de comorbilidad (2) hasta el concepto de multimorbilidad con múltiples dimensiones (6), no se ha reflejado de manera proporcional en el desarrollo de nuevas técnicas de medición de esta condición. Es importante resaltar que de nada sirve el desarrollo conceptual si no permite cerrar la brecha entre la teoría y la medición, de manera que los modelos teóricos y los constructos existentes se traduzcan en estrategias de medición estandarizadas cuya validez y reproducibilidad puedan evaluarse en diversos contextos.

El conteo de las enfermedades sigue siendo la estrategia de medición de la multimorbilidad más utilizada en la mayoría de estudios epidemiológicos, en los que se la evalúa como variable de confusión y en los que se estudia su papel como elemento predictor de diversas situaciones de salud; asimismo, es la base para establecer la definición del punto de corte (número de enfermedades) por encima del cual se considera que la condición está presente, lo que permite estimar las prevalencias poblacionales de la multimorbilidad (20). En cualquiera de los casos anteriores, la definición operativa y la estrategia de

medición utilizadas tendrían serias implicaciones para la validez del resultado obtenido y, en últimas, para la determinación de la importancia real de esta condición en la salud pública.

Además de los problemas de los conteos, se ha querido poner en evidencia que esta medida obedece únicamente a uno de los modelos de relación etiológica: aquel que la asume como independiente (5). Como es cada vez más claro, dicha independencia pocas veces se cumple; por el contrario, las enfermedades se organizan en patrones complejos explicados por sus relaciones etiológicas.

Es por esto que la determinación de los patrones de las enfermedades mediante el análisis multivariado es muy prometedora y probablemente constituye el desarrollo más importante de la última década en este campo de estudio. Aunque no se trata más que de la aplicación de técnicas estadísticas bien conocidas, la premisa subyacente reconoce que existen relaciones etiológicas que configuran complejos de enfermedades interrelacionadas, lo que inicialmente permitiría explorar la existencia de los diversos modelos etiológicos propuestos (5).

Pero incluso esta propuesta se quedaría corta, ya que es probable que el estudio de determinados tipos de multimorbilidad requiera del desarrollo de nuevos modelos teóricos. Sin duda, la determinación de los patrones y su documentación constituye ya un primer paso muy importante, y permite contar con una perspectiva epidemiológica de la multimorbilidad más compleja. Un rezago persistente, sin embargo, es que todavía no se le da la suficiente consideración a la multimorbilidad conformada por enfermedades crónicas y condiciones agudas, de la que existen muchos ejemplos de relevancia en salud pública, por ejemplo, en el curso de la infección por HIV (67). Lamentablemente, la mayor parte de los modelos continúa dándole énfasis a las enfermedades crónicas.

Además, cada complejo mórbido merece ser analizado mediante estudios específicos que exploren las formas de relación etiológica entre las enfermedades, y las formas de interacción, independientemente de su origen o relación fisiopatológica, para modificar el curso clínico, la eficacia de los tratamientos, la progresión de las enfermedades y la supervivencia. En este camino, el desarrollo de índices que consideran la gravedad de la enfermedad es muy relevante, aunque podrían tener poca aplicabilidad en la población general

(19). En los estudios longitudinales, la determinación de perfiles de morbilidad que podrían modificar la eficacia de los tratamientos o el pronóstico clínico, es un aspecto de la investigación de gran importancia en la epidemiología clínica (8).

Pese a todas las limitaciones mencionadas con relación a las estrategias de medición, también deberían tenerse en cuenta otras consideraciones técnicas que contemplen su factibilidad y costo-efectividad en el contexto de los estudios poblacionales. Es probable que un argumento a favor del conteo sea su aplicación relativamente fácil y a un muy bajo costo, especialmente en las encuestas nacionales de salud (20) y, sin duda, siguen teniendo un gran valor epidemiológico, aunque para aumentar su aplicabilidad deben establecerse puntos de corte y listas estandarizadas de enfermedades.

En general, las críticas aquí planteadas deben hacernos conscientes de las limitaciones y de la necesidad de desarrollar otras propuestas de medición, pero no pueden traducirse en descartar del todo una definición operativa que puede y debe seguir utilizándose.

Por último, este ensayo no se detiene en los aspectos psicosociales de la multimorbilidad, pero es claro que no ha habido un esfuerzo metodológico apreciable a la hora de considerarlos en la medición de esta condición. Todas las estrategias de medición exploradas en este ensayo, incluso los perfiles complejos que incorporan los factores de riesgo, se basan en modelos centrados en la enfermedad. Aunque se ha avanzado en el desarrollo de índices que contemplan la funcionalidad y la gravedad clínica, e incluso algunos pocos incorporan la percepción de la propia salud, lo cierto es que los factores psicosociales siguen siendo los grandes ausentes en la medición, y los pocos avances en este sentido no se han extendido ni estandarizado lo suficiente. En este sentido, muy recientemente se ha propuesto un nuevo modelo que permite abordar la multimorbilidad en los países en transición epidemiológica, en el cual se contemplan tres grandes dimensiones: la complejidad del tratamiento, la interacción biológica de las enfermedades y un "modelo de la experiencia del paciente". Este último estaría constituido, a su vez, por el cumplimiento del tratamiento, el uso de servicios y los resultados en salud (68). Sin embargo, no existe aún una propuesta metodológica para la medición de este modelo a partir de múltiples dimensiones.

Es importante considerar, igualmente, que las condiciones socioeconómicas y los factores psicosociales pueden definir diversos perfiles de distribución de la multimorbilidad; en esta perspectiva, sería importante utilizar análisis basados en el modelo de los factores sociales determinantes en salud (69). Las diferencias de los perfiles podrían, incluso, constituir nuevos indicadores de inequidad en salud y constituirían un campo emergente de estudio.

Consideramos que en este último aspecto se presenta la mayor brecha entre el concepto y las definiciones operativas. Sería necesario desarrollar nuevas propuestas metodológicas que permitan medir la multimorbilidad desde múltiples dimensiones. Entre las tareas pendientes de la investigación sobre la multimorbilidad, el desarrollo y la validación de mejores estrategias de medición que mejor correspondan a los modelos conceptuales, siguen siendo una necesidad más que imperiosa. Una mejor estrategia de medición no solo permitiría una mayor validez del constructo, sino la obtención de información epidemiológica válida sobre el verdadero impacto de la multimorbilidad en la salud pública. Esa puerta ya se ha abierto.

Agradecimientos

A Martha María Téllez-Rojo, por sus valiosos comentarios sobre este manuscrito.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan no tener ningún conflicto de intereses.

Financiación

El artículo no contó con ninguna financiación.

Referencias

1. **Feinstein AR.** The clinical design of statistics in therapy. *Ann Intern Med.* 1968;69:1287-312. <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-69-6-1287>
2. **Feinstein AR.** The pre-therapeutic classification of comorbidity in chronic disease. *J Chron Dis.* 1970;23:455-68. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9681\(70\)90054-8](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9681(70)90054-8)
3. **Fortin M, Soubhi H, Hudon C, Bayliss EA, van den Akker M.** Multimorbidity's many challenges. *BMJ.* 2007;334:1016-7. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.39201.463819.2C>
4. **Fortin M, Lapointe L, Hudon C, Vanasse A.** Multimorbidity is common to family practice. Is it commonly researched? *Can Fam Physician.* 2005;51:245.
5. **Valderas JM, Starfield B, Sibbald B, Salisbury C, Roland M.** Defining comorbidity: Implications for understanding health and health services. *Ann Fam Med.* 2009;7:357-63. <http://dx.doi.org/10.1370/afm.983>
6. **Le Reste JY, Nabbe P, Manceau B, Lygidakis C, Doerr C, Lingner H, et al.** The European General Practice Research Network presents a comprehensive definition of multimorbidity in family medicine and long term care, following a systematic review of relevant literature. *J Am Med Dir.* 2013;14:319-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jamda.2013.01.001>
7. **Bayliss EA, Ellis JL, Shoup JA, Zeng C, McQuillan DB, Steiner JF.** Association of patient-centered outcomes with patient-reported and ICD-9-based morbidity measures. *Ann Fam Med.* 2012;10:126-33. <http://dx.doi.org/10.1370/afm.1364>
8. **Maciejewski ML, Bayliss EA.** Approaches to comparative effectiveness research in multimorbid populations. *Med Care.* 2014;52:23-30. <http://dx.doi.org/10.1097/MLR.0000000000000060>
9. **Bayliss EA, Ellis JL, Steiner JF.** Barriers to self-management and quality of life outcomes in seniors with multimorbidities. *Ann Fam Med.* 2007;5:395-402. <http://dx.doi.org/10.1370/afm.722>
10. **Kaplan MH, Feinstein AR.** The importance of classifying initial co-morbidity in evaluating the outcome of diabetes mellitus. *J Chron Dis.* 1974;27:387-404. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9681\(74\)90017-4](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9681(74)90017-4)
11. **Bernabeu-Wittel M, Ollero-Baturone M, Nieto-Martín D, García-Morillo S, Goicoechea-Salazar J.** Patient-centered care for older adults with multiple chronic conditions: These are the polypathological patients! *J Am Geriatr Soc.* 2013; 61:475-6. <http://dx.doi.org/10.1111/jgs.12142>
12. **Brandlmeier P.** Multimorbidity among elderly patients in an urban general practice. *ZFA (Stuttgart).* 1976;52:1269-75.
13. **World Health Organization.** The World Health Report 2008. Primary Health Care. Now more than ever. New York: The World Health Report; 2008. p. 14.
14. **Batstra L, Bos EH, Neeleman J.** Quantifying psychiatric comorbidity lessons from chronic disease epidemiology. *Soc Psychiatr Epidemiol.* 2002;37:105-11.
15. **Perea-Martínez A, Bárcena-Sobrino E, Rodríguez-Herrera R, Greenawalt-Rodríguez S, Carbajal-Rodríguez L, Zarco-Román J.** Obesidad y comorbilidades en niños y adolescentes asistidos en el Instituto Nacional de Pediatría. *Acta Pediatr Mex.* 2009;30:167-74.
16. **Al-Delaimy AK, Al-Mekhlafi HM, Nasr NA, Sady H, Atroosh WM, Nashiry M, et al.** Epidemiology of intestinal polyparasitism among Orang Asli school children in rural Malaysia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e3074. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003074>
17. **Fernández-Niño JA, Idrovo AJ, Cucunubá ZM, Reyes-Harker P, Guerra AP, Moncada LI, et al.** Paradoxical associations between soil-transmitted helminths and *Plasmodium falciparum* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012;106:701-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.07.012>
18. **Holguín-Acosta J, Osio-Urbe O, Sánchez-Mosquera Y, Carroza-Moog G, Cornejo-Ochoa W.** Comorbilidad del trastorno de hiperactividad con déficit de atención (THDA) en una muestra poblacional de niños y adolescentes escolares, Sabaneta, Colombia, 2001. *Iatreia.* 2007;20:101-10.

19. **Marengoni A, Angleman S, Melis R, Mangialasche F, Karp A, Garmen A, et al.** Aging with multimorbidity: A systematic review of the literature. *Ageing Res.* 2011;10:430-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2011.03.003>
20. **Fortin M, Stewart M, Poitras ME, Almirall J, Maddocks H.** A systematic review of prevalence studies on multimorbidity: Toward a more uniform methodology. *Ann Fam Medicine.* 2012;10:142-51. <http://dx.doi.org/10.1370/afm.1337>
21. **van den Akker M, Buntinx F, Metsemakers JF, Roos S, Knottnerus JA.** Multimorbidity in general practice: Prevalence, incidence, and determinants of co-occurring chronic and recurrent diseases. *J Clin Epidemiol.* 1998;51:367-75. [http://dx.doi.org/10.1016/s0895-4356\(97\)00306-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0895-4356(97)00306-5)
22. **Wolff JL, Starfield B, Anderson G.** Prevalence, expenditures, and complications of multiple chronic conditions in the elderly. *Arch Intern Med.* 2002;162:2269-76. <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.162.20.2269>
23. **Mollica RL, Gillespie J.** Care coordination for people with chronic conditions- 2007. Fecha de consulta: 10 de enero de 2015. Disponible en: www.partnershipforsolutions.org/DMS/files/Care_coordination.pdf
24. **Fortin M, Bravo G, Hudon C, Lapointe L, Almirall J, Dubois MF, et al.** Relationship between multimorbidity and health-related quality of life of patients in primary care. *Qual Life Res.* 2006;15:83-91. <http://dx.doi.org/10.1007/s11136-005-8661-z>
25. **Kent DM, Hayward RA, Griffith JL, Vijan S, Beshanky JR, Califf RM.** An independently derived and validated predictive model for selecting patients with myocardial infarction who are likely to benefit from tissue plasminogen activator compared with streptokinase. *Am J Med.* 2002;113:104-11. [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9343\(02\)01160-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9343(02)01160-9)
26. **Kent DM, Ruthazer R, Selker HP.** Are some patients likely to benefit from recombinant tissue-type plasminogen activator for acute ischemic stroke even beyond 3 hours from symptom onset? *Stroke.* 2003;34:464-7. <http://dx.doi.org/10.1161/01.STR.0000051506.43212.8B>
27. **Kiernan M, Kraemer HC, Winkleby MA, King AC, Taylor CB.** Do logistic regression and signal detection identify different subgroups at risk? Implications for the design of tailored interventions. *Psychol Methods.* 2001;6:35-48. <http://dx.doi.org/10.1037/1082-989X.6.1.35>
28. **Zeng C, Ellis JL, Steiner JF, Shoup JA, McQuillan DB, Bayliss EA.** Assessment of morbidity over time in predicting health outcomes. *Med Care.* 2014;52:52-9. <http://dx.doi.org/10.1097/MLR.0000000000000033>
29. **Marengoni A, von Strass E, Rizzato D, Winblad B, Fratiglioni L.** The impact of chronic multimorbidity and disability on functional decline and survival in elderly persons. A community-based, longitudinal study. *J Intern Med.* 2009;265:288-95. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2796.2008.02017.x>
30. **Groll D, To T, Bombardier J, Wright JG.** The development of a comorbidity index with physical function as the outcome. *J Clin Epidemiol.* 2005;58:595-602. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclinepi.2004.10.018>
31. **Sullivan PW, Ghushchyan VH, Bayliss EA.** The impact of co-morbidity burden on preference-based health-related quality of life in the United States. *Pharmacoeconomics.* 2012;30:431-42. <http://dx.doi.org/10.2165/11586840-00000-00000-00000>
32. **Fortin M, Bravo G, Hudon C, Lapointe L, Dubois MF, Almirall J.** Psychological distress and multimorbidity in primary care. *Ann Fam Med.* 2006;4:417-22. <http://dx.doi.org/10.1370/afm.528>
33. **Walker AE.** Multiple chronic diseases and quality of life: Patterns emerging from a large national sample, Australia. *Chronic Illn.* 2007;3:202-18. <http://dx.doi.org/10.1177/1742395307081504>
34. **Loza E, Jover JA, Rodríguez L, Carmona L, EPISER Study Group.** Multimorbidity: Prevalence, effect on quality of life and daily functioning, and variation of this effect when one condition is a rheumatic disease. *Semin Arthritis Rheum.* 2009;38:312-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semarthrit.2008.01.004>
35. **Wong SY, Mercer SW, Woo J, Leung J.** The influence of multi-morbidity and self-reported socio-economic standing on the prevalence of depression in an elderly Hong Kong population. *BMC Public Health.* 2008;8:119. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2458-8-119>
36. **Gunn JM, Ayton DR, Densley K, Pallant JF, Chondros P, Herrman HE, et al.** The association between chronic illness, multimorbidity and depressive symptoms in an Australian primary care cohort. *Soc Psychiatry Epidemiol.* 2012;47:175-84. <http://dx.doi.org/10.1007/s00127-010-0330-z>
37. **Tabarés-Seisdedos R, Valderas JM.** Inverse comorbidity: The power of paradox in the advancement of science. *Journal of Comorbidity.* 2013;3:1-3. <http://dx.doi.org/10.15256/joc.2013.3.19>
38. **Working Group on Health Outcomes for Older Persons with Multiple Chronic Conditions.** Universal health outcome measures for older persons with multiple chronic conditions. *J Am Geriatr Soc.* 2012;60:2333-41. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1532-5415.2012.04240.x>
39. **Menotti A, Mulder I, Nissinen A, Giampaoli S, Feskens EJ, Kromhout D.** Prevalence of morbidity and multimorbidity in elderly male populations and their impact on 10-year all-cause mortality: The FINE study (Finland, Italy, Netherlands Elderly). *J Clin Epidemiol.* 2001;54:680-6. [http://dx.doi.org/10.1016/S0895-4356\(00\)00368-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0895-4356(00)00368-1)
40. **Deeg DJ, Portrait F, Lindeboom M.** Health profiles and profile-specific health expectancies of older women and men: The Netherlands. *J Women Aging.* 2002;14:27-46. http://dx.doi.org/10.1300/J074v14n01_03
41. **Noël PH, Frueh BC, Larme AC, Pugh JA.** Collaborative care needs and preferences of primary care patients with multimorbidity. *Health Expect.* 2005;8:54-63. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1369-7625.2004.00312.x>
42. **Friedman B, Jiang HJ, Elixhauser A, Segal A.** Hospital inpatient costs for adults with multiple chronic conditions. *Med Care Res Rev.* 2006;63:327-46. <http://dx.doi.org/10.1177/1077558706287042>
43. **Angold A, Costello EJ, Erkanli A.** Comorbidity. *J Child Psychol Psychiatry.* 1999;40:57-87.
44. **Piette JD, Kerr EA.** The impact of comorbid chronic conditions on diabetes care. *Diabetes Care.* 2006;29:725-31. <http://dx.doi.org/10.2337/diacare.29.03.06.dc05-2078>

45. **Redelmeier DA, Tan SH, Booth GL.** The treatment of unrelated disorders in patients with chronic medical diseases. *N Engl J Med.* 1998;338:1516-20. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199805213382106>
46. **Boyd CM, Darer J, Boulton C, Fried LP, Boulton L, Wu AW.** Clinical practice guidelines and quality of care for older patients with multiple comorbid diseases: Implications for pay for performance. *JAMA.* 2005;294:716-24. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.294.6.716>
47. **Nardi R, Scanelli G, Corrao S, Iori I, Mathieu G, Cataldi Amatrian R.** Comorbidity does not reflect complexity in internal medicine patients. *Eur J Intern Med.* 2007;18:359-68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2007.05.002>
48. **Safford MM, Allison JJ, Kiefe CI.** Patient complexity: More than comorbidity. The vector model of complexity. *J Gen Intern Med.* 2007;22:382-90. <http://dx.doi.org/10.1007/s11606-007-0307-0>
49. **Diederichs C, Berger K, Bartels DB.** The measurement of multiple chronic diseases – a systematic review on existing multimorbidity indices. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2011;66:301-11. <http://dx.doi.org/10.1093/gerona/glq208>
50. **Schram MT, Frijters D, van de Lisdonk EH, Ploemacher J, de Craen AJ, de Waal MW, et al.** Setting and registry characteristics affect the prevalence and nature of multimorbidity in the elderly. *J Clin Epidemiol.* 2008;61:1104-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclinepi.2007.11.021>
51. **Barnett K, Mercer SW, Norbury M, Watt G, Wyke S, Guthrie B.** Epidemiology of multimorbidity and implications for health care, research, and medical education: A cross-sectional study. *Lancet.* 2012;380:37-43. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60240-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60240-2)
52. **Rijken M, van Kerkhof M, Dekker J, Schellevis FG.** Comorbidity of chronic diseases. *Qual Life Res.* 2005;14:45-55. <http://dx.doi.org/10.1007/s11136-004-0616-2>
53. **Britt HC, Harrison CM, Miller GC, Knox SA.** Prevalence and patterns of multimorbidity in Australia. *Med J Aust.* 2008;189:72-7.
54. **Idler EL, Benyamini Y.** Self-rated health and mortality: A review of twenty-seven community studies. *J Health Soc Behav.* 1997;38:21-37.
55. **Barros Marilisa BA, Zanchetta Luane M, Moura Eryl C, Malta DC.** Auto-avaliação da saúde e fatores associados, Brasil, 2006. *Rev Saúde Pública.* 2009;43:27-37. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102009000900005>
56. **Jylhä M.** What is self-rated health and why does it predict mortality? Towards a unified conceptual model. *Soc Sci Med.* 2009;69:307-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.socscimed.2009.11.003>
57. **Mercer SW, Smith SM, Wyke S, O'Dowd T, Watt GC.** Multimorbidity in primary care: Developing the research agenda. *J Fam Pract.* 2009;26:79-80. <http://dx.doi.org/10.1093/fampra/cmp020>
58. **Crabtree HL, Gray CS, Hildreth HJ, O'Connell JE, Brown J.** The Comorbidity Symptom Scale: A combined disease inventory and assessment of symptoms severity. *J Am Geriatr Soc.* 2000;48:1674-8. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1532-5415.2000.tb03882.x>
59. **Sangha O, Stucki G, Liang MH, Fossel AH, Katz JN.** The self-administered comorbidity questionnaire: A new method to assess comorbidity for clinical and health services research. *Arthritis Rheum.* 2003;49:156-63. <http://dx.doi.org/10.1002/art.10993>
60. **Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie R.** A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: Development and validation. *J Chronic Dis.* 1987;40:373-83.
61. **Holman CD, Preen DB, Baynham NJ, Finn JC, Semmens JB.** A multipurpose comorbidity scoring system performed better than the Charlson Index. *J Clin Epidemiol.* 2005;58:1006-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclinepi.2005.01.020>
62. **von Korff M, Wagner EH, Saunders K.** A chronic disease score from automated pharmacy data. *J Clin Epidemiol.* 1992;45:197-203. [http://dx.doi.org/10.1016/0895-4356\(92\)90016-G](http://dx.doi.org/10.1016/0895-4356(92)90016-G)
63. **Alonso-Morán E, Nuño-Solinís R, Onder G, Tonnara G.** Multimorbidity in risk stratification tools to predict negative outcomes in adult population. *Eur J Intern Med.* 2015;26:182-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2015.02.010>
64. **van den Akker M, Buntinx F, Roos S, Knottnerus JA.** Problems in determining occurrence rates of multimorbidity. *J Clin Epidemiol.* 2001;54:675-9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0895-4356\(00\)00358-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0895-4356(00)00358-9)
65. **Marengoni A, Rizzuto D, Wang HX, Winblad B, Fratiglioni L.** Patterns of chronic multimorbidity in the elderly population. *J Am Geriatr Soc.* 2009;57:225-30. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1532-5415.2008.02109.x>
66. **Prados-Torres A, Calderón-Larrañaga A, Hanco-Saavedra J, Poblador-Plou B, van den Akker M.** Multimorbidity patterns: A systematic review. *J Clin Epidemiol.* 2014;67:254-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclinepi.2013.09.021>
67. **Kim DJ, Westfall AO, Chamot E, Willig AL, Mugavero MJ, Ritchie C, et al.** Multimorbidity patterns in HIV-infected patients: The role of obesity in chronic disease clustering. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2012;61:600-5. <http://dx.doi.org/10.1097/QAI.0b013e31827303d5>
68. **Oni T, McGrath N, BeLue R, Roderick P, Colagiuri S, May CR, et al.** Chronic diseases and multi-morbidity - a conceptual modification to the WHO ICC model for countries in health transition. *BMC Public Health.* 2014;9:575. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2458-14-575>
69. **Orueta JF, García-Álvarez A, García-Goñi M, Paolucci F, Nuño-Solinís R.** Prevalence and costs of multimorbidity by deprivation levels in the Basque country: A population based study using health administrative databases. *PLoS One.* 2014;9:e89787. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0089787>

ARTÍCULO ORIGINAL

Reconstitución inmune exitosa mediante trasplante de células madre hematopoyéticas en un paciente colombiano afectado con enfermedad granulomatosa crónica

Yermis Carolina Rocha¹, Juan Álvaro López^{1,2}, Julio César Orrego¹, Yadira Coll^{3,4}, Amado Karduss³, Sergio Rosenzweig⁵, José Luis Franco¹

¹ Grupo de Inmunodeficiencias Primarias, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

³ Unidad de Trasplante Hematopoyético, Instituto de Cancerología, Clínica Las Américas, Medellín, Colombia

⁴ Departamento de Pediatría y Puericultura, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

⁵ Infectious Diseases Susceptibility Unit, NIAID, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

Introducción. La enfermedad granulomatosa crónica es una inmunodeficiencia primaria causada por mutaciones en los genes que codifican para las proteínas del sistema de la oxidasa de NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*) de las células fagocíticas, las cuales afectan la producción de especies reactivas del oxígeno y la actividad microbicida. Actualmente, la única terapia curativa para esta enfermedad es la reconstitución inmune mediante el trasplante de células madre hematopoyéticas.

Objetivo. Reportar la caracterización clínica y molecular de un paciente con enfermedad granulomatosa crónica ligada al cromosoma X y su reconstitución inmunitaria exitosa mediante el trasplante de células madre hematopoyéticas.

Materiales y métodos. El estallido respiratorio en neutrófilos de sangre periférica se midió por citometría de flujo mediante la prueba de oxidación de la dihidrorrodamina 123 (DHR 123). El análisis de las mutaciones del gen *CYBB* se hizo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el ADN complementario y la secuenciación e hibridación genómica comparativa en el ADN genómico. En el trasplante se emplearon células madre del hermano menor con HLA idéntico, y previamente se hizo un acondicionamiento de intensidad reducida. La reconstitución inmunitaria después del trasplante se evaluó periódicamente con hemoleucogramas y la prueba DHR 123 en neutrófilos de sangre periférica.

Resultados. El diagnóstico de la enfermedad granulomatosa crónica ligada al cromosoma X se estableció como resultado de una deleción hemicigota en la banda Xp21.1 que implicó la deleción completa del *CYBB*. La toma de injerto postrasplante para plaquetas y neutrófilos fue en los días 10 y 11, respectivamente. En el día 30 después del trasplante se logró la reconstitución hematológica completa y en los tres años siguientes no se observaron complicaciones ni infecciones.

Conclusión. El trasplante de células madre hematopoyéticas permite la reconstitución completa de la función inmunitaria relacionada con la actividad microbicida de las células fagocíticas de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica ligada al cromosoma X.

Palabras clave: enfermedad granulomatosa crónica, neutrófilos, NADPH oxidasa, especies reactivas del oxígeno, trasplante de células madre hematopoyéticas, acondicionamiento pretrasplante.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2870>

Successful immune reconstitution by means of hematopoietic stem cell transplantation in a Colombian patient with chronic granulomatous disease

Introduction: Chronic granulomatous disease is a primary immunodeficiency that results from mutations in proteins of the NADPH oxidase system that affect the microbicidal activity of phagocytes. Immune reconstitution by hematopoietic stem cell transplantation is currently the only curative therapy for this disease.

Contribución de los autores:

Yermis Carolina Rocha: revisión de las historias clínicas del paciente, recolección de datos y redacción del manuscrito

Juan Álvaro López: PCR del gen *CYBB* y diagnóstico molecular

Julio César Orrego: evaluación clínica y seguimiento del paciente

José Luis Franco: evaluación clínica, seguimiento del paciente, organización y redacción del manuscrito

Yadira Coll y Amado Karduss: trasplante de células madre hematopoyéticas

Sergio Rosenzweig: secuenciación del gen *CYBB*

Objective: To describe the clinical and molecular characterization of a patient with X-linked chronic granulomatous disease and the successful immune reconstitution by means of a hematopoietic stem cell transplantation.

Methods: The respiratory burst was measured by flow cytometry using the dihydrorodamine 123 (DHR) oxidation test in neutrophils of peripheral blood. Mutational analysis of *CYBB* was performed by PCR amplification in complementary DNA, as well as sequencing and comparative genomic hybridization in genomic DNA. HLA-identical stem cells from the patient's younger brother were used for the transplantation and reduced intensity pre-transplantation conditioning was administered. Post-transplantation immune reconstitution was evaluated periodically by serial complete blood counts and DHR 123 in peripheral blood neutrophils.

Results: The diagnosis of X-linked chronic granulomatous disease resulted from a hemizygous deletion affecting Xp21.1 that included the entire *CYBB*. Post-transplantation engraftment was documented in platelets and peripheral blood neutrophils at days 10 and 11, respectively. Total hematological reconstitution was achieved by day 30 post-transplantation and no complications or infections have been observed in the three years since the transplantation.

Conclusion: Hemopoietic stem cell transplantation allows for total reconstitution of the immune function related to microbicidal activity of phagocytic cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease.

Key words: Granulomatous disease, chronic; neutrophils, NADPH oxidase, reactive oxygen species, hematopoietic stem cell transplantation, transplantation conditioning.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2870>

La enfermedad granulomatosa crónica (EGC, *Online Mendelian Inheritance in Man* – OMIM # 306400) es una inmunodeficiencia primaria producto de defectos genéticos que afectan el sistema de la oxidasa del fosfato dinucleótido de adenina de la nicotinamida (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*, NADPH), el cual está encargado de la producción de especies reactivas del oxígeno para la actividad microbicida de las células fagocíticas (1,2). Esta enfermedad tiene una prevalencia estimada de uno por 200.000 nacidos vivos y hasta 70 % de los casos se deben a mutaciones ligadas al cromosoma X en el gen que codifica para la proteína gp91^{phox} (*CYBB*), mientras que las formas autosómicas recesivas se deben a mutaciones en los genes que codifican para las proteínas p67^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox} o p40^{phox} (3-6).

Los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica presentan infecciones recurrentes graves que afectan principalmente la piel, las vías respiratorias, el intestino, los ganglios linfáticos y, con menor frecuencia, órganos como el hígado, el bazo, el cerebro y los huesos, debidas principalmente a *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens*, *Nocardia* spp. y *Aspergillus*

spp. (3-5,7). El manejo convencional de la enfermedad incluye el tratamiento agresivo de las enfermedades infecciosas con antimicrobianos y ciclos cortos de esteroides, y la profilaxis con antimicrobianos para bacterias y hongos, así como con interferón gamma recombinante humano (rhIFN- γ). No obstante, las infecciones graves siguen presentándose con una alta tasa de morbilidad y una mortalidad anual que fluctúa entre 2 y 5 % (4,5,8,9). Además, los pacientes con esta enfermedad parecen tener un mayor riesgo de desarrollar infecciones y morir que los que presentan las formas autosómicas (6). No obstante, Kuhns, *et al.*, demostraron que la supervivencia de los pacientes con la enfermedad está fuertemente asociada con la producción residual de los intermediarios reactivos del oxígeno, independientemente del gen afectado (10).

El trasplante de células madre hematopoyéticas como forma de lograr la reconstitución inmunitaria en las inmunodeficiencias primarias, fue reportado por primera vez en 1968 (11,12). Hoy en día, los avances tecnológicos como la tipificación del HLA en alta resolución, el uso de células madre hematopoyéticas movilizadas en sangre periférica o en sangre de cordón umbilical, así como los tratamientos menos tóxicos de acondicionamiento y de profilaxis óptima para evitar la enfermedad de injerto contra huésped, lo han convertido en la mejor alternativa de reconstitución inmunitaria definitiva para muchos pacientes con diversas inmunodeficiencias primarias, lo cual mejora su

Correspondencia:

José Luis Franco, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Calle 62 N° 52-59, laboratorio 530, Medellín, Colombia
Teléfono: (574) 219 6472; fax: (574) 219 1065
jose.franco@udea.edu.co

Recibido: 18/06/15; aceptado: 09/09/15

supervivencia y calidad de vida (13-15). El trasplante de células madre hematopoyéticas en la enfermedad granulomatosa crónica es la única alternativa disponible actualmente para la curación de la enfermedad, con una supervivencia que oscila entre 90 y 95 %, incluso cuando se tiene un donante no emparentado (3,5,9,15,16). Para los casos en que no hay un donante compatible, se viene evaluando experimentalmente la terapia génica como opción terapéutica (1,6).

El presente artículo describe el caso de un paciente con enfermedad granulomatosa crónica ligada al cromosoma X tratado exitosamente con el trasplante de células madre hematopoyéticas para la reconstitución de la función inmunitaria, en lo que constituye la primera experiencia exitosa en este campo en Colombia.

Materiales y métodos

Aspectos éticos

Se revisó la historia clínica y los exámenes de laboratorio del paciente y se obtuvieron muestras de sangre total de él, de sus familiares y de controles sanos que aceptaron participar voluntariamente en el estudio y firmaron el consentimiento informado, de acuerdo con las recomendaciones de la Declaración de Helsinki, el informe de Belmont y la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud, título II, artículo 11.

Evaluación del estallido respiratorio de neutrófilos

Para el diagnóstico inicial de la enfermedad en el paciente recién nacido, se determinó el estallido respiratorio en neutrófilos mediante el examen con nitroazul de tetrazolio (NAT) en placa y siguiendo el procedimiento previamente descrito (17,18). Posteriormente, se usó la técnica de oxidación de la DHR 123 (19), para lo cual se obtuvieron 4 ml de sangre anticoagulada con heparina del paciente, la madre y un control sano, se incubaron en un volumen de 400 µl con solución de lisis de glóbulos rojos (8,3 mg/ml de cloruro de amonio, 0,84 mg/ml de bicarbonato de sodio y 0,5 M de EDTA) a 37 °C durante 5 minutos.

Después de la incubación, se lavaron las células con solución tampón HBSS (GIBCO, Grand Island, NY) y al botón resultante se le agregaron 400 µl de solución tampón HBSS con suplemento de 3,6 µl de DHR 29 mM (Invitrogen, Eugene, OR) y 10 µl de solución de catalasa (5 µg/ml, Sigma, St. Louis, MO), y se incubó nuevamente a 37 °C

durante 5 minutos. Para la activación de los neutrófilos se usaron 10 µl de una solución de PMA de 5 µg/ml (Sigma) y se incubó nuevamente a 37 °C durante 14 minutos. La fluorescencia generada por la oxidación de la DHR 123 se determinó en un citómetro de flujo FACSCanto (Becton Dickinson, BD, San José, CA).

Análisis de mutaciones del gen *CYBB*

Para el análisis de mutaciones del gen *CYBB*, se aplicó inicialmente una estrategia basada en la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de tres segmentos que comprenden el ADN complementario (ADNc) del gen y que, además, facilitan la detección de defectos en el procesamiento alternativo (20).

Brevemente, se obtuvo ARN total de las células mononucleares de sangre periférica mediante el método de TRIzol (Invitrogen) y se hizo la transcripción inversa para generar ADNc empleando el kit ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen). Los fragmentos obtenidos se amplificaron mediante PCR empleando tres pares de cebadores que flanquean los 13 exones del *CYBB*, con el fin de obtener tres fragmentos correspondientes a los exones 1-5 (450 pb), 3-9 (700 pb) y 7-13 (900 pb). Los productos obtenidos se separaron en un gel de agarosa al 1,5 % en solución tampón TBE 1X (tris-borato-EDTA), que luego fue teñido con bromuro de etidio para la visualización de las bandas correspondientes.

Además, se obtuvo ADN genómico (ADNg) a partir de células mononucleares de sangre periférica mediante el método de *salting out*; se hizo su secuenciación y la de los fragmentos obtenidos a partir de la amplificación del ADNg, empleando cebadores específicos para todos los exones y segmentos correspondientes con el método de Sanger (*National Institutes of Health*, USA). Por último, se hizo la hibridación genómica comparativa basada en matrices (HGC), mediante la cual el ADNg del paciente y de un control sano marcan diferentes sondas fluorescentes y se colocan sobre una matriz con cebadores que amplifican todos los exones del *CYBB*. La hibridación de las muestras permite detectar la ganancia o pérdida de material genético (GeneDx, Gaithersburg, MD).

Protocolo del trasplante de células madre hematopoyéticas

El esquema de acondicionamiento de intensidad reducida previo al trasplante, consistió en fludarabina (180 mg/m², dosis total), ciclofosfamida (120

mg/kg, dosis total), timoglobulina (5 mg/kg, dosis total) y radioterapia corporal total (300 cGy). La profilaxis para la enfermedad de injerto contra huésped se hizo con ciclosporina A en dosis de 5 mg/kg/día, la cual se ajustó para mantener sus niveles plasmáticos entre 200 y 400 ng/ml hasta el día 180 después del trasplante. Además, se administró un curso corto con metotrexato en dosis de 5 mg/m² por día (en los días 1, 3, 6 y 11 después del trasplante). Por último, el paciente recibió profilaxis antibacteriana, antifúngica y antiviral con levofloxacina, fluconazol y aciclovir en las dosis estándar, y semanalmente se determinó la antigenemia para citomegalovirus.

Para el trasplante de células madre hematopoyéticas, el paciente recibió 5,25 x 10⁶ células CD34⁺ por kg de un total de 3,5 x 10⁸ células nucleadas por kg procedentes de médula ósea, previamente movilizadas a sangre periférica mediante un tratamiento con filgrastim (10 mg/kg por día) durante tres días. El tiempo de la toma del injerto para los neutrófilos se definió como el primero de tres días consecutivos con un conteo de más de 500 neutrófilos/μl, y para las plaquetas, como el primero de tres días consecutivos con un conteo de 20.000 plaquetas/μl o más, sin necesidad de transfusión. El paciente se monitorizó en varios momentos con el fin de evaluar el funcionamiento del injerto y la producción de especies reactivas del oxígeno en los neutrófilos mediante el ensayo de DHR 123.

Resultados

Caso clínico

El paciente es un niño afrodescendiente de 11 años de edad, nacido en Medellín, Colombia, y producto del segundo embarazo a término de padres no consanguíneos. En los antecedentes familiares se documentó la muerte de su hermano mayor debido a sepsis neonatal por *Enterobacter cloacae* a los 12 días de nacido y de dos primos a los 2 y 30 meses de edad, respectivamente, a causa de múltiples infecciones recurrentes (figura 1, IV:2, IV:5 y IV:6).

Ante la sospecha de segregación de enfermedad granulomatosa crónica ligada al cromosoma X en la familia, se evaluó el estallido respiratorio en neutrófilos de sangre periférica mediante examen de NAT y DHR 123 en la madre del paciente, la tía (madre de los dos primos fallecidos) y la abuela materna. En todos los casos se observó un patrón de 'mosaicismo', con lo cual se determinó que las tres eran portadoras de la enfermedad (no se presentan los datos), y se decidió hacer las pruebas

de NAT y DHR 123 en el paciente inmediatamente después del nacimiento. Los resultados demostraron el defecto completo en el estallido respiratorio y, en consecuencia, se confirmó el diagnóstico de enfermedad granulomatosa crónica ligada al cromosoma X (figura 2a y b).

Después del diagnóstico posnatal se inició la profilaxis antibacteriana y antifúngica, así como la administración de rhlFN-γ (50 μg/m², tres veces a la semana). A pesar de esto, el paciente presentó varias enfermedades infecciosas graves que incluyeron: linfadenitis bacteriana por *B. cepacia* (a los 7 meses), bacteriemia por *Salmonella* spp. y adenitis regional por *Mycobacterium bovis* (a los 58 meses), así como varios abscesos perianales y, a los 7 años, meningitis y sepsis de posible origen gastrointestinal. Aunque en todos los casos recibió tratamientos antimicrobianos apropiados que resultaron en el control y la remisión de sus infecciones, dada su gravedad se planteó hacer el trasplante de células madre hematopoyéticas.

Análisis de mutaciones del CYBB

El análisis de mutaciones del CYBB se hizo con la PCR de tres segmentos a partir del ADNc, pero no se obtuvo amplificación (figura 3a), por lo cual se secuenció el gen a partir del ADNg con resultados similares (no se presentan los datos). Por último, se hizo hibridación genómica comparativa en el ADNg, la cual confirmó una delección completa del CYBB (figura 3b).

Trasplante de células madre hematopoyéticas en el paciente

El trasplante de células madre hematopoyéticas finalmente se pudo hacer cuando el paciente tenía 8 años de edad, empleando células madre hematopoyéticas de su hermano menor. La tipificación del HLA en el paciente mediante PCR con iniciadores de secuencia específica (*Sequence-Specific Primed PCR*, PCR-SSP) empleando el estuche comercial del CTS (*Collaborative Transplant Study*, Heidelberg, Germany), reveló el siguiente resultado para el HLA: A*24,31, B*18,39, DRB1*08,15 DQB*04:02, 06:02, idéntico genéticamente al del donante, y del mismo grupo sanguíneo (B/Rh⁺).

La toma del injerto para neutrófilos se registró en el día 11 y el de plaquetas en el día 10, después del trasplante, con un conteo de 700 neutrófilos/μl y 51.000 plaquetas/μl, respectivamente. En el día 30 después del trasplante se estableció la reconstitución hematológica completa y en el día 34 después del trasplante se hizo la prueba

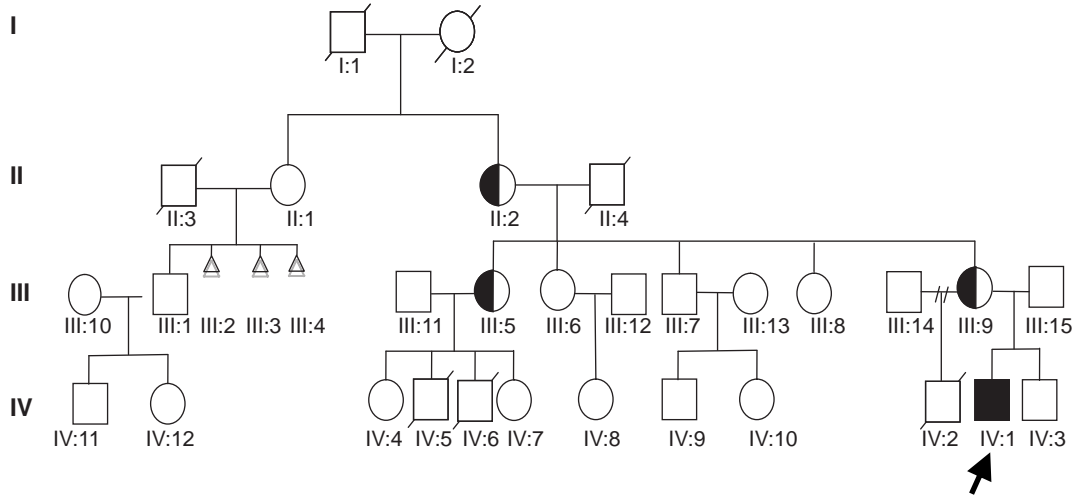


Figura 1. Genograma del paciente con enfermedad granulomatosa crónica ligada al cromosoma X. En esta genealogía se identifican las tres mujeres portadoras de la enfermedad, las cuales fueron diagnosticadas antes del nacimiento del niño del caso índice. También se identifican los dos primos y el hermano del paciente que murieron a temprana edad.

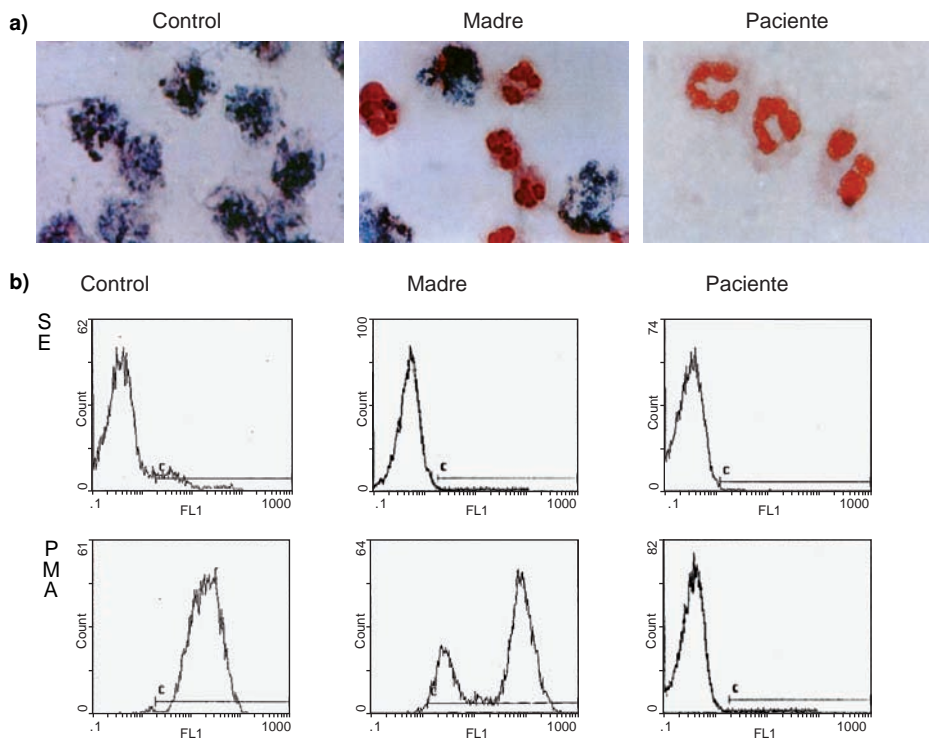


Figura 2. Diagnóstico bioquímico de un paciente con enfermedad granulomatosa crónica. **a)** Reducción del nitroazul de tetrazolio (NAT): las células del paciente no presentaban precipitados de formazán, por lo que no hubo reducción del NAT mientras que la madre presentó ‘mosaicismo’. **b)** Citometría de flujo mediante DHR 123: después de la estimulación con PMA los neutrófilos del paciente no produjeron especies reactivas del oxígeno, mientras que en la madre se evidenciaron dos poblaciones: una que oxidaba la DHR 123 y otra que no lo hacía.

de DHR 123 en la cual se observó que más del 95 % de los neutrófilos de sangre periférica habían producido peróxido de hidrógeno, el cual oxidó la DHR 123 (figura 4a y c). Además, las

mediciones seriadas sucesivas de DHR 123 en los neutrófilos del paciente hasta el día 442 después del trasplante, mostraron que más del 89 % de sus células producían especies reactivas del oxígeno

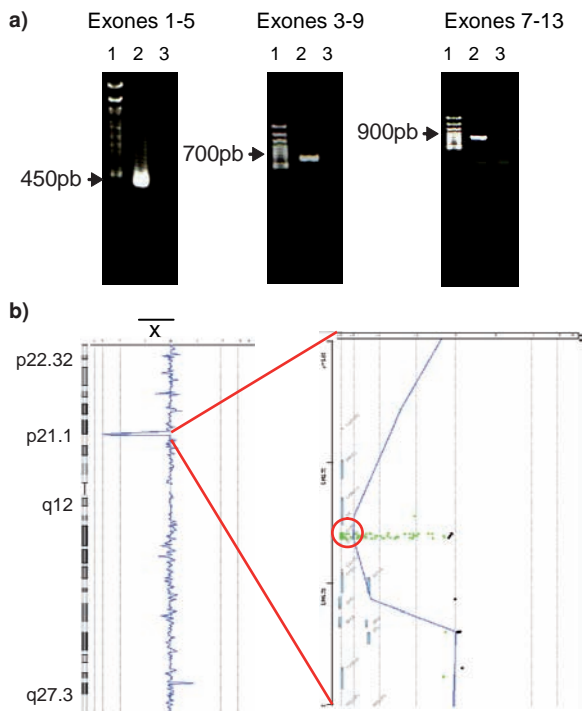


Figura 3. Análisis de mutaciones del gen *CYBB*. **a)** Electroforesis en gel de agarosa para los productos obtenidos de la amplificación de los exones 1-5 (450 pb), de los exones 3-9 (700 pb) y de los exones 7-13 (900 pb) a partir del ADN complementario. Línea 1=100 pb. Línea 2=control sano. Línea 3 = paciente. **b)** Representación gráfica del resultado de la hibridación genómica comparativa en el ADN genómico que muestra el área correspondiente a la delección en Xp21.1. En la gráfica de la izquierda se muestra una representación del cromosoma X; la caída en la intensidad de la señal corresponde a una delección localizada en la posición p21.1. La gráfica de la derecha es una amplificación de la posición p21.1. Los valores negativos (puntos verdes, paciente), corresponden a la pérdida de todos los exones del *CYBB*.

tras la estimulación, lo cual evidenciaba el grado de quimerismo posterior al trasplante (figura 4b). Con base en los resultados de la DHR y lo reportado en la literatura científica, se consideró innecesario determinar el quimerismo a nivel genómico en el paciente (21).

A los cinco meses del trasplante, el paciente presentó candidiasis oral, única manifestación clínica después de este, la cual se trató adecuadamente con nistatina oral. Durante este lapso no hubo reactivación de la infección por citomegalovirus ni enfermedad de injerto contra huésped.

A los 16 meses del trasplante se reinició el esquema de vacunación para hepatitis A, hepatitis B, *Haemophilus influenzae*, tétanos, difteria y *Streptococcus pneumoniae*.

Discusión

La enfermedad granulomatosa crónica es una inmunodeficiencia primaria que resulta en una mayor propensión a presentar enfermedades infecciosas de forma recurrente, que a menudo

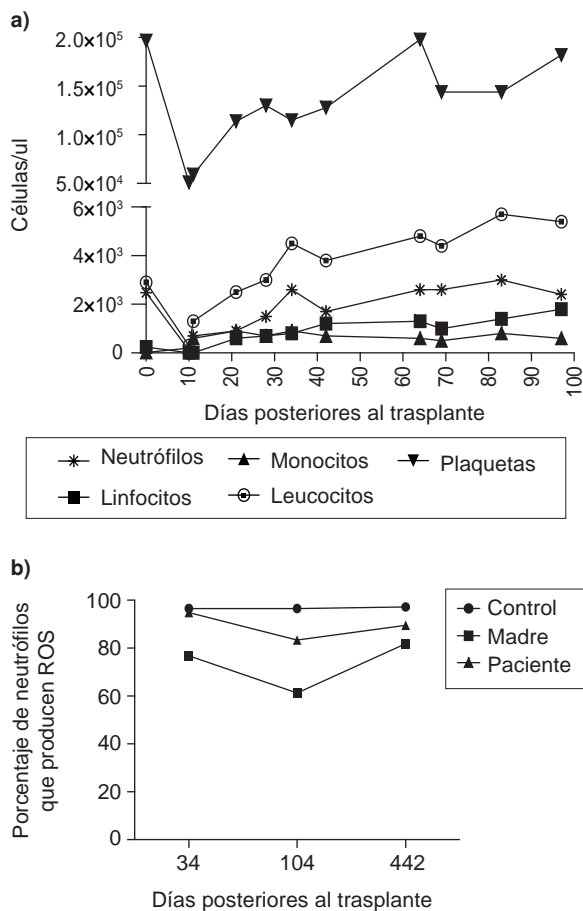


Figura 4. Reconstitución inmunológica posterior al trasplante **a)** Los datos indican el conteo de leucocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos y plaquetas desde el día 0 hasta el día 97 después del trasplante. **b)** Se muestra el porcentaje (%) de neutrófilos que produjeron especies reactivas del oxígeno después de la estimulación con acetato de forbol miristato (PMA). Después del trasplante los neutrófilos del paciente recuperaron la producción de especies reactivas del oxígeno. **c)** Se muestra el índice de estimulación de los neutrófilos que reaccionaron con el tratamiento con PMA. El índice de estimulación corresponde a la media geométrica de la intensidad media de fluorescencia de las células estimuladas con PMA sobre la media geométrica de la intensidad media de fluorescencia de las células no estimuladas.

revisten gravedad y están asociadas a complicaciones potencialmente fatales. A pesar de la profilaxis, el paciente comenzó a presentar infecciones desde los siete meses de edad, hasta que finalmente desarrolló meningitis y sepsis a los siete años, lo cual obligó a considerar la posibilidad de un trasplante de células madre hematopoyéticas ante el riesgo creciente de infecciones que amenazaban su vida.

El gen responsable de la enfermedad granulomatosa crónica ligada al cromosoma X es el *CYBB*, que se localiza en el brazo corto del cromosoma X (Xp21.1) y está compuesto de 13 exones que codifican para una proteína de transmembrana denominada gp91^{phox} (22). Cerca de 70 % de los casos de esta enfermedad se deben a mutaciones en el *CYBB* asociadas a la región promotora (0,7 %), a pequeñas deleciones o inserciones (2,8 %), a inserciones (7,9 %), a mutaciones que afectan el procesamiento alternativo (17,6 %), a deleciones (35,6 %) y a mutaciones con cambio de sentido o sin este (35,4 %) (23).

En este caso, el paciente presentaba una deleción que involucraba todo el contexto genómico del *CYBB*. Aproximadamente, el 10 % de los pacientes con la enfermedad presentan grandes deleciones que afectan uno o más exones del gen, e incluso estas pueden abarcar genes contiguos como el *XK* (síndrome de McLeod), el *OTC* (transcarbamilasa de ornitina), el *DMD* (distrofia muscular de Duchenne) y el *RP* (retinitis pigmentosa), entre otros (23,24). En el presente estudio no se pudieron establecer los puntos de quiebre 5' y 3' de la deleción, por lo tanto, no fue posible establecer el rango de genes afectados, incluidos los ya mencionados. No obstante, el paciente no presentó manifestaciones clínicas asociadas a ninguno de estos síndromes.

Los tratamientos antimicrobianos profilácticos de la enfermedad granulomatosa crónica incluyen antibióticos, antifúngicos, rhIFN γ y esteroides en ciclos cortos, así como el manejo quirúrgico para algunas complicaciones como los abscesos. Sin embargo, estos solo reducen la frecuencia y la gravedad de las enfermedades infecciosas a las que son propensos quienes padecen la enfermedad, y que, indefectiblemente, afectan su calidad de vida e, incluso, causan la muerte (25). De hecho, con el tratamiento médico solo 50 % de los pacientes llegan a los 30 años de edad (26,27).

El trasplante de células madre hematopoyéticas es una opción de tratamiento para los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica; sin embargo,

no es frecuente recurrir a ella debido a la mortalidad y la morbilidad asociadas al procedimiento (3). El trasplante con un donante haploidéntico aumenta la posibilidad de la falla del injerto y retrasa la reconstitución inmunológica; sin embargo, si hay un donante emparentado con HLA idéntico, la supervivencia del injerto mejora hasta en el 90 % (26). Además, el uso de tratamientos de acondicionamiento como el de intensidad reducida ha logrado disminuir los riesgos asociados al trasplante, incluso en aquellos con donantes no emparentados (3).

En un estudio prospectivo realizado por Güngör, *et al.*, se evaluó el efecto de un tratamiento de acondicionamiento de intensidad reducida en 56 pacientes con enfermedad granulomatosa crónica a quienes se les había hecho un trasplante de células madre hematopoyéticas. En 21 de los pacientes el trasplante se hizo con donante emparentado y, en 35, con donante no emparentado, y bajo este esquema solo 5 % de los pacientes presentó una falla del injerto, en tanto que la enfermedad de injerto contra huésped aguda de grado II-IV o de grado III-IV se presentó en 11 y 4 % de los pacientes, respectivamente. Debe anotarse que en todos estos casos se trataba de pacientes a quienes se les había hecho el trasplante con donante no emparentado. Por último, la supervivencia total fue de 93 % a los 21 meses de seguimiento y los autores concluyeron que el tratamiento de acondicionamiento de intensidad reducida era seguro y de baja toxicidad orgánica para los pacientes (28). Por el contrario, los tratamientos de acondicionamiento mieloablativo se han asociado con una toxicidad orgánica grave, particularmente cuando el receptor presenta enfermedad inflamatoria o infección (28). El paciente de este estudio recibió un tratamiento de acondicionamiento de intensidad reducida y no presentó infecciones ni enfermedad de injerto contra huésped o toxicidad orgánica.

El paciente fue diagnosticado en el momento del nacimiento con enfermedad granulomatosa crónica ligada al cromosoma X, y solo a los ocho años de edad, después de haber sufrido infecciones graves y recurrentes potencialmente fatales, se consideró el trasplante de células madre hematopoyéticas. En el estudio de Ahlin, *et al.*, se comparó la terapia convencional y el trasplante de células madre hematopoyéticas en un grupo de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, y se encontró que 53 % de aquellos que habían recibido la terapia convencional, murieron como consecuencia de complicaciones de la enfermedad, mientras que 92 %

de aquellos con la misma enfermedad ligada al cromosoma X o autosómica recesiva que recibieron trasplante de células madre hematopoyéticas con donantes emparentados y no emparentados, sobrevivieron al procedimiento después de 7,7 años de seguimiento en promedio.

Esto sugiere que no solo los pacientes con formas graves de la enfermedad granulomatosa crónica deben recibir trasplante, sino todos los que padezcan la enfermedad y tengan hermanos con un sistema HLA idéntico o donantes compatibles no emparentados. Esta opción de tratamiento debe ofrecerse lo más pronto posible, antes de que se presenten infecciones graves, enfermedad inflamatoria u otras complicaciones potencialmente fatales (29). Asimismo, los pacientes con esta enfermedad que reciben un trasplante de células madre hematopoyéticas tienen una calidad de vida comparable a la reportada en niños sanos, mientras que los que reciben tratamiento convencional presentan menor calidad de vida (27).

A pesar del retraso del trasplante en el caso de este paciente, hoy, a los tres años del procedimiento, su condición general es buena y ha recuperado completamente la función inmunitaria. Su última DHR 123 en el día 442 después del trasplante, demostró que más del 89 % de las células (figura 4b) producían especies reactivas del oxígeno en niveles comparables a los de individuos sanos. En la enfermedad granulomatosa crónica no se considera necesario el quimerismo completo del sistema hematopoyético en el receptor para mejorar la condición clínica. Hay evidencia que sugiere que, aproximadamente, con 10 % de los neutrófilos normales hay mejoría significativa de la enfermedad y un efecto positivo en la supervivencia (21,30). A lo largo de este estudio se hicieron varias pruebas de DHR 123 para determinar el estado del quimerismo del paciente, cuyos resultados cuantitativos, como lo demostraron Kim, *et al.*, se correlacionan con el estado del quimerismo observado en los análisis de la PCR de repeticiones cortas en tándem (21).

Por último, los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica son propensos a contraer un amplio espectro de infecciones bacterianas y fúngicas potencialmente fatales desde edades muy tempranas, y dado que las manifestaciones clínicas son muy variadas, es difícil clasificar el riesgo de infecciones o mortalidad en un paciente determinado. Aunque la profilaxis antimicrobiana disminuye el riesgo de infecciones, es necesario considerar el trasplante de células madre

hematopoyéticas como una alternativa viable que puede curar la enfermedad, con el fin de disminuir las tasas de morbimortalidad asociadas a esta enfermedad.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Claudia Trujillo por la revisión crítica del manuscrito.

Conflicto de intereses

Los autores de este artículo manifestamos que no tenemos conflicto de intereses con respecto a la información aquí suministrada.

Financiación

Este trabajo fue financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias (Proyecto 111554531412) y por la Universidad de Antioquia.

Referencias

1. **Segger RA.** Chronic granulomatous disease: Recent advances in pathophysiology and treatment. *Neth J Med.* 2010;68:334-40.
2. **Rosenzweig SD.** Chronic granulomatous disease: Complications and management. *Expert Rev Clin Immunol.* 2009;5:45-53. <http://dx.doi.org/10.1586/1744666X.5.1.45>
3. **Kang EM, Marciano BE, DeRavin S, Zarembek KA, Holland SM, Malech HL.** Chronic granulomatous disease: Overview and hematopoietic stem cell transplantation. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127:1319-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2011.03.028>
4. **Notarangelo LD.** The long road to optimal management for chronic granulomatous disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132:1164-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.08.035>
5. **Holland SM.** Chronic granulomatous disease. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2013;27:89-99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2012.11.002>
6. **Segal BH, Veys P, Malech H, Cowan MJ.** Chronic granulomatous disease: Lessons from a rare disorder. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011;17:S123-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.09.008>
7. **Agudelo-Flórez P, Prando-Andrade CC, López JA, Costa-Carvalho BT, Quezada A, Espinosa FJ, et al.** Chronic granulomatous disease in Latin American patients: Clinical spectrum and molecular genetics. *Pediatr Blood Cancer.* 2006;46:243-52. <http://dx.doi.org/10.1002/pbc.20455>
8. **Parikh SH, Szabolcs P, Prasad VK, Lakshminarayanan S, Martin PL, Driscoll TA, et al.** Correction of chronic granulomatous disease after second unrelated-donor umbilical cord blood transplantation. *Pediatr Blood Cancer.* 2007;49:982-4. <http://dx.doi.org/10.1002/pbc.21365>
9. **Segger RA, Gungor T, Belohradsky BH, Blanche S, Bordignon P, Di Bartolomeo P, et al.** Treatment of chronic granulomatous disease with myeloablative conditioning and an unmodified hemopoietic allograft: A survey of the European experience, 1985-2000. *Blood.* 2002;100:4344-50. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-02-0583>

10. **Kuhns DB, Alvord WG, Heller T, Feld JJ, Pike KM, Marciano BE, *et al.*** Residual NADPH oxidase and survival in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med.* 2010;363:2600-10. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1007097>
11. **Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA.** Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet.* 1968;2:1366-9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(68\)92673-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(68)92673-1)
12. **Bach FH, Albertini RJ, Joo P, Anderson JL, Bortin MM.** Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet.* 1968;2:1364-6. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(68\)92672-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(68)92672-X)
13. **Cant A, Slatter M, Battersby A.** Advances in management of primary immunodeficiency. *Paediatr Child Health.* 2013; 115-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.paed.2013.02.001>
14. **Filipovich A.** Hematopoietic cell transplantation for correction of primary immunodeficiencies. *Bone Marrow Transplant.* 2008;42:S49-52. <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2008.121>
15. **Slatter MA, Cant AJ.** Hematopoietic stem cell transplantation for primary immunodeficiency diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1238:122-31. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06243.x>
16. **Goussetis E, Konialis CP, Peristeri I, Kitra V, Dimopoulou M, Petropoulou T, *et al.*** Successful hematopoietic stem cell transplantation in 2 children with X-linked chronic granulomatous disease from their unaffected HLA-identical siblings selected using preimplantation genetic diagnosis combined with HLA typing. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16:344-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2009.10.010>
17. **Agudelo-Flórez P, Navarro S, Luttgés P, López JA, Norambuena X, Navarrete SC, *et al.*** Report of a new mutation in CYBB gene in two patients with X linked chronic granulomatous disease. *Rev Med Chil.* 2006;134:965-72. <http://dx.doi.org/S0034-98872006000800004>
18. **López JA, Vélez G, Mendivil M.** Caracterización clínica y genético-molecular de un paciente con enfermedad granulomatosa crónica ligada al X. Reporte de una nueva mutación asociada al splicing. Caso clínico. *Rev Chil Pediatr.* 2014;85:213-21. <http://dx.doi.org/10.4067/S0370-41062014000200012>
19. **Rojas-Restrepo J, Álvarez-Álvarez J, Montoya-Giraldo J, Trujillo-Vargas C.** Validación de la técnica de dihidrorodamina 123 para el diagnóstico de la enfermedad granulomatosa crónica en Colombia. *Inmunología.* 2014;33:71-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.inmuno.2014.03.001>
20. **Agudelo-Flórez P, López JA, Redher J, Carneiro-Sampaio MM, Costa-Carvalho BT, Grumach AS, *et al.*** The use of reverse transcription-PCR for the diagnosis of X-linked chronic granulomatous disease. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37:625-34. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2004000500001>
21. **Kim HY, Kim HJ, Ki CS, Kim DW, Yoo KH, Kang ES.** Rapid determination of chimerism status using dihydrorhodamine assay in a patient with X-linked chronic granulomatous disease following hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Lab Med.* 2013;33:288-92. <http://dx.doi.org/10.3343/alm.2013.33.4.288>
22. **Jirapongsananuruk O, Niemela JE, Malech HL, Fleisher TA.** CYBB mutation analysis in X-linked chronic granulomatous disease. *Clin Immunol.* 2002;104:73-6. <http://dx.doi.org/10.1006/clim.2002.5230>
23. **Roos D, Kuhns DB, Maddalena A, Roesler J, López JA, Ariga T, *et al.*** Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (third update). *Blood Cells Mol Dis.* 2010;45:246-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2010.07.012>
24. **Arai T, Oh-ishi T, Yamamoto H, Nunoi H, Kamizono J, Uehara M, *et al.*** Copy number variations due to large genomic deletion in X-linked chronic granulomatous disease. *PloS One.* 2012;7:e27782. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0027782>
25. **van den Berg JM, van Koppen E, Ahlin A, Belohradsky BH, Bernatowska E, Corbeel L, *et al.*** Chronic granulomatous disease: The European experience. *PloS One.* 2009;4:e5234. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005234>
26. **Gozdzik J, Pituch-Noworolska A, Skoczen S, Czogala W, Wedrychowicz A, Baran J, *et al.*** Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation as therapy for chronic granulomatous disease--single centre experience. *J Clin Immunol.* 2011;31:332-7. <http://dx.doi.org/10.1007/s10875-011-9513-y>
27. **Cole T, McKendrick F, Titman P, Cant AJ, Pearce MS, Cale CM, *et al.*** Health related quality of life and emotional health in children with chronic granulomatous disease: A comparison of those managed conservatively with those that have undergone haematopoietic stem cell transplant. *J Clin Immunol.* 2013;33:8-13. <http://dx.doi.org/10.1007/s10875-012-9758-0>
28. **Gungor T, Teira P, Slatter M, Stussi G, Stepensky P, Moshous D, *et al.*** Reduced-intensity conditioning and HLA-matched haemopoietic stem-cell transplantation in patients with chronic granulomatous disease: A prospective multicentre study. *Lancet.* 2014;383:436-48. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62069-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62069-3)
29. **Ahlin A, Fugelang J, de Boer M, Ringden O, Fath A, Winiarski J.** Chronic granulomatous disease-haematopoietic stem cell transplantation versus conventional treatment. *Acta Paediatr.* 2013;102:1087-94. <http://dx.doi.org/10.1111/apa.12384>
30. **Abraham RS.** Relevance of laboratory testing for the diagnosis of primary immunodeficiencies: A review of case-based examples of selected immunodeficiencies. *Clin Mol Allergy.* 2011;9:6. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-7961-9>

ARTÍCULO ORIGINAL

La lipocalina asociada con la gelatinasa de neutrófilos como factor temprano de predicción de la función retardada del injerto renal

John Fredy Nieto-Ríos¹, Lina María Serna-Higuaita¹, Catalina Ocampo-Kohn¹, Arbey Aristizábal-Alzate¹, Catalina Vélez-Echeverry¹, Juan José Vanegas-Ruiz¹, Ana María Bedoya², Sandra Lucía Lopera², Nury Rojano-Held¹, Nelson Darío Giraldo³, Gustavo Adolfo Zuluaga-Valencia¹

¹ Grupo de Nefrología y Trasplante Renal, Hospital Pablo Tobón Uribe, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Laboratorio Clínico, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia

³ Cuidado Crítico, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia

Introducción. La función retardada del injerto renal se presenta en 20 a 50 % de los trasplantes renales. **Objetivo.** Describir el comportamiento de la lipocalina urinaria asociada a la gelatinasa de neutrófilos en receptores de trasplante renal de donante fallecido y compararlo con el porcentaje de descenso de la creatinina sérica para detectar tempranamente la función retardada del injerto renal.

Materiales y métodos. Se evaluaron los niveles de lipocalina urinaria asociada a la gelatinasa de neutrófilos en una cohorte prospectiva 1, 12, 24 y 48 horas después del trasplante renal, y se compararon diariamente con los de la creatinina sérica hasta el quinto día del trasplante.

Resultados. Se incluyeron en el estudio 79 pacientes con trasplante renal de donante fallecido. La función retardada del injerto renal se presentó en 13 pacientes (16,5 %) y cinco de ellos (6,3 %) necesitaron diálisis en la primera semana. Los valores de lipocalina urinaria asociada a la gelatinasa de neutrófilos en todos los puntos de corte fueron mayores en los pacientes con función retardada del injerto renal ($p=0,526$, $p=0,049$, $p=0,032$ y $p=0,001$, respectivamente). Se estableció un valor de más de 120 ng/ml a las 48 horas como factor de predicción de la función retardada del injerto, con una sensibilidad de 75 % y una especificidad de 71 %; el valor de creatinina sérica que mejor discriminó la función retardada se presentó a las 48 horas (59,5 %), con una sensibilidad de 92 % y una especificidad de 83 %. En la regresión logística los únicos valores significativos para predecir la función retardada del injerto renal fueron los de la creatinina sérica.

Conclusión. Los niveles de lipocalina urinaria asociada a la gelatinasa de neutrófilos a las 48 horas del trasplante renal predijeron la función retardada, incluida la necesidad de diálisis, pero no fueron superiores a los de la creatinina sérica para la detección temprana.

Palabras clave: trasplante de riñón, funcionamiento retardado del injerto, creatinina, lesión renal aguda, donantes de tejidos.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2703>

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early predictor of delayed graft function

Introduction: Delayed graft function occurs in about 20 to 50 percent of kidney transplants.

Objective: To describe the behavior of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGALu) in deceased-donor renal transplant recipients and to compare this indicator with the percentage of creatinine decrease (PdC) for the early detection of delayed graft function.

Materials and methods: NGALu levels were evaluated in a prospective cohort in the first, 12th, 24th and 48th hours after kidney transplant, and compared with the daily PdC until day 5.

Results: We included 79 patients in the study. Delayed graft function occurred in 13 patients (16.5%), and five patients (6.3%) required dialysis in the first week. NGALu levels at all cut-off points were higher in patients with delayed graft function ($p=0.526$, $p=0.049$, $p=0.032$, and $p=0.001$). NGALu levels above 120 ng/ml at 48 hours predicted delayed graft function with a sensitivity of 75% and a

Contribución de los autores:

John Fredy Nieto-Ríos y Lina María Serna-Higuaita: concepción y diseño del estudio, análisis e interpretación de los datos, redacción y revisión del artículo

John Fredy Nieto-Ríos, Lina María Serna-Higuaita, Catalina Ocampo-Kohn, Arbey Aristizábal-Alzate, Catalina Vélez-Echeverry, Juan José Vanegas-Ruiz, Nury Rojano-Held, Gustavo Adolfo Zuluaga-Valencia: reclutamiento y seguimiento de los pacientes

Ana María Bedoya y Sandra Lucía Lopera: procesamiento de las muestras de laboratorio

Lina María Serna-Higuaita, Nury Rojano-Held y Nelson Darío Giraldo: análisis estadístico de los datos

Todos los autores aprobaron la versión final del manuscrito.

specificity of 71%. A PdC of 59.5% best discriminated the delayed graft function, with a sensitivity of 92% and a specificity of 83% at 48 hours. Using logistic regression for the adjusted delayed graft function, the only significant values to predict it were those of PdC.

Conclusions: NGALu levels measured at 48 hours after renal transplantation predicted delayed graft function, including the need for dialysis; however, this marker was not superior to the PdC for early detection.

Key words: Kidney transplant, delayed graft function, creatinine, acute kidney injury, tissue donors.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2703>

La función retardada del injerto renal (1-4) es una complicación que se presenta en 20 a 50 % de los trasplantes de riñón de donante fallecido (5,6). Se le considera una lesión por isquemia y reperfusión (5) cuyos mecanismos fisiopatológicos involucran el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la activación inmunológica (7), lo que no permite la recuperación completa de las células renales, predispone a la atrofia y la muerte celular (8), aumenta el riesgo de rechazo agudo y crónico (3) y la estancia hospitalaria, y reduce la supervivencia del injerto renal (3,6,9-12).

Aunque en la actualidad se sabe mucho sobre la fisiopatología de la función retardada del injerto, son pocas las estrategias de tratamiento conocidas (6); algunos tratamientos exitosos de la lesión por reperfusión en modelos animales no han sido efectivos en humanos (5,12), lo cual se explicaría por la detección tardía de la función retardada del injerto (8), ya que los biomarcadores actuales, que incluyen la creatinina sérica y la diuresis, son poco sensibles para predecirla (11,13). El hallazgo de nuevos biomarcadores que detecten en forma no invasiva y temprana la función retardada del injerto, permitiría la implementación de tratamientos para limitar el daño (3,6,14,15) y mejorar el resultado a largo plazo del injerto renal (8,16).

Uno de los biomarcadores más opcionados es la lipocalina urinaria asociada a la gelatinasa de neutrófilos (LAGN urinaria) (17,18), la cual es producida principalmente por los neutrófilos y las células del epitelio tubular renal (18). En algunos estudios en pacientes con trasplante de riñón se ha sugerido que la LAGN urinaria podría ser superior a la creatinina para la detección temprana de la función retardada del injerto, ya que su elevación puede registrarse dos horas después del trasplante renal (3,5,6,8,14,19,20).

Correspondencia:

Lina María Serna, Calle 78b N° 69-240, Medellín, Colombia

Teléfono: (574) 445 9902

lm.serna@hotmail.com

Recibido: 06/02/15; aceptado: 09/09/15

En el Hospital Pablo Tobón Uribe predominan los trasplantes de donante fallecido, grupo en el que la frecuencia de la función retardada del injerto es mayor (5,6). Por este motivo se necesitan marcadores que permitan su detección temprana. Este estudio tuvo como objetivo determinar si los valores de la LAGN urinaria predecían la función retardada del injerto más tempranamente que el porcentaje de descenso de la creatinina sérica.

Materiales y métodos

Se hizo un estudio prospectivo de cohorte en el Hospital Pablo Tobón Uribe, institución de alto nivel de complejidad en Medellín, Colombia; se incluyeron pacientes mayores de 12 años que habían recibido un trasplante renal de donante fallecido entre noviembre de 2012 y diciembre de 2013. Se excluyeron los pacientes que presentaron anuria durante las primeras seis horas después del trasplante.

Se recopilaron los datos de edad, sexo, causa de la enfermedad renal terminal, número de incompatibilidades del sistema de antígenos leucocitarios humanos (*Human Leukocyte Antigen*, HLA), tiempo de isquemia fría y caliente, transfusiones y trasplantes previos, uso de terapia dialítica previa al trasplante, inmunosupresión utilizada (inducción y mantenimiento) y calidad del donante (si cumplían los criterios extendidos o no lo hacían).

Se recolectaron muestras de orina para la medición de la LAGN urinaria 1, 12, 24 y 48 horas después del trasplante. Estas muestras se procesaron en el laboratorio del hospital de la siguiente forma: se centrifugaron a 400 revoluciones por minutos durante cinco minutos y se almacenaron a menos de 70 °C durante un máximo de tres meses hasta su procesamiento. La determinación de la LAGN urinaria se hizo mediante inmunoensayo turbidimétrico (Sentinel Diagnostics, REF 1P9300) sobre la plataforma Architect i8000® de Abbott. Los niveles de creatinina sérica se registraron diariamente antes y después del trasplante.

El resultado evaluado fue la presencia o ausencia de la función retardada de injerto, definida como una disminución de la creatinina sérica menor de 10 %

durante tres días consecutivos (1), la necesidad de diálisis en la primera semana del trasplante renal (1,3) o un nivel de creatinina sérica mayor de 3 mg/dl al quinto día del trasplante (1).

Se describieron las características demográficas según la presencia o ausencia de la función retardada del injerto. Se hizo una descripción estadística utilizando medias y desviación estándar o medianas y rangos intercuartílicos, de acuerdo con la distribución de los datos evaluados mediante la prueba de Shapiro Wills; las variables continuas se analizaron con base en la diferencia de medias o la prueba U de Mann-Withney y las variables categóricas se compararon con la prueba de ji al cuadrado o la de Fisher. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando arrojaron un valor de $p < 0,05$.

Se evaluaron los valores de la LAGN urinaria agrupados según la presencia o ausencia de la función retardada del injerto y, por último, se determinó el mejor punto de corte y el tiempo óptimo para ambos marcadores. Para el diagnóstico de la función retardada del injerto, se evaluó la curva de la característica operativa del receptor (*Receiving Operating Characteristic*, ROC) de la LAGN urinaria y se comparó con el porcentaje de descenso de la creatinina sérica, el cual se estableció tomando como valor inicial el registrado en el momento del trasplante.

Se utilizó un modelo de regresión logística en el que la variable dependiente fue la presencia de la función retardada del injerto, y las variables independientes fueron los valores de la LAGN urinaria y el porcentaje de descenso de la creatinina sérica. Se ajustaron algunas variables de confusión encontradas en la literatura científica y se ingresaron al modelo las variables con $p < 0,25$ en el análisis bivariado. Se verificaron los supuestos de homocedasticidad, normalidad e independencia de los residuales y se utilizó la prueba de Wald para evaluar la significación estadística del modelo de regresión logística. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Stata®.

Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigaciones del Hospital Pablo Tobón Uribe.

Resultados

Entre noviembre de 2012 y diciembre de 2013 se hicieron 83 trasplantes renales en el Hospital Pablo Tobón Uribe. Dos pacientes fueron excluidos por anuria en las primeras horas y otros dos por

ser menores de 12 años, es decir, quedaron 79 pacientes para el análisis. Todos los trasplantes fueron de donante fallecido, pero ninguno de criterio extendido; 44 pacientes eran hombres (55,7 %), la media de la edad fue de 39,6 años con una desviación estándar (DE) de 14,18; se trataba del primer trasplante en 91,1 % de los casos y del segundo en 8,9 %; 82,3 % de los pacientes estaba en diálisis antes del trasplante, con una mediana de 23,5 meses (25-75:4-48); 51,9 % había recibido transfusiones previas y la media del tiempo de isquemia fría fue de 15,04 horas (DE \pm 5,84).

La función retardada del injerto se presentó en 13 pacientes (16,5 %) y cinco de ellos (6,3 %) necesitaron diálisis en la primera semana. Las características demográficas agrupadas con base en la presencia o la ausencia de dicha función, se muestran en el cuadro 1.

Al evaluar los valores de la LAGN urinaria agrupados según la presencia o la ausencia de la función retardada del injerto, se encontró que en todos los puntos de corte dichos valores fueron mayores en los pacientes con función retardada, y alcanzaron la significación estadística a las 24 y 48 horas del trasplante renal ($p=0,031$ y $p=0,001$, respectivamente) (figura 1).

Según la prueba de diferencias de las medias, los valores de la LAGN urinaria agrupados con base en la presencia o la ausencia de la función retardada del injerto renal fueron los siguientes: a la hora del trasplante, $p=0,526$; a las 12 horas, $p=0,049$; a las 24 horas, $p=0,032$, y a las 48 horas, $p=0,001$.

Se buscó establecer el mejor punto de corte para predecir la función retardada del injerto, y se encontró que un valor de LAGN de más de 120 ng/ml a las 48 horas la predecía con una sensibilidad de 75 % y una especificidad de 70 % (área bajo la curva de 0,798). El porcentaje de descenso de la creatinina sérica que mejor discriminó la función retardada del injerto fue de 59,5 % a las 48 horas, con una sensibilidad de 92 % y una especificidad de 83 % (área bajo la curva de 0,925). Al comparar las curvas ROC de la LAGN urinaria y el porcentaje de descenso de la creatinina sérica, este último fue un mejor marcador (figura 2).

Los puntos de corte escogidos para categorizar la LAGN urinaria y el porcentaje de descenso de la creatinina sérica a las 48 horas del trasplante renal, fueron de 120 ng/ml y 59,5 %, respectivamente. Al evaluar la razón de probabilidades (*odds ratio*,

Cuadro 1. Análisis bivariado agrupado según la presencia o ausencia de la función retardada del injerto renal

Variable	FRI (n=13)	FAI (n=66)	p**
Sexo (número y porcentaje de hombres)	9 (69,2)	35 (53)	0,28 (a)
Edad en años en el momento del trasplante, media (DE)	38,6 (\pm 13,8)	39,7 (\pm 14,3)	0,78 (d)
Antecedentes de transfusiones previas, n (%)	6 (46,1)	34 (51,5)	0,88 (a)
Segundo trasplante, n (%)	2 (15,4)	5 (7,6)	0,32 (b)
Diálisis previa, n (%)*	12 (92,3)	53 (80,3)	0,44 (b)
Edad en años del donante, mediana (RIQ)	27 (24-42)	26 (19-41)	0,51 (c)
Tres o menos incompatibilidades en el HLA, n (%)	1 (6,67)	14 (93,3)	0,27 (b)
Cuatro o más incompatibilidades en el HLA, n (%)	11 (17,5)	52 (82,5)	0,27 (b)
Creatinina del donante, mediana (RIQ)	0,8 (0,68-0,96)	0,8 (0,6-1,1)	0,70 (c)
Tiempo de isquemia fría en horas, media (DE)	18,2 (6,7)	14,4 (5,49)	0,03 (d)
Tiempo en minutos de isquemia caliente, mediana (RIQ)	30 (30-28,75)	30 (30-36,2)	0,97 (c)
Inducción con basiliximab, n (%)	4 (30,8)	21 (31,8)	0,61 (b)
Inducción con timoglobulina, n (%)	9 (69,2)	45 (68,2)	0,61 (b)

FRI: función retardada del injerto renal; FAI: función adecuada del injerto renal; DE: desviación estándar; RIQ: rango intercuartílico; HLA: complejo mayor de histocompatibilidad. * Antecedentes de terapia de reemplazo renal antes del trasplante. **El análisis bivariado se hizo con las siguientes pruebas estadísticas: (a) ji al cuadrado, (b) test de Fisher, (c) prueba U de Mann-Whitney, (d) t de Student.

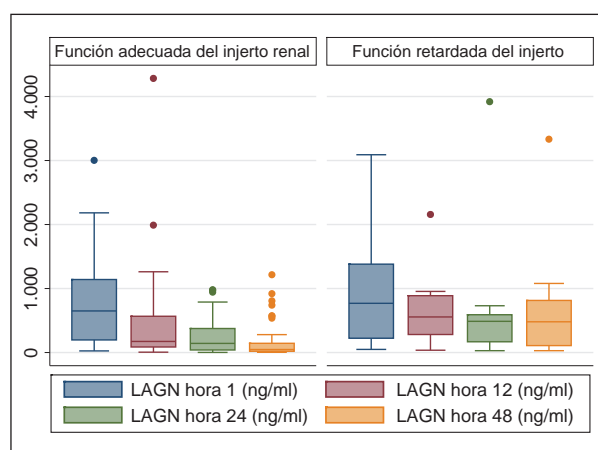


Figura 1. Valores de lipocalina urinaria asociada a la gelatinasa de neutrófilos después del trasplante renal, agrupados según la presencia o ausencia de la función retardada del injerto renal

OR) de ambos puntos de corte, la correspondiente a tener un valor positivo de LAGN urinaria para la función retardada del injerto fue de 5,25 (IC_{95%} 1,55-17,81) y la de tener un porcentaje de descenso de la creatinina sérica positivo fue de 27,5 (IC_{95%} 3,79-199,75).

Se hizo un análisis de regresión logística exploratorio ajustado según el número de trasplantes y el tiempo de isquemia fría, en el cual el porcentaje de descenso de la creatinina sérica fue el único valor significativo para predecir la función retardada del injerto (cuadro 2).

Discusión

En este estudio se evaluaron los valores de la LAGN urinaria de una cohorte prospectiva de pacientes con trasplante renal de donantes fallecidos que no

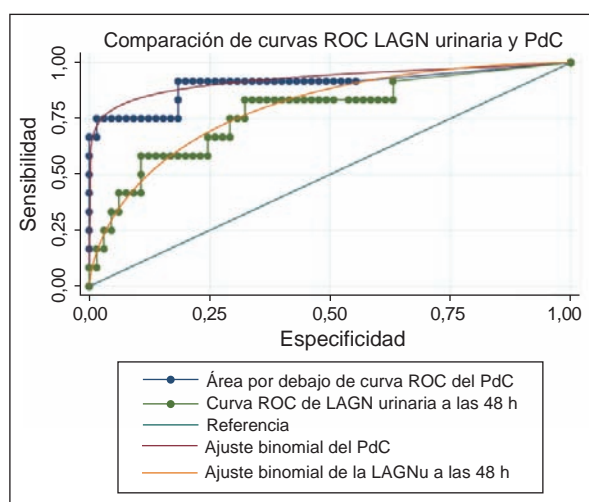


Figura 2. Curvas ROC de la comparación entre la lipocalina urinaria asociada a la gelatinasa de neutrófilos y el porcentaje de depuración de la creatinina sérica

PdC: porcentaje de depuración de la creatinina sérica; LAGNu: lipocalina urinaria asociada a la gelatinasa de neutrófilos

respondían al criterio extendido. Se encontró que el valor de la LAGN urinaria medido a las 48 horas del trasplante predecía la función retardada del injerto; sin embargo, al compararlo con el porcentaje de descenso de la creatinina sérica, este detectó con mayor exactitud el riesgo de dicho retardo, hallazgo similar al de estudios como el de Kaufeld, *et al.*, quienes evaluaron 105 pacientes con trasplante renal cuyos niveles de LAGN urinaria fueron dos veces más altos en aquellos con lesión renal que en los que no la presentaron. En este estudio, sin embargo, muchos valores se cruzaron entre los dos grupos y a los seis meses no se encontraron diferencias (21,22).

Cuadro 2. Regresión logística para detectar la presencia de la función retardada del injerto renal

Variable FRI	OR	Error estándar	p	IC _{95%}
LAGNu	0,622	0,589	0,616	0,111-0,700
PdC	0,016	0,02	0,001	0,001-0,218
Número de trasplantes	1,157	0,88	0,054	0,997-1,343
Tiempo de isquemia fría	0,437	0,51	0,483	0,043-4,406
Constante	0,251	0,46	0,45	0,007-9,115

Logaritmo de verosimilitud=-20,2234; pseudo R²=0,39

FRI: función retardada del injerto renal; OR: razón de momios; LAGNu: lipocalina urinaria asociada a la gelatinasa de neutrófilos; PdC: porcentaje de depuración de la creatinina sérica

La LAGN es una proteína de 25 kDa (23) conformada por ocho cadenas beta con capacidad de transportar pequeñas moléculas. La LAGN es producida principalmente por los neutrófilos y por las células del epitelio tubular renal (18). En estudios recientes se han encontrado diferentes clases de esta proteína: una forma monomérica de 25 kDa, un homodímero de 45 kDa y un heterodímero de 135 kDa; los neutrófilos producen el homodímero y las células tubulares renales producen los heterodímeros y monómeros (23,24). Los niveles de LAGN urinaria están compuestos por la proteína secretada por las células tubulares renales, pero también, por la producida por los neutrófilos filtrados al riñón (24). La función retardada del injerto es una lesión por 'injuría' y reperfusión, y por este motivo, la LAGN se ha postulado como una herramienta no invasiva para su detección, pues su relación con la función retardada del injerto puede registrarse incluso una hora después de la reperfusión (2,6,10,25,26), en tanto que la creatinina se demora entre uno y tres días en alterarse (2).

Entre las funciones de la LAGN se han encontrado el transporte de hierro (5), la regulación del crecimiento y la diferenciación celular, pues en su calidad de componente de la inmunidad innata, inhibe el crecimiento bacteriano y transporta el hierro dentro de las células durante los procesos infecciosos (17). Se cree que la LAGN induce inhibición del crecimiento bacteriano, disminución de la apoptosis y aumento de la proliferación en los túbulos renales, lo cual constituye una posible vía de protección renal (23). En los estudios en ratones con isquemia e 'injuría' por reperfusión, se encontró que al administrar LAGN recombinante por vía intraperitoneal, el daño de los tejidos renales y el número de células apoptóticas eran menores,

que había un incremento en la proliferación de las células tubulares (19) y que, además, el valor de la creatinina sérica era más bajo (19), hallazgos que sugieren que la LAGN aumenta como reacción a la 'injuría' y puede desempeñar un papel importante en la recuperación renal (5,19). En el 2009 se publicó un metanálisis de 19 estudios con un total de 2.538 participantes, en el cual se evaluaron los valores de la LAGN en orina y en sangre de pacientes con 'injuría' renal aguda de diferentes causas (15); los autores encontraron que la detección de niveles de LAGN sérica y urinaria de 150 ng/ml era una herramienta útil para predecir la necesidad de recurrir a la terapia de reemplazo renal, con una razón de momios (OR) de 12,9 (15,27).

Los hallazgos de este estudio son similares a los reportados en varios otros en los que se ha encontrado que los valores de LAGN urinaria son predictores de la función retardada del injerto renal (10,28), pero en este estudio no fueron mejores que el porcentaje de descenso de la creatinina sérica. En un estudio de 27 pacientes con trasplante renal de donante vivo relacionado, Rahimzadeh, *et al.*, encontraron que un valor de LAGN urinaria de 174 ng/ml predecía una recuperación lenta de la función renal (5,10). En otro estudio de 64 personas con trasplante renal, Rotzami, *et al.*, encontraron que un valor de LAGN urinaria de 204 ng/ml dos horas después del trasplante tenía una sensibilidad de 72 % y una especificidad de 67 % para predecir la aparición de 'injuría' renal aguda, en tanto que la creatinina tuvo una mejor sensibilidad y especificidad: 1,55 mg/dl en el quinto día (2). Hollmen, *et al.*, reportaron que los valores de la LAGN urinaria a las 24 horas del trasplante predecían la función retardada del injerto renal a las tres semanas del trasplante (6). En un estudio de 53 pacientes, Parik, *et al.*, encontraron que un valor de LAGN urinaria de 100 ng/ml se asociaba a un riesgo de 20 % de función retardada del injerto renal (12). Lee, *et al.*, reportaron que los niveles de la LAGN urinaria en el primer día se asociaron a la función retardada del injerto renal, con una OR de 1,02 y p=0,0048 (29). La LAGN urinaria presentaba un área bajo la curva de 0,86, con un IC_{95%} de 0,75-0,98, en tanto que el área bajo la curva de la creatinina sérica fue de 0,65 (IC_{95%} 0,46-0,83), con una p de 0,0213 (29). Hall, *et al.*, hicieron un análisis de regresión logística para buscar factores predictores de la función retardada del injerto renal y encontraron una OR ajustada (IC_{95%}) de 5,1 para la LAGN urinaria (5).

Entre las limitaciones del estudio deben mencionarse el tamaño de la muestra y el hecho de haberlo llevado a cabo en pacientes con trasplante de donantes fallecidos que cumplían plenamente con los criterios óptimos, en quienes la incidencia de la función retardada del injerto es menor; sin embargo, aunque los valores de la LAGN urinaria fueron mayores cuando se presentó dicho retardo, no fueron superiores que el porcentaje de descenso de la creatinina sérica.

Como conclusión, la medición de la LAGN urinaria a las 24 y 48 horas del trasplante renal en receptores de donantes fallecidos que cumplían con los criterios óptimos, predijo la función retardada del injerto renal, pero no fue superior al porcentaje de descenso de la creatinina sérica para su detección temprana.

Agradecimientos

A los laboratorios Abbot y Novartis por la donación de los kits de medición de la LAGN urinaria para el estudio.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no hay conflictos de intereses en este estudio. Los laboratorios Abbot y Novartis no intervinieron en la recolección, el procesamiento ni el análisis de la información.

Financiación

Hospital Pablo Tobón Uribe y laboratorios Abbot y Novartis.

Referencias

- Cohen DJ, Vella JV. Transplantation. *NephSAP*. 2013;12:309-99.
- Rostami Z, Nikpoor M, Einollahi B. Urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) for early diagnosis of acute kidney injury in renal transplant recipients. *Nephrourol Mon*. 2013;5:745-52. <http://dx.doi.org/10.5812/numonthly.9385>
- Siedlecki A, Irish W, Brennan DC. Delayed graft function in the kidney transplant. *Am J Transplant*. 2011;11:2279-96. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03754.x>
- Cohen DJ, Vella JoV. NephSAP (Nephrology Self-Assessment Program). *Transplantation*. 2011;10:531-61.
- Hall IE, Yarlagadda SG, Coca SG, Wang Z, Doshi M, Devarajan P, *et al.* IL-18 and urinary NGAL predict dialysis and graft recovery after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21:189-97. <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2009030264>
- Hollmen ME, Kyllönen LE, Inkinen KA, Lalla ML, Salmela KT. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a marker of graft recovery after kidney transplantation. *Kidney Int*. 2011;79:89-98. <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2010.351>
- Lin M, Li L, Li L, Pokhrel G, Qi G, Rong R, *et al.* The protective effect of baicalin against renal ischemia-reperfusion injury through inhibition of inflammation and apoptosis. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:19. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-14-19>
- Choi HM, Park KT, Lee JW, Cho E, Jo SK, Cho WY, *et al.* Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts graft outcome up to 1 year after kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2013;45:122-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.05.080>
- Yarlagadda SG, Coca SG, Formica RN, Poggio ED, Parikh CR. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: A systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24:1039-47. <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfn667>
- Rahimzadeh N, Otukesh H, Hoseini R, Sorkhi H, Otukesh M, Hoseini S, *et al.* Are serum and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin predictive of renal graft function in short term? *Pediatr Transplant*. 2012;16:796-802. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3046.2012.01770.x>
- Yarlagadda SG, Coca SG, Garg AX, Doshi M, Poggio E, Marcus RJ, *et al.* Marked variation in the definition and diagnosis of delayed graft function: A systematic review. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23:2995-3003. <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfn158>
- Parikh CR, Jani A, Mishra J, Ma Q, Kelly C, Barasch J, *et al.* Urine NGAL and IL-18 are predictive biomarkers for delayed graft function following kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2006;6:1639-45. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01352.x>
- Devarajan P. NGAL in acute kidney injury: From serendipity to utility. *Am J Kidney Dis*. 2008;52:395-9. <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2008.07.008>
- Bataille A, Abbas S, Semoun O, Bonnet F, Resche-rigon M, Abboud I, *et al.* Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin in kidney transplantation and early renal function. *Transplantation*. 2011;92:1024-30. <http://dx.doi.org/10.1097/TP.0b013e318230c079>
- Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Haase-Fielitz A. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis*. 2009;54:1012-24. <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2009.07.020>
- Kim SC, Page EK, Knechtle SJ. Urine proteomics in kidney transplantation. *Transplant Rev (Orlando)*. 2014;28:15-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trre.2013.10.004>
- Heyne N, Kemmner S, Schneider C, Nadalin S, Königsrainer A, Häring HU. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin accurately detects acute allograft rejection among other causes of acute kidney injury in renal allograft recipients. *Transplantation*. 2012;93:1252-7. <http://dx.doi.org/10.1097/TP.0b013e31824fd892>
- Helmerson-Karlqvist J, Ärnlov J, Larsson A. Day-to-day variation of urinary NGAL and rationale for creatinine correction. *Clin Biochem*. 2013;46:70-2. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.09.022>
- Bolignano D, Donato V, Coppolino G, Campo S, Buemi A, Lacquaniti A, *et al.* Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of kidney damage. *Am J Kidney Dis*. 2008;52:595-605. <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2008.01.020>

20. **Fonseca I, Oliveira JC, Almeida M, Cruz M, Malho A, Martins LS, et al.** Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in kidney transplantation is an early marker of graft dysfunction and is associated with one-year renal function. *J Transplant.* 2013;2013:650123. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/650123>
21. **Kaufeld JK, Gwinner W, Scheffner I, Haller HG, Schiffer M.** Urinary NGAL ratio is not a sensitive biomarker for monitoring acute tubular injury in kidney transplant patients: NGAL and ATI in renal transplant patients. *J Transplant.* 2012;2012:563404. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/563404>.
22. **Vanmassenhove J, Vanholder R, Nagler E, Biesen W Van.** Urinary and serum biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury: An in-depth review of the literature. *Nephrol Dial Transpl.* 2013;28:254-73. <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfs380>
23. **Singer E, Marko L, Paragas N, Barasch J, Dragun D, Muller N, et al.** Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: Pathophysiology and clinical applications. *Acta Physiol (Oxf).* 2013;207:663-72. <http://dx.doi.org/10.1111/apha.12054>
24. **Glassford NJ, Schneider AG, Xu S, Eastwood GM, Young H, Peck L, et al.** The nature and discriminatory value of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in critically ill patients at risk of acute kidney injury. *Intensive Care Med.* 2013;39:1714-24. <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-013-3040-7>
25. **Adiyanti SS, Loho T.** Acute Kidney Injury (AKI) biomarker. *Acta Med Indones.* 2012;44:246-55.
26. **Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, et al.** Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:2534-43. <http://dx.doi.org/10.1097/01.ASN.0000088027.54400.C6>
27. **Magnusson NE, Hornum M, Jørgensen KA, Hansen JM, Bistrup C, Feldt-Rasmussen B, et al.** Plasma neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) is associated with kidney function in uraemic patients before and after kidney transplantation. *BMC Nephrol.* 2012;13:1-8. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2369-13-8>.
28. **Mishra J, Ma Q, Kelly C, Mitsnefes M, Mori K, Barasch J, et al.** Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation. *Pediatr Nephrol.* 2006;21:856-63. <http://dx.doi.org/10.1007/s00467-006-0055-0>
29. **Lee EY, Kim MS, Park Y, Kim HS.** Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin and interleukin-18 as predictive biomarkers for delayed graft function after kidney transplantation. *J Clin Lab Anal.* 2012;26:295-301. <http://dx.doi.org/10.1002/jcla.21520>

ARTÍCULO ORIGINAL

Factores asociados con la anemia en niños menores de tres años en Perú: análisis de la Encuesta Demográfica y de Salud Familiar, 2007-2013

José Enrique Velásquez-Hurtado^{1,2}, Yuleika Rodríguez¹, Marco Gonzáles¹, Laura Astete-Robilliard^{1,3}, Jessica Loyola-Romaní¹, Walter Eduardo Vigo¹, Ángel Martín Rosas-Aguirre²

¹ Programa de Apoyo a la Reforma del Sector Salud (PARSALUD II), Lima, Perú

² Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

³ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, Lima, Perú

Introducción. A pesar de la disminución de la pobreza en Perú, la prevalencia de la anemia infantil en el país continúa siendo alta.

Objetivo. Determinar los factores sociodemográficos y las características del cuidado materno-infantil asociadas con la anemia en niños de seis a 35 meses de edad en Perú.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio observacional que incluyó los datos sobre hemoglobina sanguínea registrados en la Encuesta Demográfica y de Salud Familiar (ENDES), 2007-2013, en niños entre los seis y los 35 meses de edad. Mediante un análisis multivariado de regresión logística, se identificaron los factores asociados con la anemia, definida como una hemoglobina corregida por altitud, menor de 11 mg/dl.

Resultados. La prevalencia de anemia fue alta (47,9 %). Se identificaron doce factores asociados con la anemia: factores sociodemográficos como vivir fuera de Lima y Callao; en un hogar con bajo nivel socioeconómico; tener una madre adolescente y con bajo nivel educativo; ser de sexo masculino con edad menor de 24 meses y antecedentes de fiebre reciente, y factores relacionados con el cuidado materno-infantil como la falta de control prenatal en el primer trimestre, la falta de suplemento de hierro durante el embarazo o administrado durante un periodo breve, parto en el domicilio, diagnóstico de anemia en la madre en el momento de la encuesta y ausencia de tratamiento antiparasitario preventivo en el niño.

Conclusiones. La ENDES proporcionó información valiosa sobre los factores asociados con la anemia en niños de seis a 35 meses, cuyo conocimiento debe mejorar la cobertura y la efectividad de prácticas adecuadas de cuidado materno-infantil.

Palabras clave: anemia/prevención y control, ciencias de la nutrición del niño, bienestar materno, salud del niño, cuidado del niño.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2896>

Factors associated with anemia in children under three years of age in Perú: analysis of the Encuesta Demográfica y de Salud Familiar, ENDES, 2007-2013

Introduction: Despite the reduction of poverty in Perú, the prevalence of anemia in the country remains high.

Objective: To identify socio-demographic, child and maternal-child care factors associated with anemia in children between 6 and 35 months in Perú.

Materials and methods: We conducted an analytical and descriptive study that included registered data from the national survey on demography and family health, 2007-2013, on children between 6 and 35 months old, including the measurement of blood hemoglobin. Anemia was confirmed by hemoglobin-altitude corrected values below 11 mg/dl. We used multivariate logistic regression models to assess potential associated factors for anemia.

Results: Anemia prevalence was high (47.9%). Twelve factors were independently associated with anemia in children: Socio-demographic factors such as living outside Lima and Callao, in a low socioeconomic household, and having an adolescent mother with low education level; child-related factors as being male, younger than 24 months of age, and having fever in the previous two weeks, and

Contribución de los autores:

José Enrique Velásquez-Hurtado, Marco Gonzáles, Laura Astete-Robilliard, Jessica Loyola-Romaní y Walter Eduardo Vigo: concepción y diseño del estudio

José Enrique Velásquez, Yuleika Rodríguez y Ángel Martín Rosas-Aguirre: redacción del artículo

Todos los autores participaron en la recolección, el análisis y la interpretación de los datos, y en la revisión del manuscrito.

maternal-child care factors such as lack of prenatal control in the first trimester of pregnancy, lack or short period of iron supplementation during pregnancy, house delivery, anemia detection at the moment of the survey, and lack of intestinal anti-parasite preventive treatment in the child.

Conclusions: The analysis of survey data provided valuable information about factors associated with anemia in children between 6 and 35 months, which can be used to increase the coverage and effectiveness of maternal-child care practices.

Key words: Anemia/prevention and control, child nutrition sciences, maternal welfare, child health, child care.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2896>

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la anemia como la presencia de una concentración de hemoglobina por debajo de los niveles límites de referencia para la edad, el sexo y el tiempo de embarazo (1). Representa un problema global de salud pública, sobre todo en la población infantil, con graves consecuencias para su salud, y su desarrollo social y económico. La causa principal de anemia en la infancia es la deficiencia de hierro, aunque también puede deberse a infecciones bacterianas, virales o parasitarias, a hemólisis hereditaria o adquirida, a disminución de la producción de glóbulos rojos (anemia aplásica secundaria a infecciones, cáncer, radiación, medicamentos, etc.) y a pérdida aguda o crónica de sangre. Aunque la incidencia real de la enfermedad no se conoce, se estima que existen, aproximadamente, 2.000 millones de personas anémicas en todo el mundo (1), especialmente en zonas rurales con condiciones de vida precarias (2).

Perú es uno de los países más afectados por esta enfermedad en Suramérica. A pesar de la disminución de la pobreza en los últimos años, la prevalencia de anemia en el país continúa siendo alta, pues afecta a 34,0 % de los niños menores de cinco años y a 18,7 % de las mujeres en edad fértil (3). En niños pequeños el problema es mayor, y se estima que, aproximadamente, 57,0 % de los menores de un año de edad (3) y 46,4 % de aquellos entre los seis y los 35 meses tienen anemia (4).

La anemia se considera un factor de riesgo para la madre y para el niño, y puede incrementar la mortalidad infantil, la mortalidad materna, la mortalidad perinatal y el bajo peso al nacer (5). Además, es una causa directa de menor productividad y desarrollo cognitivo, lo cual afecta

la calidad de vida de quienes la padecen desde muy temprana edad. Debido al impacto de la anemia en la salud de las personas y en la sociedad, recientemente se aprobó en el país el "Plan nacional para la reducción de la desnutrición crónica infantil y la prevención de la anemia en el país, para el periodo 2014-2016" (6), en el cual se priorizan las intervenciones preventivas en niños menores de tres años.

El diseño y la implementación de intervenciones preventivas efectivas para reducir la anemia y su impacto requieren de un mejor conocimiento de su naturaleza multifactorial (7). El objetivo del presente estudio fue determinar aquellos factores sociodemográficos relacionados con el niño y el cuidado materno-infantil que incrementan el riesgo de anemia en niños de seis a 35 meses de edad entre el 2007 y el 2013.

Materiales y métodos

Diseño del estudio

Se hizo un estudio observacional analítico de los datos secundarios de la Encuesta Demográfica y de Salud Familiar (ENDES), llevada a cabo en Perú entre 2007 y 2013.

Población de estudio

La población de estudio incluyó los datos registrados en la ENDES de 2007 a 2013, de todos los niños de seis a 35 meses de edad que contaban con medición de hemoglobina sanguínea. Las bases de datos se encuentran disponibles en la sección "Microdatos" del sitio en internet del Instituto Nacional de Estadística e Informática del Perú (INEI) (http://www.inei.gob.pe/srienaho/Consulta_por_Encuesta.asp), y en el del Programa Mundial de las Encuestas de Demografía y Salud (<http://measuredhs.com>).

Fuente de los datos

La ENDES se considera una de las investigaciones estadísticas más importantes del INEI, pues permite obtener información actualizada, y analizar

Correspondencia:

Yuleika Rodríguez, Javier Prado Oeste 2108, San Isidro, Lima, Perú

Teléfono: (511) 611 8182

ycr_76@yahoo.com

Recibido: 13/07/15; aceptado: 22/09/15

los cambios, tendencias y factores determinantes de la fecundidad, la mortalidad y la salud en Perú. La encuesta cubre cuatro poblaciones: a) hogares particulares y sus miembros; b) todas las mujeres en edad fértil, es decir, mujeres de 15 a 49 años de edad; c) los niños menores de cinco años de edad, y d) todas las personas de 40 años a más.

El diseño de la muestra de la encuesta fue probabilístico, 'autoponderado' por departamentos y áreas, estratificado, de múltiples etapas e independiente para cada departamento. En cada departamento se seleccionaron conglomerados y en cada conglomerado se visitaron las viviendas seleccionadas. El marco de la muestra lo dan los Censos Nacionales de Población y Vivienda y la actualización cartográfica que los sustenta. El nivel de inferencia de la encuesta es nacional, por áreas de residencia urbana y rural, por ámbito geográfico e, incluso, por departamento.

En Perú la ENDES tuvo su origen en el Programa Mundial de las Encuestas de Demografía y Salud, con una periodicidad inicial de cuatro a cinco años: ENDES I (1986), ENDES II (1991-92), ENDES III (1996), y ENDES IV (2000). A partir del 2004, la ENDES comenzó a hacerse como una encuesta continua, lo que ha significado algunas modificaciones con respecto a su diseño original. La muestra de conglomerados se dividió en cinco grupos para ser visitados uno cada año entre 2004 y 2008 (ENDES, 2004-2008), es decir, se entrevista una quinta parte de la muestra cada año. Las ENDES posteriores (ENDES, 2009-2011 y ENDES, 2012-2014) se han seguido haciendo con el diseño de encuesta continua, aunque con modificaciones, ya que ahora tiene una duración de tres años y no de cinco. La información detallada sobre el muestreo de la ENDES se encuentra disponible en los documentos metodológicos elaborados por el INEI.

Actualmente, la ENDES está conformada principalmente por tres cuestionarios: a) el cuestionario del hogar, que incluye el listado de miembros del hogar y las características de la vivienda; b) el cuestionario individual para mujeres de 15 a 49 años de edad, que recopila datos de reproducción, anticoncepción, embarazo, parto, puerperio y lactancia, inmunización y salud, nupcialidad, preferencias de fecundidad, antecedentes del cónyuge y trabajo de la mujer, HIV/sida y otras infecciones de transmisión sexual, mortalidad materna y violencia doméstica, y c) el cuestionario de traumatismos y enfermedades crónicas, para

todas las personas de 40 años de edad o más. Además, incluye un módulo en el que se registran todas las mediciones y pruebas que se hacen: peso y talla para mujeres de 15 a 49 años de edad y para niños de 0 a 5 años de edad; prueba de hemoglobina para mujeres de 15 a 49 años de edad y para niños de 0 a 5 años de edad, y medición de la presión arterial para las personas de 40 años de edad o más.

Determinación de la hemoglobina

La determinación de la hemoglobina en la ENDES se hace mediante el método colorimétrico, con un equipo portátil HemoCue® (HemoCue AB, Angelhome, Suecia). El método se basa en una reacción modificada de la azida-metahemoglobina, a partir del método de Vanzetti (8). El equipo utiliza microcubetas que contienen el reactivo, constituido por desoxicolato de sodio, nitrito de sodio y azida de sodio.

La muestra de sangre capilar se obtiene del dedo anular o medio de la mano (en niños menores de seis meses la muestra es del talón), la cual se vierte por capilaridad en la microcubeta. La cubeta con la muestra se lee en el HemoCue® a una longitud de onda doble de 565 a 880 nm.

La determinación de la hemoglobina en sangre capilar mediante el HemoCue® es un excelente método para el despistaje de la anemia, con una precisión bastante cercana a la obtenida por métodos directos con sangre venosa y arterial (9).

Variables de estudio

La variable dependiente fue la existencia o la ausencia de anemia en niños de seis a 35 meses de edad, la cual se daba por confirmada cuando la hemoglobina sanguínea corregida registraba un valor menor de 11 mg/dl (1). El valor obtenido por el HemoCue® en sangre capilar, se corrigió según la altitud en la que vivían los niños evaluados mediante la fórmula de Dirren, *et al.* (10). La ENDES no incluye la recolección de datos específicos, exámenes clínicos u otras pruebas complementarias que permitan diferenciar las posibles causas de la anemia.

Las variables independientes se agruparon en tres grupos: a) variables sociodemográficas (área de residencia, altitud, región, quintil de bienestar o riqueza al que pertenece el hogar (3), edad materna, grado de instrucción de la madre, lengua materna de la madre); b) variables relacionadas con el niño (sexo, edad, peso al nacer, signos y síntomas en las

dos semanas previas), y c) variables del cuidado materno e infantil (control prenatal, suplemento de hierro durante la gestación, parto en institución de salud, diagnóstico de anemia en la madre en el momento de la encuesta, suplemento de vitamina A y hierro en el niño, medicación antiparasitaria en el niño, y consumo de agua hervida). Todas las variables independientes fueron categóricas, la mayoría, con una escala de medición nominal.

Análisis de los datos

Los datos se analizaron en el programa Stata™, versión 13.0 (Stata Corp, College Station, USA).

En el análisis univariado y en el multivariado se establecieron mediante modelos de regresión logística las variables asociadas de forma independiente con anemia en niños menores de tres años, y se calcularon las respectivas razones de momios (*odds ratio*, OR) y sus intervalos de confianza de 95 %.

Todas las variables independientes con asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la prueba de razón de verosimilitud del análisis univariado, se consideraron en el análisis multivariado después de descartar la multicolinealidad usando el coeficiente V de Cramer. Cuando dos variables independientes presentaban alta correlación ($V > 0,3$), la variable independiente menos asociada a anemia se omitía en el análisis multivariado. Para la regresión logística multivariada, se usó el método de selección hacia atrás (*backward*); se partió de un modelo saturado y en cada paso se descartaron una a una las variables sin asociación estadística con la anemia. El modelo final incluyó todas las variables con asociación significativa ($p < 0,05$) e independiente con la anemia.

La determinación de las prevalencias y el análisis de regresión logística siguieron los procedimientos de estimación para muestreos por conglomerados complejos de múltiples etapas, los cuales toman en cuenta las probabilidades de muestreo y las ponderaciones de la muestra de la ENDES.

Resultados

En las bases de datos de la ENDES, 2007-2013, se registraron 26.760 niños de seis a 35 meses de edad, de los cuales 24.419 (90,7 %) contaban con la medición de hemoglobina en sangre. La prevalencia de anemia entre estos niños fue de 47,9 % (IC_{95%}: 46,9-48,8). La prevalencia fue mayor a menor edad: de 31,9 % en niños de 24 a 35 meses, de 55,0 % en los de 12 a 23 meses, y de

67,3 % en los de 6 a 11 meses. No fue posible calcular la prevalencia en niños menores de seis meses a partir de los datos de la ENDES, debido a que la recolección y el registro de los valores de hemoglobina sanguínea de dicho grupo de edad no fueron representativos de la población; sin embargo, los escasos datos disponibles sugieren que la anemia se presentó en cerca de 30 % de los niños menores de seis meses.

Todas las variables sociodemográficas evaluadas resultaron asociadas a anemia en los niños de seis a 35 meses de edad según el análisis univariado (cuadro 1). Los factores estadísticamente asociados a anemia en los niños fueron los siguientes: residir en un área rural ($p < 0,001$), vivir fuera de Lima y Callao, residir a una altitud mayor de 2.000 m ($p < 0,001$), pertenecer a hogares clasificados en los primeros quintiles de bienestar o riqueza (más pobres) ($p < 0,001$), y tener una madre joven ($p < 0,001$) sin nivel de instrucción superior ($p < 0,001$) y cuya lengua materna fuera diferente al español ($p < 0,001$).

En el grupo de variables relacionadas con el niño, dichos factores incluyeron ser varón ($p = 0,003$), menor de 24 meses y haber tenido fiebre ($p < 0,001$) o diarrea ($p < 0,001$) en las dos semanas previas (cuadro 2).

Las variables de cuidado materno asociadas a anemia en el niño fueron: no haber tenido, por lo menos, seis controles prenatales durante la gestación ($p < 0,001$); no haber asistido al control prenatal durante el primer trimestre ($p < 0,001$); no haber tomado hierro durante el embarazo ($p < 0,001$); no haber tenido el parto en una institución de salud ($p < 0,001$), y que a la madre se le hubiera diagnosticado anemia en el momento de la encuesta ($p < 0,001$) (cuadro 3).

Por último, los factores relacionados con el cuidado infantil que resultaron significativamente asociados con anemia en el niño fueron los siguientes: haber recibido vitamina A ($p < 0,001$) o suplemento de hierro ($p = 0,019$), no haber recibido tratamiento antiparasitario ($p < 0,001$) y no consumir agua hervida ($p = 0,006$) (cuadro 3).

De las 22 variables evaluadas en el análisis univariado, 15 ingresaron al modelo multivariado saturado, dos no fueron significativas en el análisis univariado (bajo peso al nacer del niño, y haber tenido tos y respiración rápida en las dos semanas previas) y cinco mostraron una alta colinealidad con otras variables que habían resultado significativas

Cuadro 1. Factores sociodemográficos asociados a anemia en niños de seis a 35 meses de edad

	Prevalencia	(%)	(OR)	p	IC _{95%}	
Área	Urbana	44,1	1			
	Rural	54,7	1,5	<0,001	1,4	1,7
Región	Lima y Callao	38,1	1			
	Resto de costa	42,6	1,2	0,006	1,1	1,4
	Sierra	55,9	2,1	<0,001	1,8	2,3
	Selva	51,3	1,7	<0,001	1,5	1,9
Altitud (msnm)	<1.000	43,3	1			
	1.000 a 1.999	39,4	0,9	0,052	0,7	1,0
	2.000 a 2.999	47,0	1,2	0,006	1,0	1,3
	3.000 a 3.999	62,3	2,2	<0,001	2,0	2,4
Quintil de bienestar o riqueza del hogar	≥4.000	73,3	3,7	<0,001	2,9	4,6
	Q5	30,6	1			
	Q1	54,8	2,7	<0,001	2,35	3,2
	Q2	54,0	2,7	<0,001	2,28	3,1
	Q3	48,6	2,1	<0,001	1,83	2,5
Edad materna (años)	Q4	40,7	1,6	<0,001	1,32	1,8
	≥19	47,2	1			
	<19	61,2	1,8	<0,001	1,5	2,1
Grado de instrucción de la madre	Superior	34,8	1			
	Secundaria	46,4	1,6	<0,001	1,4	1,9
	Ninguno/primaria	54,2	2,2	<0,001	1,9	2,6
Lengua materna	Español	43,2	1			
	Quechua	55,2	1,6	<0,001	1,5	1,8
	Aymara	64,0	2,3	<0,001	1,8	3,1
	Otra lengua	54,8	1,6	<0,001	1,3	1,9

Cuadro 2. Factores propios del niño asociados a anemia en niños de seis a 35 meses de edad

	Prevalencia	(%)	(OR)	p	IC _{95%}	
Sexo	Mujer	46,6	1			
	Hombre	49,1	1,1	0,003	1,0	1,2
Edad del niño (meses)	≥24	31,9	1			
	12 a 23	55,0	2,6	<0,001	2,4	2,8
	6 a 11	67,3	4,4	<0,001	3,9	4,8
Bajo peso al nacer (<2.500 g)	No	47,0	1			
	Sí	49,3	1,1	0,184	1,0	1,3
Fiebre en las dos semanas previas	No	46,8	1			
	Sí	51,2	1,2	<0,001	1,1	1,3
Tos y respiración rápida en las dos semanas previas	No	47,7	1			
	Sí	48,5	1,0	0,495	0,9	1,1
Diarrea en las dos semanas previas	No	47,1	1			
	Sí	51,7	1,2	<0,001	1,1	1,3

en el análisis univariado (área de residencia, altitud, lengua materna, número de controles prenatales y consumo de agua hervida).

En el modelo multivariado final se encontraron 12 variables con asociación significativa e independiente con la anemia de los niños (cuadro 4). De acuerdo con el modelo, los niños de la sierra (OR=1,6) y de la selva (OR=1,3) tuvieron mayor probabilidad de padecer anemia que aquellos que vivían en Lima y Callao. Los niños de hogares ubicados en los primeros quintiles de riqueza tuvieron mayor probabilidad de tener anemia, con una probabilidad

casi dos veces mayor (OR=2,0 o 2,1) en los dos primeros quintiles con respecto al quinto quintil. La anemia en los niños fue 1,3 (OR=1,3) veces más probable cuando la madre era adolescente y 1,4 (OR=1,4) veces más frecuente cuando la madre tenía un nivel de instrucción primaria o no tenía instrucción (en comparación con madres con nivel superior de educación). La probabilidad de tener anemia fue mayor en los hombres en general (OR=1,1) y en los más jóvenes específicamente; aquellos con menos de 12 meses de edad llegaron a tener 4,4 (OR=4,4) veces mayor probabilidad de

Cuadro 3. Factores del cuidado materno infantil asociados a anemia en niños de 6 a 35 meses de edad

	Prevalencia	(%)	(OR)	p	IC _{95%}	
Control prenatal (número de visitas)	≥6	44,9	1			
	<6	52,8	1,2	<0,001	1,1	1,3
Control prenatal en primer trimestre	Sí	45,2	1			
	No	55,2	1,4	<0,001	1,3	1,5
Suplemento de hierro durante el embarazo (meses)	≥6	41,5	1			
	3 a 5	45,2	1,2	0,022	1,0	1,3
	<3	49,3	1,4	<0,001	1,2	1,5
	Nunca	50,5	1,4	<0,001	1,3	1,6
Parto en institución de salud	Sí	46,8	1			
	No	51,4	1,2	<0,001	1,1	1,3
Anemia actual (Hb<12 g/dl)	No	44,9	1			
	Sí	58,9	1,8	<0,001	1,6	1,9
Dosis de vitamina A para el niño	No	46,3	1			
	Sí	50,8	1,2	<0,001	1,1	1,3
Suplemento de hierro para el niño	No	47,7	1			
	Sí	50,6	1,1	0,019	1,0	1,2
Medicación antiparasitaria para el niño	Sí	39,8	1			
	No	50,2	1,5	<0,001	1,4	1,7
Consumo de agua hervida	Sí	47,2	1			
	No	50,0	1,1	0,006	1,0	1,2

Cuadro 4. Modelo multivariado final con factores independientemente asociados a anemia en niños de seis a 35 meses de edad

		(OR)	p	IC _{95%}	
Región de residencia	Lima y Callao	1			
	Resto de costa	1,0	0,656	0,9	1,2
	Sierra	1,6	<0,001	1,4	1,9
	Selva	1,3	<0,001	1,1	1,5
Quintil de bienestar o riqueza del hogar	Q5	1			
	Q1	2,0	<0,001	1,6	2,4
	Q2	2,1	<0,001	1,7	2,5
	Q3	2,0	<0,001	1,6	2,4
	Q4	1,5	<0,001	1,2	1,8
Edad materna (años)	≥19	1			
	<19	1,3	0,006	1,1	1,5
Grado de instrucción de la madre	Superior	1			
	Secundaria	1,2	0,012	1,0	1,5
	Ninguno/primaria	1,4	0,001	1,1	1,7
Sexo del niño	Mujer	1			
	Hombre	1,1	<0,001	1,1	1,2
Edad del niño (meses)	≥24	1			
	12 a 23	2,6	<0,001	2,3	2,9
	6 a 11	4,4	<0,001	3,9	5,0
Fiebre en el niño en las dos semanas previas	No	1			
	Sí	1,1	0,014	1,0	1,2
Control prenatal en primer trimestre	Sí	1			
	No	1,1	0,013	1,0	1,2
Suplemento de hierro durante el embarazo (meses)	≥6	1			
	3 a 5	1,1	0,222	0,9	1,2
	<3	1,2	<0,001	1,1	1,4
	Nunca	1,3	0,002	1,1	1,4
Parto en institución de salud	Sí	1			
	No	1,2	<0,001	1,1	1,3
Anemia en la madre (Hb<12 g/dl)	No	1			
	Sí	1,8	<0,001	1,6	2,0
	Sí	1			
Antiparasitarios para el niño	No	1,3	<0,001	1,1	1,4

tener la enfermedad que los mayores de 24 meses. Por otro lado, cuando el niño había tenido fiebre en las dos semanas previas, la probabilidad de tener anemia aumentó 1,1 (OR=1,1) veces.

En relación con las variables de cuidado materno, el antecedente de no tener un control prenatal en el primer trimestre del embarazo (OR=1,1) y el de un parto que no se hubiera atendido en una institución de salud (OR=1,2), resultaron significativamente asociados con la anemia en el niño. De forma similar, el no haber recibido suplemento de hierro durante la gestación (OR=1,3), comparado con un suplemento administrado durante por lo menos seis meses, y el que la madre tuviera diagnóstico de anemia en el momento de la encuesta (OR=1,8), incrementaron la probabilidad de anemia en el niño. Por último, la única variable de cuidado infantil asociada de forma independiente a la anemia fue el no haber recibido tratamiento antiparasitario intestinal: aquellos niños que no lo recibieron tuvieron 1,3 (OR=1,3) veces mayor probabilidad de tener anemia que quienes sí lo recibieron.

Discusión

La prevalencia de anemia en niños de seis a 35 meses de edad es muy elevada, por lo que representa un importante problema de salud pública en Perú. El análisis de las bases de datos de las ENDES ha permitido identificar factores sociodemográficos, así como factores propios del niño y del cuidado materno-infantil que incrementarían el riesgo de anemia en los niños.

Tres de los 12 factores detectados en el modelo multivariado como significativos para la presencia de anemia en los niños (región de residencia, nivel socioeconómico, y grado de instrucción de la madre), estarían relacionados con la pobreza (11-13) y los problemas estructurales de exclusión social en el país (14). Si bien la combinación del crecimiento sostenido del producto interno bruto per cápita y del gasto social del Estado ha tenido como efecto la reducción de la pobreza monetaria en más de 30 puntos porcentuales en la última década, una gran parte de la población continúa sin acceder a los beneficios del crecimiento económico, con tasas de pobreza que exceden 50 % en áreas rurales, principalmente en la sierra y la selva (14).

Un estudio reciente señala que, pese al crecimiento económico del país en los últimos años, las desigualdades socioeconómicas entre los distintos

grupos parecen haberse incrementado, reforzando de esta forma viejas divisiones étnicas y geográficas (15). La provisión de servicios básicos (educación, salud) por parte del Estado, no llega en igualdad de condiciones y de calidad a todas las regiones, probablemente porque no se adapta a su realidad territorial, a sus restricciones económicas o a su cultura (14). Se requiere, por lo tanto, una política pública específica, orientada a reducir las brechas asociadas a la pobreza y a eliminar la exclusión social que impide que personas y territorios del país accedan a las oportunidades y al ejercicio de derechos en igualdad de condiciones.

La mayor prevalencia de anemia en niños menores de 12 meses podría reflejar un estado previo de deficiencia de hierro debido al agotamiento rápido de las reservas durante los primeros meses de vida, una ingestión deficiente de hierro en la dieta luego de los primeros seis meses, o una combinación de ambos mecanismos. Durante los primeros meses de vida, el lactante satisface sus necesidades de hierro a expensas de sus reservas corporales (7), así como de la leche materna, la cual, aun cuando no tiene un alto contenido de hierro, es fácilmente disponible. En los niños nacidos a término que reciben lactancia materna exclusiva, la protección contra la anemia dura entre cuatro y seis meses, mientras que, en los niños nacidos prematuros y en quienes son destetados precozmente y no reciben fórmulas fortificadas con hierro, la anemia aparece muy tempranamente, en sus primeros meses de vida (1,16).

Si bien la ENDES no permite un cálculo apropiado de la prevalencia de anemia en niños menores de seis meses, ni saber de forma confiable qué proporción de niños de seis a 35 meses recibieron lactancia materna exclusiva durante sus primeros seis meses de vida, el porcentaje de anemia en menores de esta edad (~30 %, obtenido con base en datos disponibles no representativos) y la proporción relativamente alta (~20 %) de niños de esta edad en los que la lactancia materna no es exclusiva (3), sugieren la importancia de intervenir a edades muy tempranas para reducir la anemia.

La universalidad de la lactancia materna exclusiva en el país es clave como práctica del cuidado infantil en menores de seis meses; sin embargo, se requieren más estudios en nuestra población para saber si dicha práctica es suficiente para evitar la anemia en este grupo de edad y en el de seis a 35 meses. Aunque la información comprobada sobre la efectividad del suplemento temprano de hierro

en niños menores de seis meses es limitada, en el ensayo clínico de Friel, *et al.* (17), se demostró la eficacia de esta intervención y ha motivado que la *American Academy of Pediatrics* recomiende que todos los niños a término con lactancia materna exclusiva reciban suplemento de hierro (1 mg/kg/día) desde los cuatro meses de edad (18).

La efectividad de las prácticas clave del cuidado infantil en la reducción de la anemia requiere de estrategias que aseguren la máxima cobertura de los grupos de niños más afectados. Además de los más pequeños, estos incluyen a los varones y a aquellos cuyas madres son adolescentes o tienen bajos niveles de instrucción. En varios estudios se ha señalado la importancia de la diferencia de sexo (19,20), en el sentido de que los depósitos de hierro se agotan más rápidamente en niños que en niñas debido a su más rápida tasa de crecimiento longitudinal.

Las madres adolescentes deben madurar precozmente para asumir sus responsabilidades como madres y, frecuentemente, están expuestas a condiciones sociales desfavorables que afectan el cuidado del niño (lactancia materna, nutrición apropiada), como la desestructuración familiar, la falta de diálogo con los padres y las uniones inestables, el abandono escolar, la entrada al mercado de trabajo con baja calificación y remuneración, y la disminución de las oportunidades de empleo (21,22).

Se han descrito dos posibles mecanismos en la asociación entre educación materna y anemia en sus niños. El primero estaría ligado a los conocimientos y las habilidades adquiridas para la crianza y el cuidado de los hijos, mientras que el segundo estaría vinculado con el empoderamiento de la mujer como resultado del nivel de educación alcanzado. Ambos mecanismos influirían en las decisiones de la mujer sobre los recursos destinados al cuidado de sus niños (salud, higiene, alimentación) y de ella misma, durante y después del embarazo (11,23), y podrían explicar la presencia simultánea de anemia en el niño y en la madre (7,24).

La desparasitación intestinal y la detección oportuna de signos y síntomas de peligro (como fiebre y diarrea) son prácticas clave del cuidado infantil que, según los resultados del estudio, permitirían reducir significativamente la anemia en niños menores de 36 meses. El suplemento de hierro en niños pequeños debe aumentarse mucho más

cuando los niños tienen parasitosis intestinales (como la giardiasis), las cuales pueden interferir en su absorción intestinal (25,26) u ocasionar pérdidas crónicas de sangre por las heces (como en el caso de parasitosis por *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* o *Entamoeba histolytica*) (27). Aunque los episodios repetidos y los cuadros graves de diarrea y de enfermedades febriles incrementan el catabolismo y la necesidad de nutrientes, son trastornos que se asocian frecuentemente a la baja ingestión de alimentos y su deficiente absorción (28).

A diferencia de los niños a término y con peso apropiado al nacer, los niños nacidos antes de término y con bajo peso agotan más rápidamente sus reservas de hierro (a partir de los dos meses del nacimiento), por lo que requieren recibir el suplemento muy tempranamente (29). Si bien en este estudio el peso al nacer no fue una variable significativamente asociada a la anemia en los niños, dicha asociación no puede descartarse.

En la ENDES se ha desplegado un gran esfuerzo para recolectar datos confiables sobre el peso al nacer con base en las cartillas de vacunación infantil, pero estas no siempre están disponibles en todos los hogares, por lo que debe consignarse el peso aproximado que la madre recuerda en el momento de la encuesta. Los factores del cuidado relacionados con la carencia e inoportunidad de los controles prenatales durante el embarazo, disminuyen la posibilidad de corregir la anemia en la mujer gestante o la detección y el tratamiento de infecciones urinarias (30,31), y la falta de suplemento de hierro o su administración durante poco tiempo en el curso de la gestación podrían considerarse factores relacionados con la anemia infantil como consecuencia de un menor peso y una menor reserva de hierro al nacer.

En diversos estudios se ha evidenciado la asociación entre la concentración de hemoglobina materna durante el embarazo y el peso al nacer; los resultados sugieren que si la madre alcanza valores adecuados en los trimestres del embarazo ello favorece el peso del neonato (29,30). Por otro lado, la atención no calificada del parto (que fue otro factor del cuidado materno que resultó asociado a la anemia) evidenciaría más un menor uso de los servicios de salud que una verdadera relación causal, así como una menor posibilidad de corregir la anemia en niños prematuros y de bajo peso al nacer que requieren suplemento de hierro en los primeros meses.

Para la interpretación correcta de los resultados, se deben tener en cuenta algunas limitaciones. Primero, el estudio tiene las mismas limitaciones de las encuestas de hogares (32), en las cuales hay la posibilidad de obtener respuestas erróneas de los encuestados (madres) debidas a los sesgos de memoria o a las omisiones deliberadas. Segundo, si bien la medición de la hemoglobina en sangre capilar con HemoCue® provee una estimación adecuada de la prevalencia de anemia en las poblaciones (33), se ha registrado variabilidad interindividual durante la medición en sangre capilar (34), así como la posibilidad de falsos negativos cuando se compara con mediciones directas en sangre venosa y arterial (35). Una adecuada estandarización y capacitación de los encuestadores en el método de medición disminuiría considerablemente estos problemas. Tercero, los valores estimados corresponden a anemia por cualquier causa y, si bien la mayoría de los casos se debe a la deficiencia de hierro, solo estudios más específicos permitirían categorizar adecuadamente el tipo de anemia que afecta a los niños en Perú. Cuarto, si bien las ENDES disponen de datos sobre la mayoría de factores potencialmente asociados a la anemia en los niños, los cuestionarios no permiten la recolección de datos confiables sobre algunos factores, como el antecedente de prematuridad o la frecuencia, la cantidad y la calidad de la dieta alimenticia de los niños. Quinto, la variable relacionada con el nivel socioeconómico en el estudio se definió en términos de los activos o la riqueza en los hogares encuestados, en vez de los ingresos o el consumo.

A pesar de las limitaciones, los datos de las ENDES han permitido generar, de forma rápida y con un costo bajo, información útil y de suficiente calidad sobre los factores asociados con la anemia en niños de seis a 35 meses. La anemia en niños y la mayoría de los factores asociados a ella, pueden modificarse en el corto y el mediano plazo con coberturas elevadas de prácticas clave para el cuidado de la mujer durante el embarazo (control prenatal, suplemento de hierro y parto atendido en una institución de salud) y el puerperio (prevención y control de la anemia durante el control posnatal), así como para el cuidado de los infantes menores de dos años (suplemento de hierro, introducción apropiada de alimentos sólidos y semisólidos ricos en hierro, búsqueda de atención ante señales de peligro, y vacunación, lavado de manos y consumo de agua segura) (36).

La promoción de prácticas y entornos saludables para el cuidado de la mujer gestante y los niños menores de 36 meses, propuesta e implementada por el Programa de Apoyo a la Reforma del Sector Salud II en nueve regiones priorizadas del país, constituye una estrategia integral y articulada frente a los factores identificados en el presente estudio (37). Las intervenciones para reducir la deficiencia de hierro están entre las más costo-efectivas en salud pública (38) y serían decisivas para disminuir la carga de enfermedad por anemia en niños, frecuentemente asociada con alteraciones en su crecimiento, en el desarrollo de su capacidad intelectual, y en el acceso a oportunidades personales, educativas y laborales en el largo plazo (39).

Financiación

La investigación contó con el apoyo del Programa de Apoyo a la Reforma del Sector Salud (PARSALUD II) del Ministerio de Salud, proyecto de inversión pública financiado con recursos del tesoro público y endeudamiento externo proveniente del Banco Interamericano de Desarrollo y el Banco Mundial.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Referencias

1. **World Health Organization.** Iron deficiency anaemia: Assessment, prevention and control. A guide for programme managers. Fecha de consulta: 10 de julio de 2014. Disponible en: http://www.who.int/nutrition/publications/en/ida_assessment_prevention_control.pdf.
2. **Lutter CK.** Iron deficiency in young children in low-income countries and new approaches for its prevention. *J Nutr.* 2008;138:2523-8. <http://dx.doi.org/10.3945/jn.108.095406>
3. **Instituto Nacional de Estadística e Informática.** Encuesta Demográfica y de Salud Familiar - ENDES 2013. Lima: INEI; 2014.
4. **Instituto Nacional de Estadística e Informática.** Indicadores de resultados de los programas estratégicos 2007-2013. Encuesta Demográfica y de Salud Familiar - ENDES (Resultados preliminares). Lima: INEI; 2014.
5. **World Health Organization.** Comparative quantification of health risks. Geneva: WHO; 2004.
6. **Ministerio de Salud de Perú.** Plan Nacional para la Reducción de la Desnutrición Crónica Infantil y la Prevención de la Anemia en el País, periodo 2014-2016. N° 258-2014/MINSA. Lima: MINSA; 2014.
7. **Osorio MM.** Determinant factors of anemia in children. *J Pediatr (Rio J).* 2002;78:269-78.
8. **Vanzetti G.** An azide-methemoglobin method for hemoglobin determination in blood. *J Lab Clin Med.* 1966;67:116-26.
9. **Sanchis-Gomar F, Cortell-Ballester J, Pareja-Galeano H, Banfi G, Lippi G.** Hemoglobin point-of-care testing: The HemoCue system. *J Lab Autom.* 2013;18:198-205. <http://dx.doi.org/10.1177/2211068212457560>

10. **Dirren H, Logman MH, Barclay DV, Freire WB.** Altitude correction for hemoglobin. *Eur J Clin Nutr.* 1994;48:625-32.
11. **Ahmed T, Hossain M, Sanin KI.** Global burden of maternal and child undernutrition and micronutrient deficiencies. *Ann Nutr Metab.* 2012;61(Supl.1):8-17. <http://dx.doi.org/10.1159/000345165>.
12. **Cardoso MA, Scopel KKG, Muñiz PT, Villamor E, Ferreira MU.** Underlying factors associated with anemia in Amazonian children: A population-based, cross-sectional study. *PLoS One.* 2012;7:e36341. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0036341>
13. **Dey S, Goswami S, Dey T.** Identifying predictors of childhood anaemia in North-East India. *J Health Popul Nutr.* 2013;31:462-70.
14. **Ministerio de Desarrollo e Inclusión Social.** Una política para el desarrollo y la inclusión social en el Perú. Lima: MIDIS; 2012.
15. **Escobal J, Ponce C.** Polarización y segregación en la distribución del ingreso en el Perú: trayectorias desiguales. Lima: Grupo de Análisis para el Desarrollo; 2012.
16. **Reboso J, Cabrera E, Rodríguez GP, Jiménez S.** Anemia por deficiencia de hierro en niños de 6 a 24 meses y de 6 a 12 años de edad. *Rev Cuba Salud Pública.* 2005;31. Fecha de consulta: 10 agosto de 2014. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/spu/vol31_4_05/spu07405.htm.
17. **Friel JK, Aziz K, Andrews WL, Harding SV, Courage ML, Adams RJ.** A double-masked, randomized control trial of iron supplementation in early infancy in healthy term breast-fed infants. *J Pediatr.* 2003;143:582-6. [http://dx.doi.org/10.1067/S0022-3476\(03\)00301-9](http://dx.doi.org/10.1067/S0022-3476(03)00301-9)
18. **Baker RD, Greer FR.** Diagnosis and prevention of iron deficiency and iron-deficiency anemia in infants and young children (0-3 years of age). *Pediatrics.* 2010;126:1040-50. <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2010-2576>
19. **Schneider JM, Fujii ML, Lamp CL, Lönnerdal B, Dewey KG, Zidenberg-Cherr S.** Anemia, iron deficiency, and iron deficiency anemia in 12–36-month-old children from low-income families. *Am J Clin Nutr.* 2005;82:1269-75.
20. **Soh P, Ferguson EL, McKenzie JE, Homs MY, Gibson RS.** Iron deficiency and risk factors for lower iron stores in 6–24-month-old New Zealanders. *Eur J Clin Nutr.* 2004;58:71-9. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601751>
21. **Turiani M, Pamplona VL, Komura LA, Chávez RE.** El cuidado del niño: representaciones y experiencias de la madre adolescente de bajos recursos. *Index Enferm.* 2009;18:90-4.
22. **Michelazzo D, Yazlle ME, Mendes MC, Patta MC, Rocha JS, Moura MD de.** Social indicators of pregnant adolescents: A case control study. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2004;26:633-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-72032004000800007>
23. **Souganidis ES, Sun K, de Pee S, Kraemer K, Rah J-H, Moench-Pfanner R, et al.** Determinants of anemia clustering among mothers and children in Indonesia. *J Trop Pediatr.* 2012;58:170-7. <http://dx.doi.org/10.1093/tropej/fmr062>
24. **Leal LP, Batista M, Lira PI, Figueiroa JN, Osório MM.** Prevalence of anemia and associated factors in children aged 6-59 months in Pernambuco, Northeastern Brazil. *Rev Saúde Pública.* 2011;45:457-66. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102011000300003>
25. **Luján HD, Mowatt MR, Wu J, Lu Y, Lees A, Chance MR, et al.** Purification of a variant-specific surface protein of *Giardia lamblia* and characterization of its metal-binding properties. *J Biol Chem.* 1995;270:13807-13.
26. **Fuglestad AJ, Lehmann AE, Kroupina MG, Petryk A, Miller BS, Iverson SL, et al.** Iron deficiency in international adoptees from Eastern Europe. *J Pediatr.* 2008;153:272-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2008.02.048>
27. **Papier K, Williams GM, Luceres-Catubig R, Ahmed F, Olveda RM, McManus DP, et al.** Childhood malnutrition and parasitic helminth interactions. *Clin Infect Dis.* 2014;59:234-43. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciu211>
28. **Siekman K, Receveur O, Haddad S.** Can an integrated approach reduce child vulnerability to anaemia? Evidence from three African countries. *PLoS One* 2014;9:e90108. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0090108>
29. **Mills RJ, Davies MW.** Enteral iron supplementation in preterm and low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;3:CD005095. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD005095.pub2>
30. **Carroli G, Villar J, Piaggio G, Khan-Neelofur D, Gülmezoglu M, Mugford M, et al.** WHO systematic review of randomised controlled trials of routine antenatal care. *Lancet.* 2001;357:1565-70. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04723-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04723-1)
31. **Raatikainen K, Heiskanen N, Heinonen S.** Under-attending free antenatal care is associated with adverse pregnancy outcomes. *BMC Public Health.* 2007;7:268. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2458-7-268>
32. **Instituto Nacional de Estadística e Informática.** Reflexiones sobre la Encuesta Demográfica y de Salud Familiar - ENDES. Lima: INEI; 2013.
33. **Johns WL, Lewis SM.** Primary health screening by haemoglobinometry in a tropical community. *Bull World Health Organ.* 1989;67:627-33.
34. **Morris SS, Ruel MT, Cohen RJ, Dewey KG, de la Brière B, Hassan MN.** Precision, accuracy, and reliability of hemoglobin assessment with use of capillary blood. *Am J Clin Nutr.* 1999;69:1243-8.
35. **Neufeld L, García-Guerra A, Sánchez-Francia D, Newton-Sánchez O, Ramírez-Villalobos MD, Rivera-Dommarco J.** Hemoglobin measured by Hemocue and a reference method in venous and capillary blood: A validation study. *Salud Pública Méx.* 2002;44:219-27.
36. **Velásquez JE, Solís L, Vigo WE, Rosas AM, Giusti P, Alfaro P, et al.** Evaluación de las prácticas de cuidado materno infantil en áreas con pobreza extrema del Perú, 2012. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2014;31:243-53.
37. **Ministerio de Salud.** Documento técnico: promoción de prácticas y entornos saludables para el cuidado infantil. Lima: MINSA; 2011.
38. **Sanabria H, Tarqui C.** Fundamentos para la fortificación de la harina de trigo con micronutrientes en el Perú. *An Fac Med.* 2007;68:185-92.
39. **De-Regil LM, Suchdev PS, Vist GE, Walleser S, Peña-Rosas JP.** Home fortification of foods with multiple micronutrient powders for health and nutrition in children under two years of age. *Evid Based Child Health.* 2013;8:112-201. <http://dx.doi.org/10.1002/ebch.1895>.

ARTÍCULO ORIGINAL

Acción de la estreptozotocina en un modelo experimental de inducción neonatal de la diabetes

Leticia Bequer¹, Tahiry Gómez¹, José Luis Molina¹, Daniel Artiles², Rosa Bermúdez¹, Sonia Clapés³

¹ Unidad de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Santa Clara, Cuba

² Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario "Arnaldo Milián Castro", Santa Clara, Cuba

³ Departamento de Ciencias Morfológicas, Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón", La Habana, Cuba

Introducción. El estudio de la diabetes mediante modelos experimentales es fundamental para entender los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad.

Objetivos. Comparar en ratas Wistar adultas la acción de inducción de la diabetes de la estreptozotocina según el momento y la vía de inoculación del fármaco durante el periodo neonatal mediante la evaluación de variables bioquímicas, metabólicas e histológicas.

Materiales y métodos. Se conformaron ocho grupos con ratas Wistar hembras recién nacidas (n=10). Se evaluó la inducción con estreptozotocina (100 mg/kg de peso corporal) según el día (segundo y quinto después del nacimiento) y la vía de inoculación (subcutánea o intraperitoneal). Los controles se inyectaron con solución tampón de citrato sódico. Durante 12 semanas se evaluaron la glucemia, el peso, y la cantidad de alimento y de agua consumida. Se hicieron pruebas de tolerancia a la glucosa oral, se evaluó la hemoglobina 'glicosilada', y se hizo el estudio morfométrico e histopatológico del páncreas.

Resultados. Casi todos los animales inoculados con estreptozotocina en el quinto día murieron, en tanto que todos los inoculados en el segundo día sobrevivieron. La administración subcutánea de estreptozotocina en el segundo día produjo hiperglucemia, polifagia, polidipsia y disminución de la ganancia de peso corporal, así como alteración de los valores de hemoglobina 'glicosilada' y en la prueba de tolerancia a la glucosa. Las lesiones histopatológicas del páncreas, así como la disminución del número de islotes, se observaron con mayor frecuencia con la estreptozotocina aplicada de forma subcutánea en el segundo día, lo cual corroboró que el efecto de este agente inoculado de forma subcutánea causa mayor daño.

Conclusiones. La inyección subcutánea de una dosis de 100 mg/kg de estreptozotocina en el segundo día después del nacimiento logró mayor efectividad en la inducción de diabetes moderada en ratas Wistar adultas.

Palabras clave: diabetes mellitus experimental, hiperglucemia, estreptozotocina, glucosa, ratas, islotes pancreáticos.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2686>

Streptozotocin diabetogenic action in an experimental neonatal induction model

Introduction: The use of experimental models is essential to study the pathophysiological mechanisms of diabetes.

Objectives: To compare in adult Wistar rats the diabetogenic action of streptozotocin according to the moment and route of administration during the neonatal period by evaluating biochemical, metabolic and histological variables.

Materials and methods: Eight groups of neonatal female Wistar rats (n=10) were formed. We evaluated the induction with streptozotocin (100 mg/kg of body weight) on days 2 and 5 after birth, as well as the administration routes (subcutaneous or intraperitoneal). Controls were injected with sodium citrate buffer. Blood glucose level, body weight, food and water intake were monitored for 12 weeks. We also performed tolerance tests for oral glucose and glycosylated hemoglobin, and a histopathological pancreas morphometric study.

Contribución de los autores:

Leticia Bequer y Tahiry Gómez: dirección de la investigación, protocolo de trabajo, trabajo de experimentación, análisis estadístico e informe de la investigación

José L. Molina: supervisión del trabajo de experimentación animal desde el punto de vista bioético y práctico, eutanasias y recolección de las muestras biológicas

Daniel Artiles y Rosa Bermúdez: estudio histopatológico de los páncreas

Sonia Clapés: interpretación de los resultados y revisión crítica del manuscrito

Results: The mortality rate was about 100% among rats given streptozotocin on their fifth day of life. All rats receiving the drug on day 2 of life survived, and they showed a marked hyperglycemia, polyphagia, polydipsia and decreased body weight gain in addition to increased glycosylated hemoglobin rates and impaired results in the oral glucose tolerance test. Histopathological lesions of the pancreas as well as a decreased number of islets were significantly more frequent in rats receiving the drug subcutaneously on day 2, which confirms that streptozotocin administered subcutaneously produces greater damage.

Conclusions: Subcutaneous injection of streptozotocin in a dose of 100 mg/kg of body weight in the second day after birth induced moderate diabetes in adult Wistar rats more effectively.

Key words: Diabetes mellitus, experimental, hyperglycemia, streptozotocin, glucose, rats, islets of Langerhans.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2686>

La diabetes se ha convertido en un problema mundial de salud en este nuevo siglo. Se caracteriza por elevados niveles de glucosa en sangre debido a complejos procesos que involucran defectos en la secreción de insulina causados por la destrucción autoinmunitaria de las células β del páncreas (diabetes mellitus de tipo 1), así como el desarrollo progresivo de resistencia a la insulina en el hígado y los tejidos periféricos asociada a la disminución en la secreción de la hormona por parte de las células β pancreáticas (diabetes mellitus de tipo 2). Existen, además, otras formas frecuentes de diabetes como la de la gestación (1-3).

La diabetes de tipo 2 es la forma más común de la enfermedad. En el 2011, la Federación Internacional de Diabetes reportó que en ese momento cerca de 336 millones de personas sufrían la enfermedad, la cual, además de provocar aproximadamente 4,6 millones de fallecimientos cada año, disminuye considerablemente la calidad y la expectativa de vida de los pacientes, sin mencionar los elevados costos de los tratamientos (4). Como resultado de la hiperglucemia, las personas con diabetes de tipo 2 tienen un alto riesgo de complicaciones cardiovasculares, neurológicas y microvasculares. Estas últimas incluyen la pérdida de visión, la falla renal y la neuropatía periférica (4,5).

A pesar de que en la última década ha habido una 'explosión' de información científica sobre los factores genéticos y ambientales que desencadenan los mecanismos bioquímicos involucrados en la enfermedad, así como sobre las complicaciones y los tratamientos, es mucho lo que aún queda por

dilucidarse. En este sentido, los modelos animales desempeñan un papel fundamental en el estudio de los mecanismos fisiopatológicos y en la evaluación de las estrategias de diagnóstico y tratamiento que limiten el desarrollo de la enfermedad y sus complicaciones.

Existen numerosos modelos biológicos en animales que reproducen varias de las manifestaciones clínicas de la diabetes humana mediante diversos métodos, entre los cuales se destaca la inducción química con estreptozotocina en roedores. Este fármaco provoca la destrucción selectiva de las células β de los islotes pancreáticos, única fuente de insulina en el organismo (1,3,6).

La sensibilidad al fármaco puede variar según la cepa, el sexo, la edad, el estado nutricional y, por supuesto, la especie animal. El momento, la dosis y la vía de administración resultan determinantes para el tipo de diabetes que se desee inducir. En la rata adulta la inoculación de diferentes dosis de este agente causa una deficiencia casi total de insulina y, por lo tanto, niveles elevados de hiperglucemia que simulan la diabetes de tipo 1 (1,3,7). Sin embargo, varios autores refieren que una única dosis elevada de estreptozotocina (100 mg/kg), administrada durante los primeros días de vida del conejo, provoca un déficit de insulina moderado y valores medios de hiperglucemia semejantes a los de la diabetes de tipo 2 en el transcurso de las siguientes semanas (1,2,6,8).

Desde hace muchos años el modelo neonatal con estreptozotocina se considera una herramienta confiable para esclarecer los mecanismos asociados a la regeneración de las células pancreáticas y a las complicaciones a largo plazo de la diabetes de tipo 2. En numerosos estudios se plantean diferentes momentos (días 0, 2 o 5 de nacidos) y vías de inoculación (subcutánea, intraperitoneal o intravenosa) del fármaco (3,6,8,9), sin embargo, no existen informes sobre las ventajas de uno u

Correspondencia:

Leticia Bequer, Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Carretera al Acueducto y Circunvalación, Santa Clara, Villa Clara, Cuba

Teléfono: (042) 273 436

leticia@ucm.vcl.sld.cu

Recibido: 03/02/15; aceptado: 19/10/15

otro protocolo con relación a las características de la enfermedad una vez se desarrolla en el animal adulto.

En este contexto, en el presente estudio se propuso comparar en ratas Wistar adultas la acción diabtogénica de la estreptozotocina según el momento y la vía de inoculación del fármaco durante el periodo neonatal, evaluando para ello algunas variables bioquímicas, metabólicas e histológicas.

Aunque ningún modelo experimental recrea totalmente las particularidades de la enfermedad en humanos, es necesario trabajar en su caracterización para que los resultados obtenidos sean lo más valiosos posibles.

Materiales y métodos

Animales y grupos de experimentación

Se obtuvieron ratas Wistar hembras y machos del Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) en La Habana, Cuba, las cuales fueron apareadas para obtener animales recién nacidos. El día del nacimiento se determinó el sexo de las crías y se distribuyó a las hembras aleatoriamente en ocho grupos de experimentación, de 10 animales cada uno.

Inducción de la diabetes

La diabetes fue inducida en cuatro de los grupos mediante la administración de 100 mg/kg de estreptozotocina (STZ) disuelta en 0,1 M de solución tampón de citrato (pH 4,5). Se ensayaron dos vías y dos momentos de inoculación: subcutánea (sc) e intraperitoneal (ip), a los dos y cinco días del nacimiento. Por cada grupo tratado (STZ-2-sc, STZ-2-ip, STZ-5-sc, STZ-5-ip) se estableció un grupo de control (Cont-2-sc, Cont-2-ip, Cont-5-sc, Cont-5-ip), al cual se le administró solución tampón de citrato en iguales condiciones.

Cuidado y mantenimiento de los animales

Tanto los padres como sus crías se mantuvieron en un ambiente estrictamente controlado: temperatura de 20 ± 2 °C, humedad de 40 %, ciclos alternados de luz y oscuridad de 12 horas y libre acceso a agua y comida. Las crías permanecieron con sus madres durante 21 días hasta el destete, momento a partir del cual se midió semanalmente su peso y el consumo diario de agua y comida.

Determinación de las variables bioquímicas

Para confirmar la inducción de la diabetes, semanalmente se determinaron los valores de glucosa

en sangre (glucosa oxidasa) con glucómetro y biosensores SUMA a partir de la sexta semana de vida, según lo establecido en ensayos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio. Los animales se sometieron a ayunos de 12 horas y la muestra de sangre se extrajo de la cola del animal. En la semana 12 se hicieron pruebas de tolerancia a la glucosa (PTGO) con la misma metodología luego de administrar por vía oral una sobrecarga de glucosa (dextrosa monohidratada) de 2 g/kg de peso corporal. Las mediciones se hicieron en ayunas a los 30, 60 y 120 minutos de la administración de la sobrecarga. En la misma semana se extrajo sangre del plexo retroorbitario para determinar la hemoglobina 'glicosilada' (Hb A1c) mediante el método de aglutinación.

Sacrificio de los animales y toma de muestras para los estudios morfométricos e histológicos

Al final de las 12 semanas de vida, se practicó la eutanasia bajo anestesia (50-60 mg/kg de tiopental sódico), por extracción total de la sangre mediante punción de la vena cava inferior. Se extrajo el páncreas y se pesó libre de grasa y ganglios. Las muestras se procesaron histológicamente con tinción de hematoxilina y eosina. Las observaciones se llevaron a cabo en microscopio óptico binocular marca Olympus BX51, con objetivos de 4, 10, 20, 40 y 100. Se determinaron las principales lesiones en el páncreas endocrino. Para su cuantificación, los islotes pancreáticos se contaron en cuatro campos con lente de menor aumento (4 x 10, panorámico) y el resultado se expresó como número de islotes por mm² de páncreas.

Procesamiento estadístico

Las comparaciones cuantitativas se hicieron mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney teniendo en cuenta la distribución de los datos. Los resultados se presentan como media \pm error estándar. La prueba de ji al cuadrado se utilizó para la comparación de proporciones, y los datos se expresaron en valores absolutos y porcentajes. En ambos casos las diferencias se consideraron significativas con valores de $p < 0,05$.

Aspectos éticos

Los animales se trataron según las recomendaciones de la guía de los *National Institutes of Health* para el trabajo con animales de experimentación. La investigación fue aprobada por el Consejo Científico y el Comité de Ética de la Unidad de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara.

Resultados

El agente de inducción de la diabetes se administró a 40 animales; aquellos inoculados con el agente al quinto día de nacidos tuvieron un índice de mortalidad de 95 % (solo sobrevivió un animal del grupo STZ-5-ip), es decir que se analizaron exclusivamente los animales inoculados en el segundo día de vida (STZ-2). En el resto de los grupos inoculados con el agente, así como en todos los de control, la supervivencia fue de 100 %.

En la medición semanal del peso de los animales inoculados en el segundo día de nacidos (figura 1, a y b), no se registraron diferencias importantes entre las dos formas de administración de la

estreptozotocina, aunque en el grupo inoculado por vía subcutánea se observó una menor ganancia en el peso corporal que en el respectivo grupo de control. En este mismo grupo de animales se registró una acentuada tendencia al aumento del consumo de agua y alimento (figura 1, c-f) con respecto al grupo control, mientras que en el grupo de animales inoculados por vía intraperitoneal se presentó un comportamiento similar al de sus controles.

Los resultados de la determinación semanal de glucemia se presentan en la figura 2, a y b. En el grupo STZ-2-sc se registraron valores superiores de hiperglucemia moderada, y más estables en el tiempo del experimento que los del grupo STZ-2-ip.

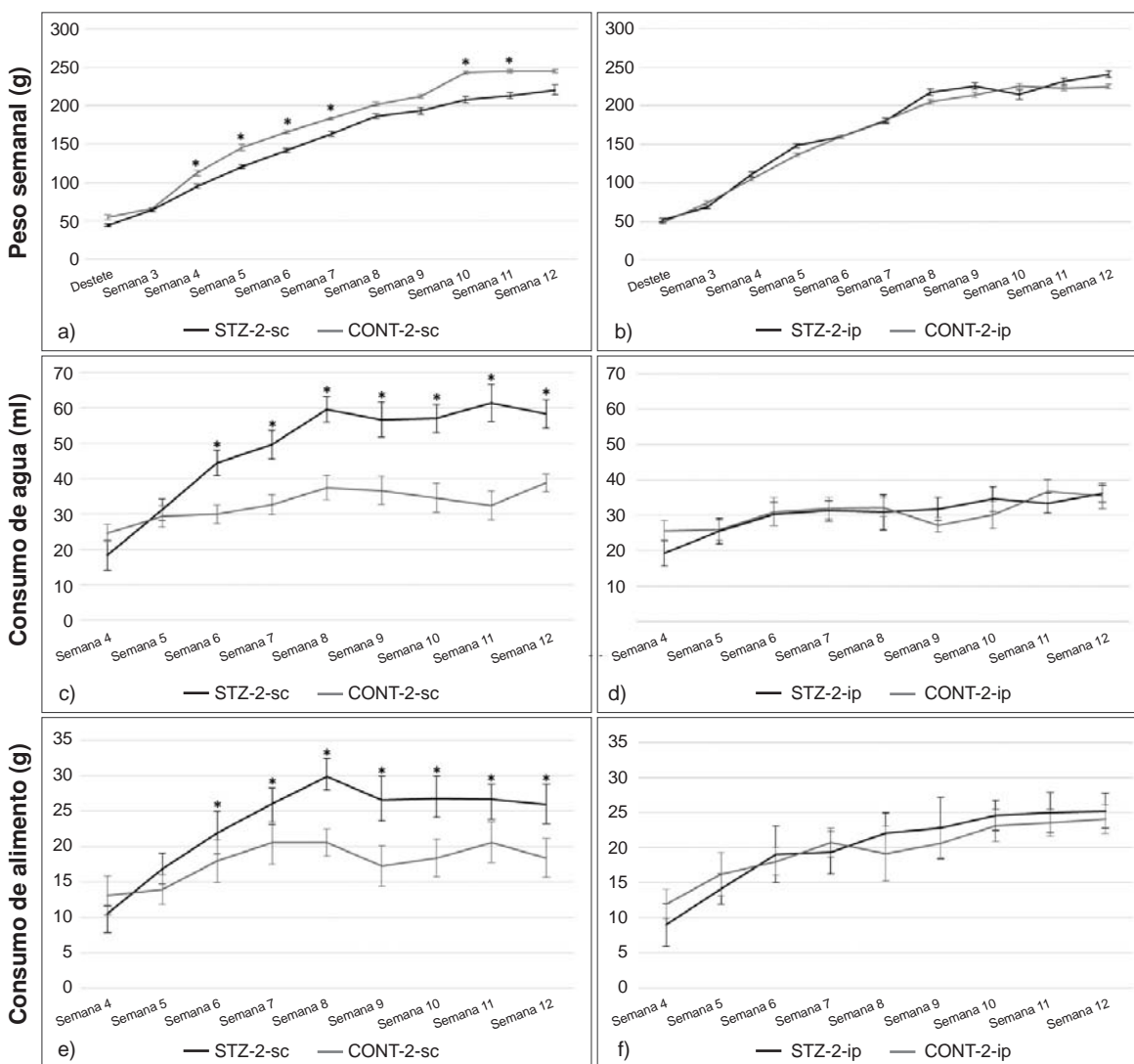


Figura 1. Signos y síntomas clínicos en los grupos de experimentación. Evaluación de peso (g) semanal (a y b), consumo diario de agua (ml) (c y d) y comida (g) (e y f). Los datos se expresaron como media ± error estándar. Prueba U de Mann-Whitney (*p<0,05)

En las pruebas de tolerancia a la glucosa se observó que ambos grupos control tuvieron una recuperación total de sus niveles de glucosa a los 120 minutos de la sobrecarga. Sin embargo, en los grupos tratados con estreptozotocina, fundamentalmente en el STZ-2-sc, se registraron valores muy superiores a los 30 y 60 minutos, con muy poca recuperación a los 120 minutos. Los valores de la hemoglobina ‘glicosilada’ en los cuatro grupos confirmaron un peor control glucémico en el STZ-2-sc, aunque este parámetro fue significativamente mayor que el de los respectivos controles con ambas vías de administración del agente de inducción de la diabetes (cuadro 1).

El estudio morfométrico del páncreas evidenció que la relación entre el peso del órgano y el peso corporal no se modificó de manera significativa en ninguno de los grupos tratados, en comparación con sus controles: STZ-2-sc (0,68 g ± 0,039 g) Vs. Cont-2-sc (0,77 g ± 0,066 g) y STZ-2-ip (0,75 g ± 0,118 g) Vs. Cont-2-ip (0,80 g ± 0,055 g).

El análisis histopatológico reveló un número de islotes por mm² de páncreas significativamente menor (p<0,05) en los grupos tratados que en los de control: STZ-2-sc (0,03 ± 0,002) Vs. Cont-2-sc (0,12 ± 0,016) y STZ-2-ip (0,05 ± 0,006) Vs. Cont-2-ip (0,12 ± 0,015). Las principales

lesiones observadas en los islotes pancreáticos se presentan en el cuadro 2 y en la figura 3, a y b. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en cuanto a la presencia de linfocitos, fibroblastos y fibrosis; en ningún caso se constató la presencia de necrosis.

Discusión

En el presente estudio se logró obtener un modelo animal empleando estreptozotocina como agente de inducción de la diabetes, en el cual se evidenciaron características del síndrome diabético humano. Entre los fármacos conocidos que inducen la diabetes experimentalmente este agente es el más utilizado por su mayor estabilidad y efectividad con respecto a otros. Es un antibiótico derivado de *Streptomyces achromogenes* que se emplea, además, como antineoplásico por su acción citotóxica altamente selectiva para las células β de los islotes pancreáticos (2,10).

En el experimento se inoculó este agente a ratas Wistar en los días dos y cinco de nacidas; en las ratas inoculadas en el día cinco hubo 95 % de mortalidad, a pesar de que en la literatura científica se ha reportado su uso en el quinto día de vida sin que se produjera la muerte (6,10). Se sabe que el momento de la inyección del compuesto es un

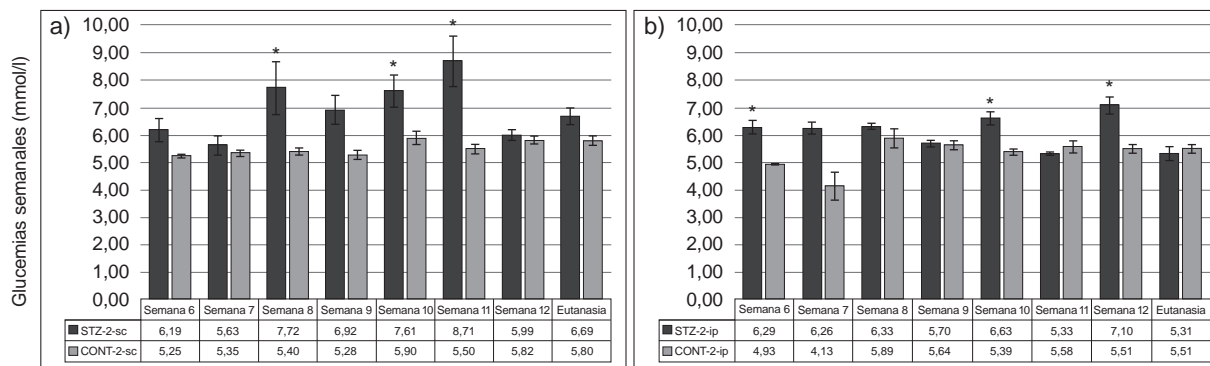


Figura 2. Concentraciones de glucosa semanales (mmol/l) en los grupos de experimentación (a, b). Los datos se expresaron como media±error estándar. Prueba U de Mann-Whitney (*p<0,05)

Cuadro 1. Prueba de tolerancia a la glucosa oral y hemoglobina ‘glicosilada’ en los grupos de experimentación. Los datos se expresaron como media±error estándar. Prueba U de Mann-Whitney (*p<0,05)

		Cont-2-sc	STZ-2-sc	Cont-2-ip	STZ-2-ip
PTGO (MMOL/L)	Ayuno	5,70 ± 0,224	6,98 ± 0,354*	5,60 ± 0,264	6,03 ± 0,055
	30 min	7,61 ± 0,301	17,30 ± 0,625*	8,60 ± 0,320	13,90 ± 0,710*
	60 min	6,50 ± 0,330	16,10 ± 0,754*	7,50 ± 0,311	9,01 ± 0,863*
	120 min	5,34 ± 0,222	11,53 ± 0,830*	6,00 ± 0,280	7,02 ± 0,154*
Hb A1c (g/dl)		3,12 ± 0,178	4,85 ± 0,335*	3,47 ± 0,091	3,95 ± 0,098*

PTGO: prueba de tolerancia a la glucosa oral; Hb A1c: hemoglobina ‘glicosilada’

factor crítico para la regeneración de las células del páncreas endocrino (1,6). Varios autores han reportado signos de regeneración evidentes a las dos semanas de evolución en ratas inoculadas en el mismo día del nacimiento y en el día dos, mientras que las inyectadas en el quinto día mostraban alteraciones en el patrón histológico en ese mismo tiempo. La capacidad de regeneración de las células β del páncreas en ratas Wistar disminuye rápidamente durante la primera semana a partir del nacimiento y es insignificante en los roedores adultos (1,6,11,12), de ahí que el momento de la administración determine el tipo de diabetes que se induce experimentalmente.

Es posible que en este caso las crías inyectadas en el día cinco, con la capacidad regenerativa de sus células β disminuida, no hayan tolerado los cambios metabólicos que se producen inmediatamente después de la administración del fármaco, sobre todo con dosis de 100 mg/kg de

peso corporal. En estudios en los que se administró la estreptozotocina en dosis de 70 mg/kg, se ha logrado la supervivencia de todos los especímenes en el modelo (9,13).

Los animales inoculados en el segundo día de nacidos, principalmente los inoculados por vía subcutánea, sobrevivieron a la etapa de inducción de la diabetes y presentaron los signos y síntomas clásicos de la enfermedad: hiperglucemia en ayunas, intolerancia a la glucosa, polidipsia, poli-fagia y disminución del peso corporal.

A partir de la sexta semana de vida los grupos enfermos presentaron hiperglucemia moderada, la cual no fue permanente durante el tiempo de experimentación; sin embargo, a las 12 semanas exhibieron intolerancia a la glucosa, fundamentalmente el grupo inyectado por vía subcutánea. En las ratas y en los humanos, una elevación prolongada (>120 minutos) de la glucosa en plasma refleja alteraciones en la tolerancia a la glucosa oral, lo que puede utilizarse en el diagnóstico de la diabetes de tipo 2, conjuntamente con la hiperglucemia en ayunas (14). Estos hallazgos concuerdan con lo referido por algunos autores sobre modelos de inducción de la diabetes de tipo 2, en los cuales se ha visto que, inmediatamente después de inocular a los animales con estreptozotocina, estos presentan una hiperglucemia que dura pocos días; sin embargo, a las tres semanas de edad los niveles de insulina y glucosa son normales, aunque a las ocho semanas las ratas muestran una hiperglucemia leve y alteraciones en la tolerancia a la glucosa (11,15).

Cuadro 2. Estudio histopatológico del páncreas. Principales lesiones observadas en los islotes pancreáticos en los grupos de experimentación. Los datos se expresaron en valores absolutos y porcentajes.

	Cont-2-sc (n=7)	STZ-2-sc (n=10)	Cont-2-ip (n=10)	STZ-2-ip (n=7)
Edema	1/14,3 %	9/90,0 %*	1/10,0 %	4/57,1 %
Vacuolización	2/28,6 %	9/90,0 %*	0/0,0 %	3/42,9 %
Congestión	0/0,0 %	8/80,0 %*	4/40,0 %	2/28,6 %
Atrofia	2/28,6 %	9/90,0 %*	1/10,0 %	6/85,7 %*
Distorsión	1/16,7 %	10/100,0 %*	1/10,0 %	5/71,4 %*

*Prueba de ji al cuadrado (p<0,05)

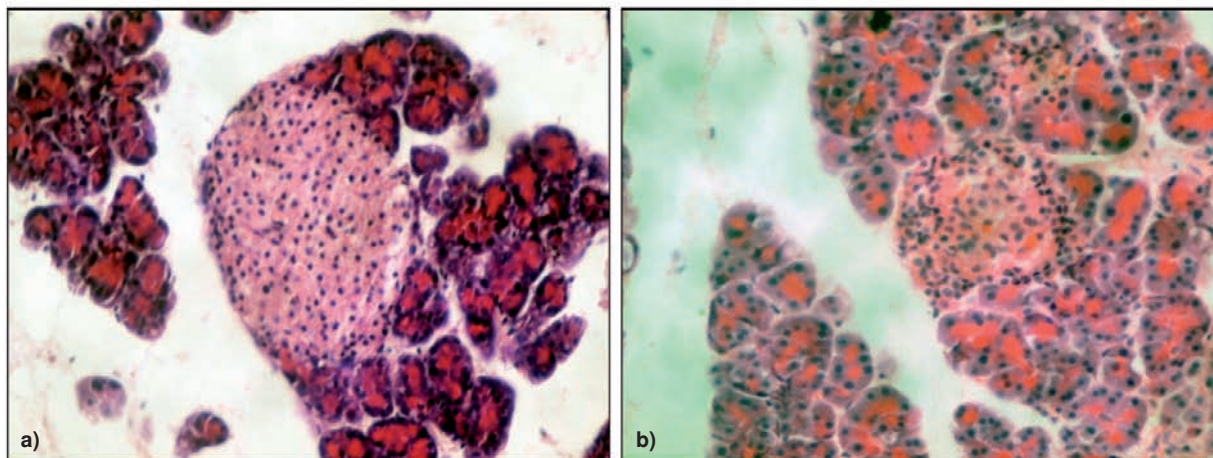


Figura 3. Microfotografías de páncreas. **a.** Islotes pancreáticos con tamaño y células conservadas en el grupo control. Hematoxilina y eosina, 40X. **b.** Cambios en el islote pancreático característicos de la administración de estreptozotocina. Hematoxilina y eosina, 40X

La medición de la hemoglobina 'glicosilada' al final del experimento confirmó la presencia de diabetes en los grupos tratados. Este parámetro es un importante marcador del estado metabólico a largo plazo en pacientes con diabetes (16) y ya se emplea como método apropiado para su diagnóstico (17). Es el producto de una reacción lenta, no enzimática e irreversible, que está directamente relacionada con las concentraciones de carbohidratos circulantes en sangre y la vida media del eritrocito (de 90 a 120 días en el humano y de 45 a 50 días en la rata) (18). Teniendo esto en cuenta, los valores de hemoglobina 'glicosilada' obtenidos reflejaron un mal control glucémico de los animales en los que la enfermedad se indujo.

La pérdida de peso corporal y el aumento en el consumo de agua y comida en los animales enfermos, principalmente en los inyectados subcutáneamente, puede explicarse desde el punto de vista fisiológico, pues la exposición del organismo a una hiperglucemia persistente puede provocar un desequilibrio osmótico y traer como consecuencia la polidipsia y, por ende, la poliuria. La falta de glucosa intracelular se refleja en un cansancio generalizado, mientras que el mecanismo de la polifagia aún no está muy claro, aunque se ha encontrado que es un efecto compensador de la pérdida de glucosa por la orina (19). Todos estos trastornos metabólicos se relacionan con una gluconeogénesis anormal a partir de aminoácidos, lo cual se traduce clínicamente en atrofia muscular y pérdida de peso (20).

En la presente investigación el estudio morfométrico del páncreas no mostró modificaciones en el peso del órgano en los animales con diabetes inducida, comparados con los controles. Sin embargo, el análisis histopatológico reveló una disminución del número de islotes pancreáticos en los animales diabéticos, en comparación con los sanos. Resultados similares se han encontrado en estudios en roedores (21-24), conejos (25) y perros (26), independientemente del fármaco (estreptozotocina o aloxano) y el momento de la inducción.

Aunque en los grupos de animales inoculados con estreptozotocina se observaron diversas lesiones histológicas concordantes con daños en la arquitectura pancreática, no se encontró necrosis en el tejido, lesión que debió aparecer en el momento de la inoculación del fármaco y que demuestra su toxicidad inmediata.

Las lesiones percibidas son la evidencia histológica de la regeneración parcial del páncreas endocrino a las 12 semanas de inoculación de

la estreptozotocina. En los animales tratados los islotes pancreáticos se observaron atróficos y con bordes distorsionados, congestivos, con edema y presencia de vacuolas intracitoplásmicas. A pesar de que la acción de la estreptozotocina es específica contra las células β , el resto del islote se ve afectado por los posibles mecanismos de regeneración ya demostrados en modelos experimentales similares al empleado en este trabajo. La generación de nuevas células β puede ocurrir a partir de células indiferenciadas (neogénesis), de células ya diferenciadas que se convierten en otro tipo celular (transdiferenciación) y de la replicación de las propias células β remanentes (proliferación) (1,12).

Los hallazgos concuerdan con el mecanismo de acción de la estreptozotocina inoculada durante el periodo neonatal en roedores. En ratas, específicamente de la línea Wistar, se ha comprobado que los daños causados al páncreas en dicho periodo se van reparando, pero los animales llegan a la edad adulta con una capacidad disminuida de producir insulina, por lo que presentan dificultades en el metabolismo de la glucosa (1,11).

Los aspectos analizados evidenciaron que en los animales de este experimento, especialmente los del grupo STZ-2-sc, se lograron reproducir algunas características fundamentales del síndrome diabético en el hombre; sin embargo, existen diferencias obvias en la etiología de la enfermedad humana y la inducida farmacológicamente en un modelo animal. Un modelo experimental ideal de la diabetes de tipo 2 debe presentar resistencia a la insulina y alteraciones en la respuesta pancreática a dicha resistencia. Los modelos químicos se basan en la destrucción de las células β del páncreas; no obstante, en ellos se logra simular la enfermedad humana, provocando reducción y disfunción de células β , así como insuficiencia en la secreción de insulina, elementos que traen consigo un déficit en los mecanismos de compensación de la célula, y generan un estado de intolerancia a la glucosa y otras alteraciones fundamentales en la patogenia de la diabetes moderada (7).

Con base en el análisis de los resultados experimentales, se concluyó de forma indiscutible que la vía de inoculación subcutánea fue más efectiva para lograr un estado diabético en el animal lo más semejante posible a la enfermedad en humanos. En otros estudios en el mismo modelo animal llevados a cabo por nuestro equipo de investigación, se ha corroborado esta conclusión, pues en el grupo

inoculado por vía subcutánea se encontraron alteraciones en los parámetros oxidativos y metabólicos (principalmente en el perfil renal) (27). Sin embargo, en la literatura científica se ha registrado la presencia de diabetes moderada con la inoculación intraperitoneal de estreptozotocina en animales durante el periodo neonatal, aunque con variaciones en las dosis, los momentos y las cepas utilizadas (9,13,28,29), lo cual corrobora que el modelo debe seleccionarse en función del propósito y las condiciones de la investigación (1,7), por lo cual estudios como este son el primer paso imprescindible antes de efectuar pesquisas con objetivos más precisos.

Desde el punto de vista del procedimiento en animales de experimentación, la inyección subcutánea es sencilla y en general bien tolerada, aunque la absorción de sustancias por esta vía es relativamente lenta. Por otra parte, la administración intraperitoneal conlleva riesgo de lesión en los órganos abdominales, pues el punto de inyección se localiza en el cuadrante inferior derecho del animal, lateral a la línea media (para evitar el compromiso de la vejiga urinaria) y caudal con respecto a la última costilla (para evitar inyectar en el hígado o el estómago). Si no se hace adecuadamente, la inoculación intraperitoneal de estreptozotocina puede aumentar la mortalidad y disminuir el efecto de inducción de la diabetes, a pesar de ser una vía de administración rápida y fácil, principalmente en animales adultos (30). La inyección intraperitoneal en crías de dos días de nacidas es difícil y conlleva riesgos. Esto se añade a los resultados obtenidos con la inoculación por esta vía, lo que convierte la inyección subcutánea de 100 mg/kg de estreptozotocina en el segundo día después del nacimiento en el tratamiento de elección para inducir diabetes moderada en ratas Wistar adultas.

Financiación

Esta investigación se inscribe en el proyecto institucional "Estandarización de un modelo de inducción neonatal de diabetes experimental", contratado y financiado por el Ministerio de Salud Pública de Cuba.

Conflicto de intereses

Los autores expresan no tener ningún tipo de conflicto de intereses.

Referencias

1. **Damasceno DC, Netto AO, Iessi IL, Gallego FQ, Corvino SB, Dallaqua B, et al.** Streptozotocin-induced

diabetes models: Pathophysiological mechanisms and fetal outcomes. *Biomed Res Int.* 2014;2014:819065. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/819065>

2. **Srinivasan K, Ramarao P.** Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *Indian J Med Res.* 2007;125:451-72.
3. **Casado M.** Modelos animales en el estudio de la diabetes. *Av Diabetol.* 2007;23:432-8.
4. **Ashcroft FM, Rorsman P.** Diabetes mellitus and the β cell: The last ten years. *Cell.* 2012;148:1160-71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.010>
5. **Comité Ejecutivo de la Asociación Latinoamericana de Diabetes.** Guías de diagnóstico, control y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 con medicina basada en evidencia. *Rev ALAD.* 2013;1-142.
6. **Arulmozhi DK, Veeranjanyulu A, Bodhankar SL.** Neonatal streptozotocin-induced rat model of type 2 diabetes mellitus: A glance. *Indian J Pharmacol.* 2004;36:217-21.
7. **Jawerbaum A, White V.** Animal models in diabetes and pregnancy. *Endocr Rev.* 2010;31:680-701. <http://dx.doi.org/10.1210/er.2009-0038>
8. **Kiss AC, Woodside B, Sinzato YK, Bernardi MM, Kempinas WG, Anselmo-Franci JA, et al.** Neonatally induced mild diabetes: Influence on development, behavior and reproductive function of female Wistar rats. *Diabetol Metab Syndr.* 2013;5:2-10. <http://dx.doi.org/10.1186/1758-5996-5-61>
9. **Kiss AC, Lima PH, Sinzato YK, Takaku M, Takeno MA, Rudge MV, et al.** Animal models for clinical and gestational diabetes: Maternal and fetal outcomes. *Diabetol Metab Syndr.* 2009;1:1-7. <http://dx.doi.org/10.1186/1758-5996-1-21>
10. **Junod A, Lambert A, Stauffacher W, Renold A.** Diabetogenic action of streptozotocin: Relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest.* 1969;48:2129-39.
11. **Portha B, Picolon L, Rosselin G.** Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. *Diabetologia.* 1979;17:371-7.
12. **Damasceno DC, Sinzato YK, Bueno A, Netto AO, Dallaqua B, Gallego FQ, et al.** Mild diabetes models and their maternal-fetal repercussions. *J Diabetes Res.* 2013;2013:473575. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/473575>
13. **Sinzato YK, Lima PH, de Campos KE, Kiss AC, Rudge MV, Damasceno DC.** Neonatally-induced diabetes: Lipid profile outcomes and oxidative stress status in adult rats. *Rev Assoc Med Bras.* 2009;55:384-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302009000400010>
14. **Ernsberger P, Koletsky R.** The glucose tolerance test as a laboratory tool with clinical implications. In: Chackrewarthy S, editor. *Glucose tolerance.* Rijeka: InTech; 2012. p. 3-14. <http://dx.doi.org/10.5772/54785>
15. **Ishii Y, Ohta T, Sasase T.** Non-obese type 2 diabetes animals models. In: Chackrewarthy S, editor. *Glucose tolerance.* Rijeka: InTech; 2012. p. 224-42. <http://dx.doi.org/10.5772/54785>
16. **Weykamp C, John WG, Mosca A.** A review of the challenge in measuring hemoglobin A1c. *J Diabetes Sci Technol.* 2009; 3:439-45. <http://dx.doi.org/10.1177/193229680900300306>

17. **American Diabetes Association.** Standards of medical care in diabetes-2014. *Diabetes Care.* 2014;37(Supl.1):s5-13. <http://dx.doi.org/10.2337/dc14-S005>
18. **Rosales A.** Determinación de hemoglobina glicada (HbA1) en ratas con diabetes inducida con estreptozotocina. México, DF: Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa; 1994.
19. **Del Toro M.** Efecto de la cocarboxilasa sobre la glucemia en ratas Wistar inducidas a diabetes (tesis). Colima, México: Universidad de Colima; 2001.
20. **Ciobotaru E.** Spontaneous diabetes mellitus in animals. In: Oguntibeju OO, editor. *Diabetes mellitus - Insights and perspectives.* Rijeka: InTech; 2013. p. 271-96. <http://dx.doi.org/10.5772/48170>
21. **Xuesong X, Zhu W, Yuming Z, Lihua B, Yuexin Y.** Dosage of streptozocin in inducing rat model of type 2 diabetes mellitus. *Wei Sheng Yan Jiu.* 2010;39:138-42.
22. **Ahimadi S, Karimian SM, Sotoudeh M, Bahadori M.** Histological and immunohistochemical study of pancreatic islet beta cells of diabetic rats treated with oral vanadyl sulphate. *MJIRI.* 2002;16:173-8.
23. **Alimohammadi S, Hobbenaghi R, Javanbakht J, Kheradmand D, Mortezaee R, Tavakoli R, et al.** Protective and antidiabetic effects of extract from *Nigella sativa* on blood glucose concentrations against streptozotocin (STZ)-induced diabetic in rats: An experimental study with histopathological evaluation. *Diagn Pathol.* 2013;8:137-44. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-1596-8-137>
24. **Abunasef SK, Amin HA, Abdel-Hamid GA.** A histological and immunohistochemical study of beta cells in streptozotocin diabetic rats treated with caffeine. *Folia Histochem Cytobiol.* 2014;52:42-50. <http://dx.doi.org/10.5603/FHC.2014.0005>
25. **Mir SH, Baqui A, Bhagat RC, Darzi MM, Shah AW.** Biochemical and histomorphological study of streptozotocin-induced diabetes mellitus in rabbits. *Pak J Nut.* 2008; 7:359-64.
26. **Cubillos V, López C, Alberdi A.** Estudio histopatológico e inmunohistoquímico de páncreas en perros diabéticos inducidos con aloxano. *Arch Med Vet.* 2008;40:169-77.
27. **Bequer L, Gómez T, Molina JL, López F, Gómez CL, Clapés S.** Inducción de hiperglicemias moderadas en ratas Wistar por inoculación neonatal de estreptozotocina. ¿Inyección subcutánea o intraperitoneal? *Rev Argent Endocrinol Metab.* 2014;51:178-84.
28. **Figuroa MC, Pérez IH, Mejía R.** Caracterización de un modelo de diabetes tipo 2 en ratas Wistar hembra. *Rev MVZ Córdoba.* 2013;18:3699-707.
29. **Bonner-Weir S, Trent DF, Honey RN, Weir GC.** Responses of neonatal rat islets to streptozotocin: Limited β -cell regeneration and hyperglycemia. *Diabetes.* 1981;30:64-9. <http://dx.doi.org/10.2337/diab.30.1.64>
30. **Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, Gastineau DA, Hiddinga HJ, Jahangir A, et al.** Single dose streptozotocin-induced diabetes: Considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim.* 2011;45:131-40. <http://dx.doi.org/10.1258/la.2010.010090>

ARTÍCULO ORIGINAL

Las células dendríticas generadas en presencia de vitamina D3 y activadas con lipopolisacáridos incrementan la producción de IL-1 β , IL-8 e IL-10 y disminuyen su capacidad de inducir LT CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺

Sindy M. Muñoz, Luz Stella Rodríguez

Instituto de Genética Humana, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La vitamina D3 actúa como modulador de algunas células del sistema inmunitario, incluidas las células dendríticas. Varios estudios han reportado su importancia en la generación *in vitro* de células dendríticas tolerogénicas, similares en cuanto a fenotipo y función a las células dendríticas dérmicas CD141 productoras de IL-10 e inductoras de linfocitos T reguladores CD4⁺.

Objetivo. Se compararon el fenotipo y las citocinas producidas por las células dendríticas generadas en ausencia o en presencia de la vitamina D3, y maduras con lipopolisacáridos, así como su habilidad de inducir linfocitos T reguladores a partir de linfocitos T CD4⁺ vírgenes alogénicos.

Materiales y métodos. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica para seleccionar monocitos CD14⁺ y diferenciarlos *in vitro* de las células dendríticas en presencia o en ausencia de vitamina D3, y madurarlas con lipopolisacáridos. Se analizaron el fenotipo y los niveles de las citocinas en los sobrenadantes de cultivo. Se hizo un cocultivo de las células dendríticas con linfocitos T CD4⁺ vírgenes alogénicos y se determinaron las frecuencias de LTreg (vírgenes activados).

Resultados. Las células dendríticas no estimuladas generadas con la vitamina D3 conservaron el CD14. Al activarlas con lipopolisacáridos, expresaron bajos niveles de C83, CD83 y CD86, HLA-DR, cantidades elevadas de IL-1 β , IL-8 e IL-10, y una tendencia a la disminución de IL-6, IL-12p70 y TGF- β 1 con respecto a las que no habían sido tratadas con la vitamina. La frecuencia de los LTreg vírgenes fue similar, aunque se observó una tendencia de las células dendríticas inmaduras generadas con la vitamina a inducir LTreg activados.

Conclusión. Las células dendríticas generadas con vitamina D3 y tratadas con lipopolisacáridos presentaron un fenotipo 'semimaduro', así como la capacidad de secretar citocinas antiinflamatorias y citocinas promotoras de la reacción inflamatoria. Además, no se aumentó su capacidad de promover la polarización de LTCD4⁺ vírgenes alogénicos hacia LTreg.

Palabras clave: células dendríticas, lipopolisacáridos, citocinas, linfocitos T.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2885>

Dendritic cells generated in the presence of vitamin D3 and stimulated with lipopolysaccharide secrete IL-8, IL-1 β , IL-10 and induce relatively low levels of CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ T cells

Introduction: Vitamin D3 (VD3) has been described as a modulator of immune system cells, including dendritic cells (DC). Previous studies have shown its importance in *in vitro* generation of tolerogenic DC, which have a similar function and phenotype to that of CD141 dermal DCs that produce IL-10 and induce (LTreg) CD4⁺ T regulator cells.

Objective: This paper presents a study that compares the phenotype and cytokines produced by DC generated in presence and absence of VD3, which were matured with lipopolysaccharide (LPS), and their ability to induce LTreg from naïve allogeneic CD4⁺ T cells.

Materials and methods: In order to compare them, peripheral blood mononuclear cells were isolated to select monocytes CD14⁺ T cells and differentiate them *in vitro* from DC in the presence and absence of VD3, and to mature them with LPS. Phenotype and cytokine levels were also analyzed in the culture supernatants. Dendritic cells were then co-cultured with naïve allogeneic CD4⁺ T cells and the frequencies of LTreg were determined (naïve-activated).

Results: The results showed that unstimulated DC generated with VD3 kept the CD14. When activated with LPS, they expressed lower levels of C83, CD83 and CD86; HLA-DR; higher amounts of IL-1 β ,

Contribución de los autores:

Las dos autoras participaron en la planeación y ejecución del estudio y en la escritura del manuscrito.

IL-8, IL-10, and tended to lessen IL-6, IL-12p70 and TGF- β 1, compared to DCs not treated with VD3. The frequency of naïve LTreg was similar, although immature DC generated with VD3 tended to induce activated LTregs.

Conclusion: Based on these results, it is possible to conclude that DCs generated with VD3 and treated with LPS presented a 'semi-mature' phenotype, and were able to secrete pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. Besides, they did not increase their capacity to promote the polarization of naïve allogenic CD4+ T cells towards LTregs.

Key words: Dendritic cells, lipopolysaccharides, cytokines, T-Lymphocytes.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2885>

Un aspecto fundamental de las células dendríticas (CD) es la posibilidad de generarlas *in vitro* a partir de monocitos CD14 en presencia de *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*, (*GM-CSF*) e interleucina 4 (IL-4), y modular su estado de diferenciación y maduración, lo que permite obtener células dendríticas inmunogénicas asociadas a respuestas efectoras o células dendríticas tolerogénicas.

Estas últimas se caracterizan por tener un fenotipo 'semimaduro', resistencia a la maduración, alta producción de citocinas antiinflamatorias y la habilidad de inducir linfocitos T reguladores (LTreg) (1,2). Varias citocinas, como la IL-10 y el TGF- β (*Transforming Growth Factor Beta*), al igual que agentes farmacológicos como la rapamicina, la dexametasona o la vitamina D3 (VD3), inducen células dendríticas con propiedades tolerogénicas *in vitro* (3).

Las células dendríticas generadas a partir de monocitos en presencia de vitamina D3 (CDVD3) presentan un fenotipo tolerogénico estable, caracterizado por la disminución de la expresión de HLA-DR (*Human Leukocyte Antigen - antigen D Related*) y de moléculas coestimuladoras, al igual que un incremento en la relación de las interleucinas secretadas IL-10 e IL-12p70 (4). Además, este perfil de las células dendríticas tolerogénicas se ha relacionado con la inducción de los linfocitos T FoxP3⁺ que secretan IL-10, expresan CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4*) y son capaces de suprimir la proliferación de linfocitos T efectoras, lo cual se asocia con una reacción reguladora (5).

En el 2012, Chu, *et al.*, demostraron que las células dendríticas derivadas de monocitos y generadas en presencia de vitamina D3 tienen un fenotipo y

una función semejantes a las células dendríticas dérmicas (CDD) CD141+, las cuales se consideran como el mayor grupo de células dendríticas productoras de IL-10 residentes en la piel e inductoras de LTreg supresores de inflamación (6). Por lo tanto, estas células dendríticas generadas en presencia de vitamina D3 podrían emplearse como tratamiento celular para enfermedades autoinmunitarias o para evitar el rechazo a los trasplantes.

A pesar de los hallazgos mencionados, ha surgido la controversia en torno a la caracterización de las CDD CD141 reportadas por Chu, *et al.* en el 2012, ya que según el estudio realizado por Haniffa, *et al.*, esta población corresponde a células dendríticas sanguíneas que expresan CD14 relacionadas con monocitos que también expresan CD141 y producen IL-1, IL-6 e IL-10 como reacción a estímulos inflamatorios (7).

Se desconoce qué otras citocinas pueden producirse a partir de las células dendríticas generadas en presencia de vitamina D3 y cómo podrían afectar la capacidad de las células dendríticas de polarizar la respuesta de los linfocitos T vírgenes alogénicos hacia un perfil regulador.

Por lo tanto, en este trabajo se evaluó el efecto de la vitamina D3 tanto en el fenotipo como en la producción de citocinas adicionales a las reportadas tradicionalmente (IL-10 e IL-12p70), así como su capacidad de inducir LTreg a partir de linfocitos T CD4+ vírgenes alogénicos. Los datos obtenidos indicaron que las células dendríticas generadas con vitamina D3 y tratadas con lipopolisacáridos, presentaban un fenotipo 'semimaduro' reflejado en la expresión de CD14 y los bajos niveles de CD83, CD86 y HLA-DR. Su patrón de citocinas secretadas incluyó niveles elevados de IL-1 β , IL-8 e IL-10, comparados con los de las células dendríticas generadas en ausencia de vitamina D3. Además, se observó una tendencia de las células dendríticas inmaduras generadas con vitamina D3 a inducir altos porcentajes de LTreg activados, efecto que disminuyó con su maduración.

Correspondencia:

Luz Stella Rodríguez, Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 N° 40-62, edificio 32, Bogotá, D.C., Colombia

Teléfono: (571) 320 8320, extensión 2790
luz-rodriguez@javeriana.edu.co

Recibido: 16/06/15; aceptado: 19/10/15

Materiales y métodos

Aislamiento de monocitos y generación de células dendríticas

Se tomó una muestra de sangre total de voluntarios adultos sanos que previamente firmaron el consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de la Pontificia Universidad Javeriana.

Las muestras se centrifugaron para obtener el plasma y la fracción celular a partir de la cual se separaron las células mononucleares de sangre periférica, utilizando el gradiente de densidad de Ficoll Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ, USA). Las células se lavaron dos veces con RPMI 1640 (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) con suplemento de 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) y plasma autólogo al 1 % (medio completo). Posteriormente, se resuspendieron en solución amortiguadora de fosfato salino (PBS) con 2 mM de EDTA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) más 0,5 % de albúmina humana (Biotest, Pharma, Dreieich, Germany). Los monocitos se purificaron mediante separación inmunomagnética usando selección positiva con microperlas CD14 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) según las instrucciones del fabricante. Las células CD14+ purificadas (mediana de pureza: 95 %; rango: 91,3-99,2 %; n=8) se usaron para originar las células dendríticas.

Para generar las células dendríticas inmaduras, las células CD14+ se cultivaron durante seis días a una densidad de 1 millón/ml y a 37 °C, y 5 % de CO₂ en medio completo más 1,000 U/ml de GM-CSF e IL-4 (Preprotech, México); en el día 3 se agregaron más citocinas a la misma dosis inicial.

Para la generación de las células dendríticas inmaduras (CDI) en ausencia o en presencia de vitamina D3 (VD3I), en el día 5 se adicionaron volúmenes iguales de etanol absoluto (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), usado como diluyente de la vitamina D3, o 100 nM de vitamina D3 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) dependiendo el diseño del experimento.

Todos los reactivos utilizados fueron negativos para la presencia de lipopolisacáridos, lo cual se verificó utilizando un kit comercial (BioWhittaker, Inc., Walkersville, MD).

En el día 6, el fenotipo de las células dendríticas inmaduras obtenidas se determinó mediante citometría de flujo, usando el siguiente panel de anticuerpos: CD14-V500 (BD Biosciences; Clon

M5E2; Catálogo No. 561391), HLA-DR-PerCP Cy5.5 (BD Biosciences; Clon L243; Catálogo No. 339194), CD83-PE (BD Pharmingen; Clon HB15e; Catálogo N° 556855) y CD86-APC (BD Pharmingen; Clon FUN-1; Catálogo N° 555660).

Después de la tinción, las células se lavaron y se fijaron con paraformaldehído al 1 % (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA), se hizo su recuento en el citómetro de flujo LSRFORTESSA (BD Bioscience, San José, CA, USA) y se analizaron con el programa FACSDiva versión 8.0.

Las células muertas y los restos celulares se excluyeron con base en el análisis de su tamaño. En algunos experimentos se evaluó la expresión de CD274- FITC (BD Pharmingen; Clon MIH1; Catálogo No. 558065) y de CD141-PE (BD Pharmingen; Clon 1A4; Catálogo No. 559781). Se ajustaron los parámetros de lectura del citómetro para el análisis de los experimentos.

Una vez obtenidas las células dendríticas inmaduras, se lavaron, se contaron y se cultivaron en medio completo sin plasma, con 1.000 U/ml de GM-CSF e IL-4 (Preprotech, México) y 1 µg/ml de lipopolisacáridos (LPS de *Escherichia coli*, serotipo 055:B5; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para estimular su maduración o para su respectivo control con PBS, en presencia o en ausencia de 100 nM de vitamina D3 durante 24 horas.

El fenotipo de las células dendríticas maduras se determinó por citometría de flujo usando el mismo panel de anticuerpos descrito anteriormente. Los resultados de la citometría para el fenotipo de las poblaciones de células dendríticas se reportaron como la intensidad media de fluorescencia de cada marcador y como el porcentaje de células que expresaban un marcador o combinaciones de diferentes marcadores.

Medición de citocinas en los sobrenadantes de cultivo de células dendríticas

Los sobrenadantes de cada una de las poblaciones de células dendríticas inmaduras y maduras se almacenaron a -20 °C hasta el momento de descongelarlos para la determinación cuantitativa de IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 y TNFα mediante citometría de flujo, y utilizando la técnica de microesferas del estuche comercial *Cytometric Bead Array Human Inflammation Kit* (BD Biosciences, San José, CA); el análisis se hizo con el programa FCAP Array, versión de Windows (BD Biosciences, San José, CA). El límite de detección dependió de cada citocina analizada y varió entre 1,9 y 7,2 pg/ml.

El TGF- β 1 total se cuantificó mediante ELISA siguiendo las instrucciones del estuche comercial (TGF- β 1, Duoset kit R&D Systems, Minneapolis, MN - límite de detección de 31,2 pg/ml) y se analizó mediante la determinación de la densidad óptica a 450 nm en el lector Thermo Scientific Multiskan EX (Thermo Scientific; Waltham, MA, USA).

Medición de la viabilidad celular mediante la liberación de deshidrogenasa láctica

La pérdida de la viabilidad celular se registró con la medición de la liberación de la deshidrogenasa láctica en el medio de cultivo, utilizando un estuche comercial de Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) y siguiendo las indicaciones del fabricante.

Cocultivo de células dendríticas y linfocitos T CD4⁺ vírgenes alogénicos

Los linfocitos T vírgenes CD4⁺ CD45RA⁺ se purificaron a partir de células mononucleares de sangre periférica mediante separación inmunomagnética por selección negativa, utilizando el estuche comercial *Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit II* (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La mediana de la pureza de la población obtenida fue de 94,7 % y el rango fue de 88,0-95,4 % (n=5).

Las células dendríticas tratadas con lipopolisacáridos durante 24 horas o con el PBS de control, se sometieron a cocultivo en una relación de 1:10 con linfocitos T CD4⁺ vírgenes alogénicos purificados durante siete días a 37 °C + CO₂ al 5 %.

Posteriormente, las poblaciones se recuperaron y se tiñeron con el siguiente panel de anticuerpos: anti CD4-PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences; Clon SK3; Catálogo No. 341654), anti CD25- APC (BD Biosciences; Clon M-A251; Catálogo No. 555434) y anti CD45RA-FITC (BD Biosciences; Clon HI100; Catálogo No. 555488) durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Después del lavado, las células se trataron con solución de fijación y permeabilización (eBioscience, San Diego, CA) durante 30 minutos a 4 °C y se lavaron con 1 ml de solución tampón de lavado. Después, el anticuerpo anti-Foxp3-PE (eBioscience; Clon PCH101; Catálogo No. 12-4776-42) se adicionó e incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, las células se lavaron y resuspendieron en 300 μ l de solución de lavado, y se analizaron en el citómetro de flujo

LSRFORTESSA (BD Bioscience, San José, CA, USA), y se analizaron con el programa FACSDiva, versión 8.0 (BD Bioscience, San José, CA, USA).

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se hicieron con el programa GraphPad Prism, versión 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) mediante pruebas no paramétricas. Las diferencias entre los datos no pareados y los pareados se determinaron con las pruebas de Mann-Whitney y Wilcoxon, respectivamente. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. A menos que se especifique lo contrario, se muestran las medianas de los experimentos.

Resultados

Las células dendríticas generadas en presencia de vitamina D3 presentaron un fenotipo 'semimaduro'.

Con el fin de determinar el efecto de la vitamina D3 sobre el fenotipo de las células dendríticas generadas *in vitro* a partir de monocitos, se evaluó la expresión de moléculas de superficie relacionadas con la activación y la diferenciación. Para ello, se aislaron y cultivaron monocitos CD14⁺ con citocinas de diferenciación en presencia o en ausencia de vitamina D3 durante seis días, para obtener células dendríticas inmaduras (VD3 I-CD I), las cuales se estimularon posteriormente con lipopolisacáridos durante 24 horas.

Tanto en las células dendríticas inmaduras (VD3 I-CD I) como en las estimuladas con lipopolisacáridos (CDLPS-VD3LPS) y sus respectivos controles (CDCX-VD3CX), se evaluó la expresión de CD14, HLA-DR, CD83 y CD86 por citometría de flujo (figura 1A).

Como se esperaba, la maduración con lipopolisacáridos de las células dendríticas generó un incremento significativo en la frecuencia de las células HLA-DR⁺ (figura 1C) y en las que expresaban simultáneamente CD83 y CD86 (figura 1D); sin embargo, la presencia de vitamina D3 generó cambios fenotípicos particulares. El análisis de las poblaciones inmaduras en el día 6 mostró una diferencia estadística en el porcentaje de células CD14⁺, el cual fue mayor en las células dendríticas inmaduras generadas en presencia de vitamina D3 (figura 1B). Asimismo, se evidenció un incremento significativo en el porcentaje de células que expresaban CD14 (figura 1B) y en la intensidad media de fluorescencia (figura 2A) al comparar las células dendríticas no estimuladas (VD3CX Vs.

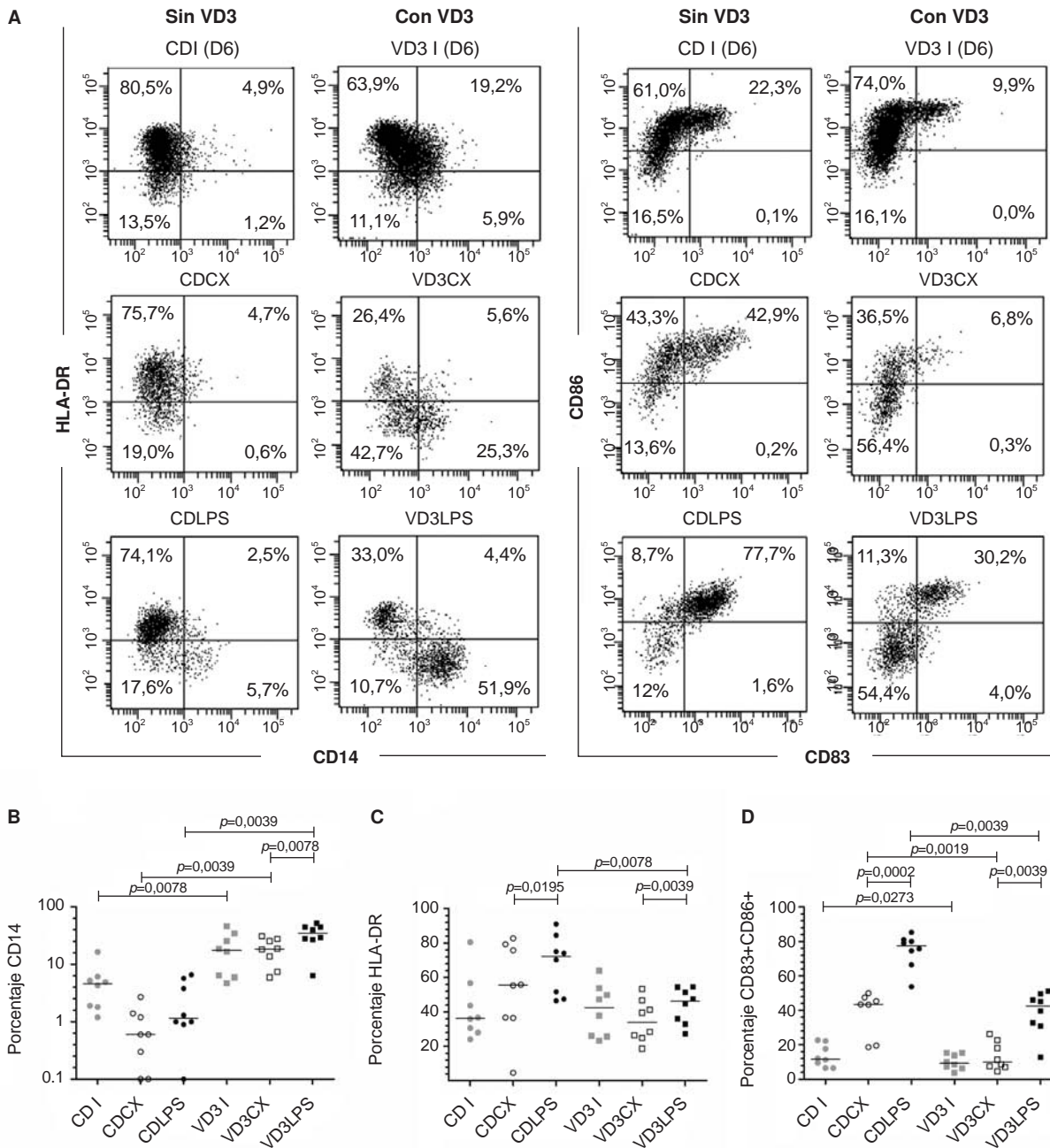


Figura 1. Caracterización fenotípica de las células dendríticas (CD) generadas en ausencia o en presencia de la vitamina D3 (VD3). Se aislaron monocitos de células mononucleares de sangre periférica y se cultivaron durante seis días con IL-4 y GM-CSF para obtener células dendríticas inmaduras (D6). La adición de 100 nM de vitamina D3 al cultivo en el día 5, dio origen a las células dendríticas VD3I. Posteriormente, las células dendríticas generadas en ausencia (CD I) o en presencia de vitamina D3 (VD3 I), se maduraron con lipopolisacáridos (LPS) durante 24 horas. (A) Las gráficas muestran un experimento representativo de los ocho llevados a cabo. Se observa el porcentaje de células que expresaron (B) CD14, (C) HLA-DR y (D) CD83+CD86+.

CDCX) y las estimuladas con lipopolisacáridos (VD3LPS Vs. CDLPS). Estos resultados sugieren que la presencia de vitamina D3 durante el proceso de generación de las células dendríticas mantiene la expresión del CD14, independientemente de la maduración con lipopolisacáridos.

Con respecto a la expresión de HLA-DR, la maduración con lipopolisacáridos reflejó una disminución en el porcentaje de células VD3LPS HLA-DR+ en comparación con las CDLPS (figura 1C). Inesperadamente, la intensidad media de fluorescencia del marcador mostró un leve aumento

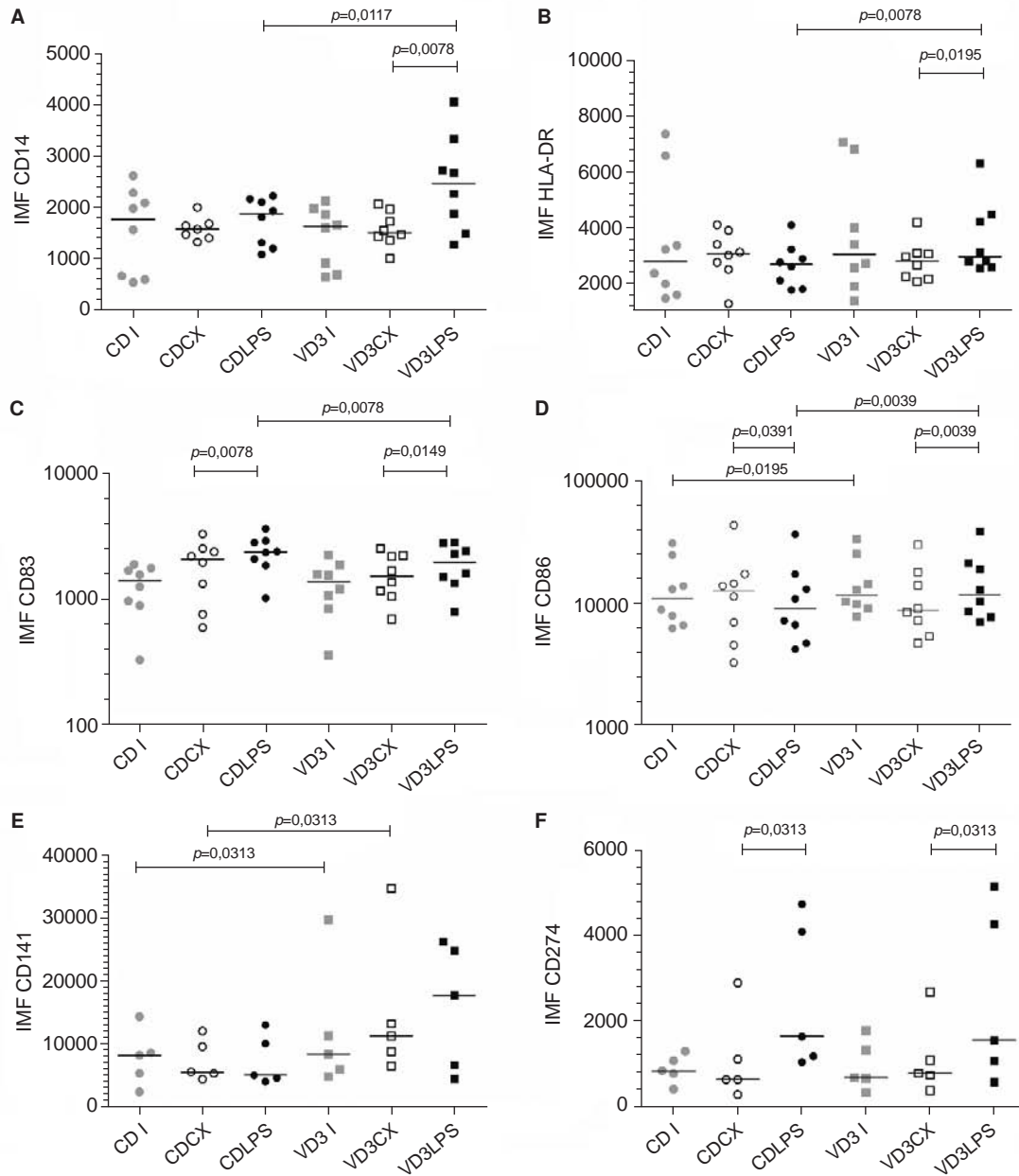


Figura 2. Intensidad media de fluorescencia de los marcadores evaluados. La de los marcadores (A) CD14, (B) HLA-DR, (C) CD83, (D) CD86, (E) CD141 y (F) CD274, se analizó mediante citometría de flujo en las poblaciones sin estímulo y las estimuladas. Cada punto representa un experimento de un total de ocho. La línea horizontal representa la mediana. Las diferencias se determinaron con la prueba de Wilcoxon. El valor de $p < 0,05$ se consideró significativo.

(9,7 %) en la población VD3LPS comparada con la CDLPS (figura 2B). En conclusión, la presencia de vitamina D3 durante la generación de las células dendríticas disminuyó el porcentaje de células dendríticas HLA-DR⁺, pero generó un leve aumento de la expresión del marcador.

En cuanto al porcentaje de células que expresaban simultáneamente CD83 y CD86, se evidenció una disminución significativa de estos marcadores

asociada al tratamiento con vitamina D3 tanto en células inmaduras (VD3I Vs, CDI) como en las estimuladas con lipopolisacáridos (VD3LPS Vs. CDLPS) y sus respectivos controles (VD3CX Vs. CDCX) (figura 1D).

Cuando se analizó la intensidad media de fluorescencia de las CD86 en las poblaciones, se demostró un aumento significativo relacionado con el tratamiento con vitamina D3 en la población

estimulada con lipopolisacáridos (figura 2D), así como una disminución estadística de la intensidad media de fluorescencia de las CD83 (figura 2C) con respecto a las células dendríticas maduras que no se habían generado con vitamina D3. Además, se evaluó el marcador CD141 (n=5, figura 2E), molécula relacionada con las células dendríticas dérmicas CD141+ productoras de IL-10 que pueden generarse a partir del tratamiento con vitamina D3 (8). Los resultados mostraron un incremento significativo en la intensidad media de fluorescencia de las CD141 en las células dendríticas tratadas con vitamina D3 inmaduras en el día 6 (VD3I) y en el 7 (VD3CX), comparadas con las que no habían sido generadas con vitamina D3. Además, se evidenció una tendencia al aumento en la población generada con vitamina D3 y madurada con lipopolisacáridos comparada con la que no había sido tratada con dicha vitamina (CDLPS Vs. VD3LPS).

Con respecto a las moléculas 'coinhibitorias', teniendo en cuenta el papel del *PD-L1* (*Programmed Death-Ligand 1*), también conocido como CD274 (*Cluster of Differentiation 274*), en las células presentadoras de antígeno con características tolerogénicas, se analizó su expresión en las poblaciones de células dendríticas. En los cinco experimentos llevados a cabo se evidenció un incremento significativo de la intensidad media de fluorescencia de este marcador en las células dendríticas maduras con lipopolisacáridos, independientemente de la presencia de vitamina D3 (figura 2F).

La vitamina D3 no indujo cambios en la viabilidad celular, ya que la liberación de deshidrogenasa láctica no se vio alterada por su presencia, en comparación con las células dendríticas generadas en presencia del etanol empleado como vehículo (no se presentan los datos).

Las células dendríticas tratadas con la vitamina D3 y maduras con lipopolisacáridos producen más IL-1 β , IL-8 e IL-10.

Para identificar el perfil de citocinas secretadas por la población de células dendríticas tratadas con vitamina D3, se midieron las citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 y IL-12p70, y los factores TNF- α y TGF- β 1 en los sobrenadantes de cultivo de los experimentos descritos anteriormente (figura 3). En las poblaciones de células dendríticas inmaduras, generadas con o sin vitamina D3, en el día 6 se encontraron niveles similares en todas las citocinas

evaluadas, excepto para la IL-8, pues las células dendríticas generadas en presencia de vitamina D3 presentaron una disminución significativa de dicha citocina en comparación con las células dendríticas generadas con etanol (n=8).

Como se esperaba, en la población de células dendríticas generadas sin vitamina D3, la maduración con lipopolisacáridos incrementó la producción de la mayoría de las citocinas evaluadas (figura 3); sin embargo, las células dendríticas tratadas con vitamina D3 y maduras con lipopolisacáridos secretaron niveles superiores de IL-1 β e IL-8, y, como ya se ha descrito, de IL-10, cuya producción también se incrementó significativamente en las células tratadas con vitamina D3 sin madurar (VD3CX Vs. CDCX) (figura 3A-C).

En cuanto a la producción de IL-6, la presencia de vitamina D3 generó un aumento significativo al comparar las poblaciones no estimuladas con lipopolisacáridos (CDCX Vs. VD3CX) (figura 3D). Al evaluar los niveles de IL-12p70, se observó un aumento significativo asociado a la maduración con lipopolisacáridos únicamente en las células dendríticas generadas sin vitamina D3, y una tendencia a la disminución de su producción al comparar VD3LPS con CDLPS (figura 3F). Con respecto al TGF- β 1, se encontró una disminución significativa (8 %) al comparar las células control (CDCX) con las expuestas a lipopolisacáridos (CDLPS); además, se observó una tendencia a la disminución en los niveles de esta citocina en todas las poblaciones de células dendríticas generadas en presencia de vitamina D3 (n=7) (figura 3G).

Las células dendríticas generadas con la vitamina D3 y maduras con lipopolisacáridos disminuyen su capacidad de inducir LTreg activados (CD4⁺CD45RA^{low}CD25^{hi}FOXP3⁺) a partir de linfocitos T CD4⁺ vírgenes alogénicos.

Dadas las características fenotípicas y funcionales de las células dendríticas tratadas con vitamina D3, se evaluó si esta población en particular podría dirigir la diferenciación de linfocitos T CD4 vírgenes alogénicos hacia LTreg. Para ello, las células dendríticas generadas en ausencia o en presencia de vitamina D3 y no estimuladas y estimuladas con lipopolisacáridos, se sometieron a cocultivo con linfocitos T CD4 vírgenes alogénicos. En el día 7, las células se recuperaron y se marcaron con anticuerpos contra CD4, CD45RA, CD25 y FoxP3 para su análisis fenotípico por citometría de

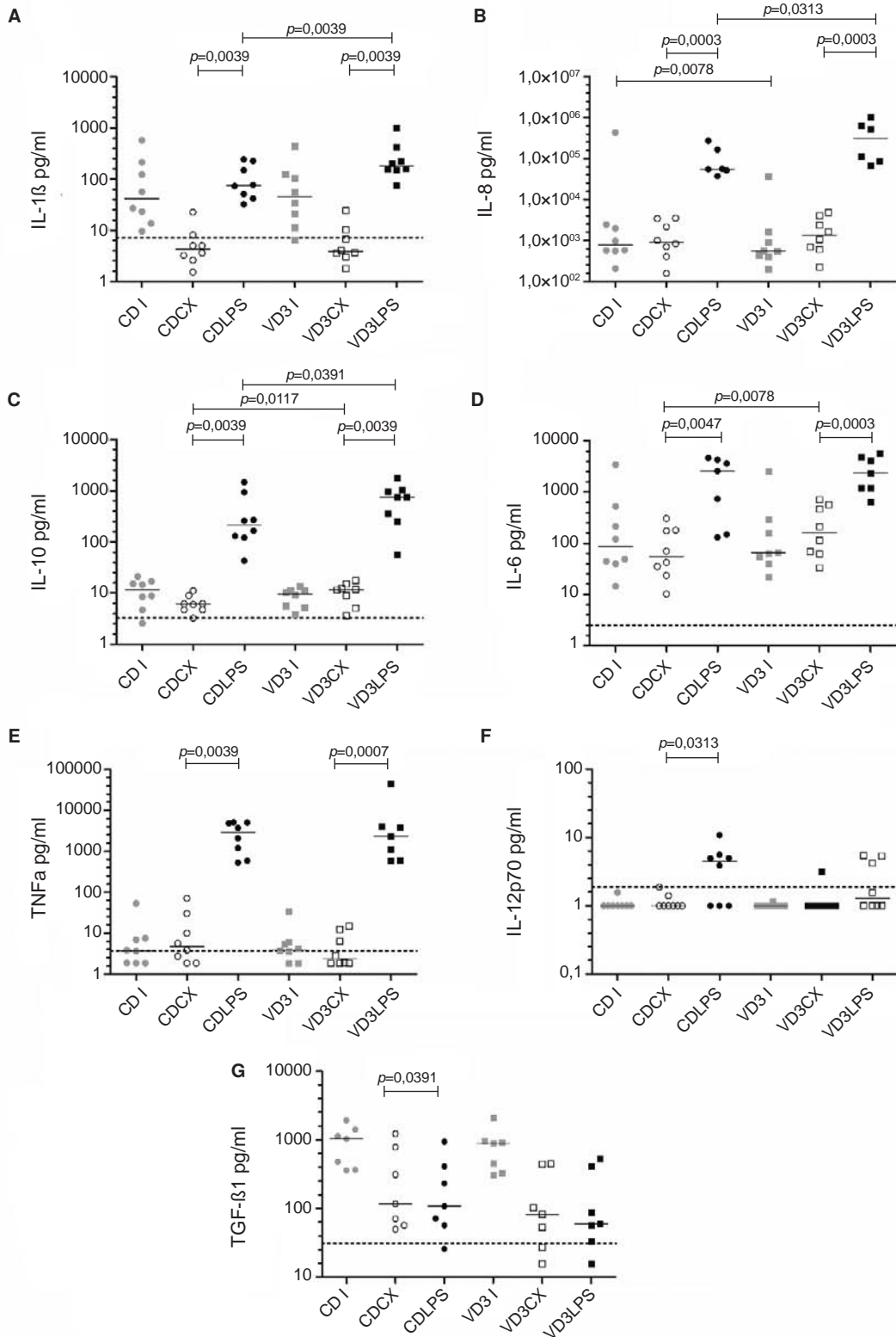


Figura 3. Perfil de citocinas secretadas por células dendríticas con vitamina D3 (CD VD3). Se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo de cada población de células dendríticas y se conservaron a -20 °C hasta la cuantificación de las citocinas (A) IL-1 β , (B) IL-8, (C) IL-10, (D) IL-6, (E) TNF- α , (F) IL-12p70 y (G) TGF β -1. Los datos representan experimentos independientes de un total de seis a ocho. La línea horizontal representa la mediana. Las diferencias entre los datos no pareados y los pareados se determinaron con las pruebas de Mann-Whitney y de Wilcoxon, respectivamente. El valor de $p < 0,05$ se consideró significativo.

flujo. En algunos experimentos se utilizó TGF-β1 más IL-2 recombinante como control positivo de inducción de LTreg (no se presenta el dato).

Los análisis mostraron que ninguna de las condiciones generó cambio en la inducción de LTreg vírgenes (CD4⁺CD45RA^{hi}CD25^{low}FoxP3⁺). Sin embargo, cuando se analizó la frecuencia de los LTreg activados (CD4⁺CD45RA^{low}CD25^{hi}FoxP3⁺), se observó un incremento significativo en los cocultivos generados con células dendríticas sin madurar, en comparación con los que contenían células dendríticas maduras, generadas con o sin vitamina D3 (figura 4), aunque se evidenció una tendencia de aquellas inmaduras generadas la vitamina D3 a estimular un alto porcentaje de LTreg activados. Este efecto no se observó en las células dendríticas tratadas con vitamina D3 y maduras con lipopolisacáridos.

Discusión

En numerosos estudios en modelos de ratón se ha demostrado que las células dendríticas tolerogénicas tienen un gran potencial terapéutico, ya que pueden inhibir el rechazo y prolongar la supervivencia de los aloinjertos, prevenir la enfermedad de injerto contra huésped e inhibir diversas enfermedades autoinmunitarias (9). Estas investigaciones han permitido evidenciar la eficiencia de las células dendríticas tolerogénicas *in vivo*, aprovechando la facilidad de generarlas a partir de monocitos de sangre periférica en cultivos *in vitro* (10). Sin embargo, es importante resaltar que, para que estas células dendríticas se puedan emplear en estudios clínicos en humanos, se debe garantizar su estabilidad fenotípica y funcional,

ya que en un contexto biológico son diversos los factores que pueden interactuar con ellas y alterar las características tolerogénicas, lo cual tiene un efecto directo en la polarización de la respuesta T. Por esta razón, a diferencia de otros estudios, en este modelo se usó una gran concentración de lipopolisacáridos que no afectara la viabilidad celular y permitiera simular un ambiente netamente inflamatorio para, así, evaluar su impacto sobre las características de las células dendríticas generadas con vitamina D3.

En un gran número de publicaciones se demuestra claramente que la vitamina D3 y sus análogos pueden modular el fenotipo y la función de las células dendríticas (1,4-5,7). En algunos de estos estudios se ha comprobado que el tratamiento *in vitro* de células dendríticas generadas de monocitos y moduladas con vitamina D3 conduce a cambios en la expresión de marcadores de maduración y moléculas coestimuladoras. A pesar de las variaciones metodológicas desarrolladas en el presente estudio, los resultados concernientes al efecto de la vitamina D3 en el fenotipo de las células dendríticas coinciden con lo reportado en la literatura científica, ya que estas conservaron el CD14, al igual que una baja expresión de HLA-DR, CD83 y CD86.

Un hallazgo fundamental en este trabajo fue la producción de citocinas promotoras de la reacción inflamatoria (IL-1β e IL-8) por parte de las células dendríticas generadas en presencia de vitamina D3 y maduras con lipopolisacáridos, lo cual es un aspecto fundamental que debe evaluarse si se las quiere emplear terapéuticamente.

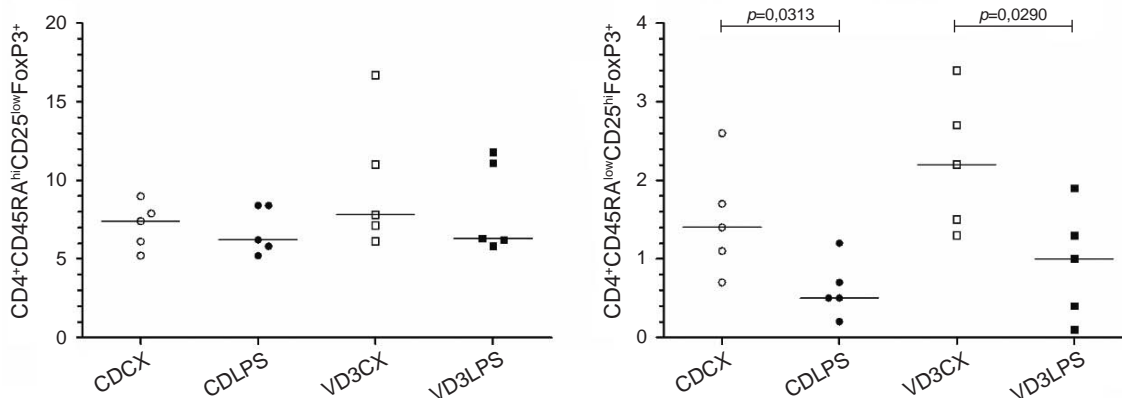


Figura 4. Frecuencia de linfocitos T reguladores (LTreg) generados en cocultivos con células dendríticas (CD). Se obtuvieron LTreg vírgenes (CD4⁺CD45RA^{hi}CD25^{low}FoxP3⁺) y LTreg activados (CD4⁺CD45RA^{low}CD25^{hi}FoxP3⁺) en el cocultivo con células dendríticas generadas en ausencia o en presencia de vitamina D3 (VD3), maduras con lipopolisacáridos (LPS) y sin madurar. Las diferencias entre los datos se determinaron con la prueba de Wilcoxon. Una p<0,05 se consideró significativa.

La inducción de IL-1 β es interesante puesto que esta citocina se ha asociado con la activación y la regulación del inflamósoma (11). Hasta donde se sabe, este es el primer reporte en el que se describe la inducción de esta citocina con células dendríticas generadas en presencia de vitamina D3. Al igual que en este estudio, en un modelo de macrófagos tratados con vitamina D3 se observó la inducción de IL-1 β como reacción a la infección con *Mycobacterium tuberculosis*, así como el incremento del ARNm (12).

Teniendo en cuenta las expectativas sobre un eventual uso de células dendríticas moduladas con vitamina D3 para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias o para evitar el rechazo a los trasplantes, así como el incremento en la producción de IL-1 β que se registró en este estudio frente al estímulo inflamatorio simulado por la alta concentración de lipopolisacáridos, se deben explorar más a profundidad los mecanismos de producción y regulación de la IL-1 β por parte de las células dendríticas generadas con vitamina D3.

La producción predominante de IL-10 en las células dendríticas generadas en presencia de vitamina D3, sin madurar y maduradas, se ha reportado en los estudios de varios autores con protocolos similares (13,14) y, conjuntamente con el fenotipo tolerogénico, se la ha relacionado con la inducción de un grupo de LTreg denominado Tr1 (15).

Asimismo, se encontró un incremento significativo en los niveles de la IL-8 en los sobrenadantes de células dendríticas tratadas con vitamina D3 y maduradas con lipopolisacáridos, en comparación con las células maduradas no tratadas con vitamina D3. Este mismo hallazgo fue reportado en un modelo de células dendríticas tratadas con dexametasona más vitamina D3, lo que sugiere la participación favorable de esta citocina en la migración celular (16). En un estudio del 2013 (17) en un modelo experimental con la línea celular de monocitos humanos THP-1 tratados previamente con un análogo de la vitamina D3 (22-oxicalcitriol; OCT), se observó un aumento en la producción de IL-8 en reacción a varios ligandos de receptores TLR (*Toll-Like Receptors*) y NLR (*Nod-Like Receptors*), siendo mayor la asociada a los ligandos de TLR3, TLR4 y TLR2.

En cuanto a la producción de IL-12p70 y TNF- α , se encontró una tendencia a su disminución en las células dendríticas generadas en presencia de vitamina D3 y maduradas con lipopolisacáridos. La disminución de citocinas promotoras de la

reacción inflamatoria, como la IL-12 y la TNF- α , es una característica descrita claramente en las células dendríticas humanas y de ratón tratadas con vitamina D3, lo cual se asocia con su baja capacidad de inducir reacciones del tipo de Th1 (4-5).

Considerando el papel que tiene el TGF- β 1 en la inducción de LTreg (18), se analizó esta citocina en las poblaciones y se encontró una tendencia a la disminución en las células dendríticas tratadas con vitamina D3, resultado que refleja lo reportado por van der Aar, *et al.*, en su estudio (5), en el cual se determinó el efecto de la vitamina D3 sobre equivalentes de células dendríticas dérmicas y en células de Langerhans generadas *in vitro* a partir de monocitos. Estos autores encontraron que el tratamiento de las células dendríticas dérmicas con vitamina D3 inducía LTreg FoxP3⁻ mediante un mecanismo dependiente de IL-10, mientras que las células de Langerhans inducían Treg FoxP3⁺ mediante TGF- β 1. En el 2001, Canning, *et al.* (19), detectaron una disminución en la producción de TGF- β en un modelo de células dendríticas generadas a partir de monocitos en presencia de 10⁻⁸M de vitamina D3 durante una semana, tal como sucedió en este estudio.

Por otra parte, teniendo en cuenta el papel de las células dendríticas dérmicas caracterizadas por la expresión de CD141 y CD14, por la secreción constitutiva de IL-10 y por la capacidad de inducir LTreg (6), es interesante resaltar cómo, según los resultados de Chu, *et al.* (6), este modelo en el que la vitamina D3 funciona como un inductor del fenotipo y la función de las células dendríticas dérmicas CD141⁺ podría emplearse para obtener gran cantidad de estas células y usarlas en la inducción de tolerancia con fines clínicos.

Con base en un hallazgo controversial reportado en el trabajo de Haniffa, *et al.*, en 2012 (7), con relación al perfil de las citocinas, se planteó que, al ser estimuladas mediante un ligando de TLR3, las células dendríticas dérmicas CD141^{hi} producían gran cantidad de TNF α y, además, disminuían la producción de IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10 cuando eran estimuladas con un ligando de TLR3 o de TLR4, dato que no coincide con lo reportado por Chu, *et al.* (6). Dados estos resultados contradictorios, Haniffa, *et al.*, plantearon que la caracterización de células dendríticas reportadas por Chu, *et al.*, probablemente correspondía a células dendríticas CD14⁺ sanguíneas, las cuales también expresan CD141 y que, según su cuantificación de citocinas, eran las productoras de IL-10, así como de IL-1 β

e IL-6, lo cual refleja en parte el perfil de citocinas registrado en el presente estudio a partir de las células dendríticas obtenidas con la estrategia metodológica planteada por Chu, *et al.*, para generar células dendríticas *in vitro* que semejen las características fenotípicas y funcionales de las células dendríticas dérmicas CD141⁺. Sin embargo, una posible explicación que relaciona las células dendríticas CD14⁺ CD141⁺ sanguíneas y las células dendríticas dérmicas CD141^{hi} aisladas de muestras de piel, es que las primeras son precursoras de las que se encuentran en la dermis (7). Es importante aclarar que Chu, *et al.*, no describen un panel de citocinas más amplio, vacío que en este estudio se quiso aprovechar cuantificando citocinas adicionales que permitieran obtener información sobre la caracterización funcional de las células dendríticas generadas bajo el tratamiento con vitamina D3 y, así, ampliar la hipótesis planteada por Haniffa, *et al.*

Además de lo anotado, en varios estudios se ha reportado que la vitamina D3 promueve la inducción de LTreg por modulación en el fenotipo y la función de las células dendríticas (20). En este estudio se encontró que las células dendríticas generadas en presencia de vitamina D3 sin madurar presentaron una tendencia a inducir con mayor frecuencia LTreg activados; sin embargo, este efecto se vio revertido cuando las células dendríticas maduraron con lipopolisacáridos, lo cual puede explicarse por los cambios funcionales asociados a la producción de citocinas promotoras de estados inflamatorios en este tipo de células, y tendría que evaluarse más detalladamente para su uso en un contexto clínico, con el fin de garantizar la estabilidad de las células dendríticas y de los linfocitos T generados en su presencia.

Se requiere, no obstante, hacer más estudios experimentales para establecer la caracterización funcional de los linfocitos T generados en presencia de células dendríticas moduladas con vitamina D3, ya que el fenotipo regulador asociado a la expresión de CD25 y FoxP3 puede ser inducido en los linfocitos T CD4 vírgenes tras la activación, lo cual dificulta la identificación de la población pura de LTreg FoxP3⁺ (21).

En conclusión, la generación de células dendríticas a partir de monocitos y en presencia de vitamina D3 bajo las condiciones experimentales de este estudio, indujo en ellas un fenotipo 'semimaduro' asociado con la baja expresión de moléculas coestimuladoras y con la conservación del marcador

CD14. Además, al comparar esta población con las células dendríticas generadas sin vitamina D3, se observaron diferencias en el perfil de citocinas secretado; en este sentido, cabe destacar la producción de IL-10 asociada a las células dendríticas tolerogénicas, así como el incremento de IL-1 β e IL-8, descritas como citocinas promotoras de la reacción inflamatoria. Sin embargo, las células dendríticas sin madurar moduladas con vitamina D3 presentaron una tendencia a incrementar la frecuencia de LTreg activados, efecto que se vio revertido al madurarse por la acción de los lipopolisacáridos.

Agradecimientos

A Manuel Franco y Juanita Ángel, del Instituto de Genética Humana de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana, por su aporte a la discusión de los resultados obtenidos, así como al programa de Jóvenes Investigadores e Innovadores de Colciencias, 2012 (ID PPTA 5315).

Conflicto de intereses

Ninguna de los autores declara tener conflicto de intereses de tipo financiero, político o académico para el presente trabajo.

Financiación

Este proyecto fue financiado por la Pontificia Universidad Javeriana (ID PROY 004496).

Referencias

1. **Nikolic T, Roep BO.** Regulatory multitasking of tolerogenic dendritic cells - lessons taken from vitamin d3-treated tolerogenic dendritic cells. *Front Immunol.* 2013;4:1-13. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2013.00113>
2. **Morelli AE, Thomson AW.** Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:610-21. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2132>
3. **Rutella S, Danese S, Leone G.** Tolerogenic dendritic cells: Cytokine modulation comes of age. *Blood.* 2006;108:1435-40. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-03-006403>
4. **Unger WW, Laban S, Kleijwegt FS, van der Slik AR, Roep BO.** Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: Differential role for PD-L1. *Eur J Immunol.* 2009;39:3147-59. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200839103>
5. **van der Aar AMG, Sibiryak DS, Bakdash G, van Capel TMM, van der Kleij HP, Opstelten DJE, et al.** Vitamin D3 targets epidermal and dermal dendritic cells for induction of distinct regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127:1532-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2011.01.068>
6. **Chu CC, Ali N, Karagiannis P, Di Meglio P, Skowera A, Napolitano L, et al.** Resident CD141 (BDCA3)⁺ dendritic cells in human skin produce IL-10 and induce regulatory T cells that suppress skin inflammation. *J Exp Med.* 2012;209:935-45. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20112583>

7. **Haniffa M, Shin A, Bigley V, McGovern N, Teo P, See P, et al.** Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity*. 2012;37:60-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.04.012>
8. **Lyakh LA, Sanford M, Chekol S, Young HA, Roberts AB.** TGF- β and vitamin D3 utilize distinct pathways to suppress IL-12 production and modulate rapid differentiation of human monocytes into CD83+ dendritic cells. *J Immunol*. 2005;174:2061-70. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.174.4.2061>
9. **Iruetagoiena MI, Sepúlveda SE, Lezana JP, Hermoso M, Bronfman M, Gutiérrez MA, et al.** Inhibition of nuclear factor- κ B enhances the capacity of immature dendritic cells to induce antigen-specific tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;318:59-67. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.106.103259>
10. **Hill M, Cuturi MC.** Negative vaccination by tolerogenic dendritic cells in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15:738-43. <http://dx.doi.org/10.1097/MOT.0b013e32833f7114>
11. **Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, et al.** Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*. 2004;430:213-8. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02664>
12. **Verway M, Bouttier M, Wang TT, Carrier M, Calderón M, An BS, et al.** Vitamin D induces interleukin-1 β expression: Paracrine macrophage epithelial signaling controls *M. tuberculosis* infection. *PLoS Pathog*. 2013;9:1-14. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003407>
13. **Penna G, Amuchastegui S, Giarratana N, Daniel KC, Vulcano M, Sozzani S, et al.** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*. 2007;178:145-53. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.178.1.145>
14. **Steinbrink K, Wöfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH.** Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol*. 1997;159:4772-80.
15. **Jonuleit H, Schmitt E.** The regulatory T cell family: Distinct subsets and their interrelations. *J Immunol*. 2003;171:6323-27. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.171.12.6323>
16. **Volchenkov R, Karlsten M, Jonsson R, Appel S.** Type 1 regulatory T cells and regulatory B cells induced by tolerogenic dendritic cells. *Scand J Immunol*. 2013;77:246-54. <http://dx.doi.org/10.1111/sji.12039>
17. **Ikeuchi T, Nakamura T, Fukumoto S, Takada H.** A vitamin D3 analog augmented interleukin-8 production by human monocytic cells in response to various microbe-related synthetic ligands, especially NOD2 agonistic muramyl dipeptide. *Int Immunopharmacol*. 2013;15:15-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2012.10.027>
18. **Jonuleit H, Schmitt E.** The regulatory T cell family: Distinct subsets and their interrelations. *J Immunol*. 2003;171:6323-27. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.171.12.6323>
19. **Canning MO, Grotenhuis K, de Wit H, Ruwhof C, Drexhage HA.** 1- α , 25-dihydroxyvitamin D3 (1, 25(OH) $_2$ D $_3$) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes. *Eur J Endocrinol*. 2001;145:351-7. <http://dx.doi.org/10.1530/eje.0.1450351>
20. **Chambers ES, Hawrylowicz CM.** The impact of vitamin D on regulatory T cells. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2011;11:29-36. <http://dx.doi.org/10.1007/s11882-010-0161-8>
21. **Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, Ho WY, Stray-Pedersen Ar, Ocheltree EL, et al.** Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:6659-64. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0509484103>

ORIGINAL ARTICLE

Medication errors in outpatient care in Colombia, 2005-2013

Jorge E. Machado-Alba, Juan Carlos Moncada, Paula Andrea Moreno-Gutiérrez

Grupo de Investigación en Farmacoepidemiología y Farmacovigilancia,
Universidad Tecnológica de Pereira-Audifarma, S. A., Pereira, Colombia

Introduction: Medication errors outside the hospital have been poorly studied despite representing an important threat to patient safety.

Objective: To describe the characteristics of medication errors in outpatient dispensing pharmacists reported in a pharmaco-surveillance system between 2005 and 2013 in Colombia.

Materials and methods: We conducted a descriptive study by reviewing and categorizing medication error reports from outpatient pharmacy services to a national medication dispensing company between January, 2005 and September, 2013. Variables considered included: process involved (administration, dispensing, prescription and transcription), wrong drug, time delay for the report, error type, cause and severity. The analysis was conducted in the SPSS® software, version 22.0.

Results: A total of 14,873 medication errors were reviewed, of which 67.2% in fact occurred, 15.5% reached the patient and 0.7% caused harm. Administration (OR=93.61, CI 95%: 48.510-180.655, $p<0.001$), dispensing (OR=21.58, CI 95%: 16.139-28.870, $p<0.001$), transcription errors (OR=5.64; CI 95%: 3.488-9.142, $p<0.001$), medicines for sensory organs (OR=2.04, CI 95%: 1.519-2.756, $p<0.001$), anti-infective drugs for systemic use (OR=1.99, CI 95%: 1.574-2.525, $p<0.001$), confusion generated with the name of the drug (OR=1.28, CI 95%: 1.051-1.560, $p=0.014$), and trouble interpreting prescriptions (OR=1.32, CI 95%: 1.037-1.702, $p=0.025$) increased the risk for error reaching the patient.

Conclusions: It is necessary to develop surveillance systems for medication errors in ambulatory care, focusing on the prescription, transcription and dispensation processes. Special strategies are needed for the prevention of medication errors related to anti-infective drugs.

Key words: Medication errors, inappropriate prescribing, adverse drug reaction reporting systems, pharmaco-surveillance, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2693>

Errores de medicación en pacientes atendidos en servicios ambulatorios de Colombia, 2005-2013

Introducción. Los errores de medicación en la atención ambulatoria se han estudiado poco, a pesar de que representan una amenaza importante para la seguridad del paciente.

Objetivo. Describir las características de los errores de medicación en atención ambulatoria reportados por un sistema de farmacovigilancia de Colombia entre el 2005 y el 2013.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio descriptivo en el cual se recopilaron, revisaron y categorizaron los reportes de errores de medicación de pacientes atendidos en un servicio farmacéutico ambulatorio a cargo de una empresa nacional de dispensación de medicamentos, entre enero de 2005 y septiembre de 2013. Se consideraron variables que involucraban el proceso (administración, dispensación, prescripción y transcripción), el medicamento, el tiempo para elaborar el reporte, el tipo de error, su causa y su gravedad. El análisis se hizo con el programa SPSS®, versión 22.0.

Resultados. Se recopilaron 14.873 errores de medicación, de los cuales 67,2 % realmente ocurrió, 15,5 % afectó al paciente y 0,7 % causó daño. Los errores de administración ($p<0,001$; OR=93,614; IC_{95%} 48,510-180,655), de dispensación ($p<0,001$; OR=21,585; IC_{95%} 16,139-28,870), de transcripción ($p<0,001$; OR=5,647; IC_{95%} 3,488-9,142), los relacionados con medicamentos para los órganos de los sentidos ($p<0,001$; OR=2,046; IC_{95%} 1,519-2,756), y con los medicamentos de uso sistémico contra infecciones ($p<0,001$; OR=1,993; IC_{95%} 1,574-2,525), la confusión en el nombre del fármaco ($p=0,014$; OR=1,281; IC_{95%} 1,051-1,560) y los problemas en la interpretación de las prescripciones ($p=0,025$; OR=1,328; IC_{95%} 1,037-1,702), aumentaron el riesgo de que el error afectara al paciente.

Author's contributions:

Paula Andrea Moreno-Gutiérrez drafted the project, and made the statistical analysis of the information, the results and the discussion. Juan Carlos Moncada reviewed the results, the discussion, and the final version of the manuscript.

Jorge Enrique Machado-Alba drafted the project, made the statistical analysis of the information, reviewed the results, the discussion and the final version of the manuscript.

Discusión. Es necesario establecer sistemas de vigilancia específicos para errores de medicación en los servicios ambulatorios, que hagan énfasis en los procesos de prescripción, transcripción y dispensación. Se requieren estrategias específicas para la prevención de los errores de medicación relacionados con antibióticos.

Palabras clave: errores de medicación, prescripción inadecuada, sistemas de registro de reacción adversa a medicamentos, farmacovigilancia, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2693>

A medication error is any preventable event that may cause or lead to inappropriate medication use or patient harm, related to unwise or inadequate professional practice from the moment of prescription to medical order fulfillment (1,2). These errors include inadequate selection of the drug, dose or route of administration, therapy length or incorrect selection according to the potential harm related to the characteristics or comorbidities of the patient (3,4).

There is strong evidence that all medication error problems seem to be bigger outside the hospital. However, most research has focused on hospitals and the lack of evidence about medication errors in ambulatory care does not allow for an estimation of the incidence and features of such errors that could serve as basis for the development of prevention strategies (3).

Most studies are limited to a specific population or medication error type; in 2003 in the United States, four mistakes per 250 prescriptions per pharmacy/day occurred in the ambulatory setting (1). That same year in México, prescription errors accounted for 15.6% and dispensing errors for 0.4% of all negative outcomes associated with medication (NOM) detected in ambulatory patients (5). In 2013, in Germany the NOM were found in 18.0% of all ambulatory patients and 11.2% of all prescriptions, of which 39.0% occurred during the prescription process. However, 95.0% of all NOM detected could have been solved partially or completely during the initial pharmacy visit (6).

Colombian pharmaco-surveillance system only covers adverse drug events and, therefore, the nation lacks programs and statistics about medication errors. In this context, the aim of this study was to describe the characteristics of all the medication errors in ambulatory pharmacy

settings reported to a pharmaco-surveillance system gathering information from patients of the Colombian health system (*Sistema General de Seguridad Social en Salud, SGSSS*) between 2005 and 2013.

Materials and methods

A descriptive study was carried out to gather information on medication errors that occurred between January 1st, 2005 and September 12, 2013 on ambulatory pharmacies owned by the company Audifarma, S.A, which dispenses medications prescribed by physicians to 6.5 million people affiliated to different health care providers. The reports were submitted by the health professional (physician, pharmacist, nurse) that detected the error through an electronic surveillance system and then reviewed by a pharmacist, with the support of a physician specialized on pharmacoepidemiology if needed. The review by the pharmacists is linked to the national pharmaco-surveillance programme of Audifarma, S.A., which periodically reports results to the (*Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, Invima*).

Variables included in the surveillance system were: 1) date of occurrence and report; 2) time delay for the report, 3) place of occurrence (city and pharmacy); 4) process involved (administration, dispensing, prescription and transcription); 5) ordered drug; 6) wrong drug; 7) moment of detection; 8) classification by error type and severity according to the taxonomy developed by the National Coordinating Council for Medication Error Reporting and Prevention (NCCMERP) (7) (table 1); 9) contact between the error medication and the patient, and 10) consumption of the drug by the patient. Medicines were grouped by the time of reporting, according to the Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) classification.

Information was gathered into a database in Excel 2010 and analyzed using the IBM SPSS® Statistics software, version 22.0 for Windows (IBM, USA). An exploratory data analysis was performed initially, then χ^2 tests were used to select variables significantly related to the primary

Corresponding author:

Jorge Enrique Machado-Alba, Calle 105 N° 14-140, Pereira, Colombia

Teléfono: (310) 832 6970; fax: (576) 313 7822

machado@utp.edu.co

Received: 30/01/15; accepted: 22/10/15

Table 1. Severity of medication errors, Colombia, 2005-2013

Severity of medication errors	n	%
A. Circumstances or events that have the capacity to cause error	4,879	32.8
B. An error occurred but the error did not reach the patient	7,695	51.7
C. An error occurred that reached the patient, but did not cause patient harm	2,136	14.4
D. An error occurred that reached the patient and required monitoring to confirm that it resulted in no harm to the patient and/or required intervention to preclude harm	84	0.6
E. An error occurred that may have contributed to or resulted in temporary harm to the patient and required intervention	64	0.4
F. An error occurred that may have contributed to or resulted in temporary harm to the patient and required initial or prolonged hospitalization	11	0.1
G. An error occurred that may have contributed to or resulted in permanent patient harm	0	0.00
H. An error occurred that required intervention necessary to sustain life	2	0.01
I. An error occurred that may have contributed to or resulted in the patient's death	2	0.01

outcome (reaching the patient), that were later used to create a logistic regression model. A p value of <0.05 was considered to be significant. The research was reviewed by the Bioethics Committee of the *Universidad Tecnológica de Pereira* (Pereira, Colombia), and it was approved as “research without risk” following the principles of the Helsinki’s Declaration.

Results

At the time of observation, 14,873 medication errors were reported in 362 ambulatory pharmacies from 71 cities in 21 states of Colombia, most from Bogotá (n=8,917; 60.0%), Antioquia (n=1,304; 8.8%) and Valle del Cauca (n=919; 6.2%). Errors were reported on the day of occurrence in 21.0% of the cases (n=3,116), and 70.4% (n=10,463) of errors were detected between the first and tenth day; the median time for detection was four days (interquartile range: 12; range: 0-390 days). On average, 1.06 errors were notified for every 10,000 prescriptions.

Errors in category A, B and C comprised 98.9% of the total submitted records (n=14,710) (table 1), while 67.2% of all the errors reported really occurred (n=9,994) (categories B to I), of which 23.0% (n=2,299) reached the patient (categories C to I), and the medication was used by 64.1% (n=1,475) of these patients. Approximately 3.4% (n=79) of these cases resulted in harm; in four of the cases (5.1%) (categories G to I) the harm was permanent and might have contributed or been related to the death of two patients (category I). The severity of medication errors is shown in table 1.

The most common process in which errors actually occurred (categories B to I) was dispensation (55.5%; n=5,548), followed by prescription (40.1%; n=4,006), transcription (3.6%; n=355) and administration

(0.9%; n=85). Most errors that reached the patient (n=2,113; 91.9%) and that caused harm (n=72; 91.1%) occurred in the dispensation process. The report rate increased through time until 2011, at which point it started to decrease (figure 1).

Errors in medication name, concentration, dosage form and quantity were the most common. Generally, medication errors were detected during medical prescription review (37.1%), while almost half (48.1%) of those that caused harm were detected by the patient, as shown in table 2.

There were 14,826 reports of 630 substances (table 3) and 268 therapeutic subgroups; eleven of these errors involved multiple medication and forty-seven, illegible prescriptions in which drug identification was not possible. As shown in figure 2,

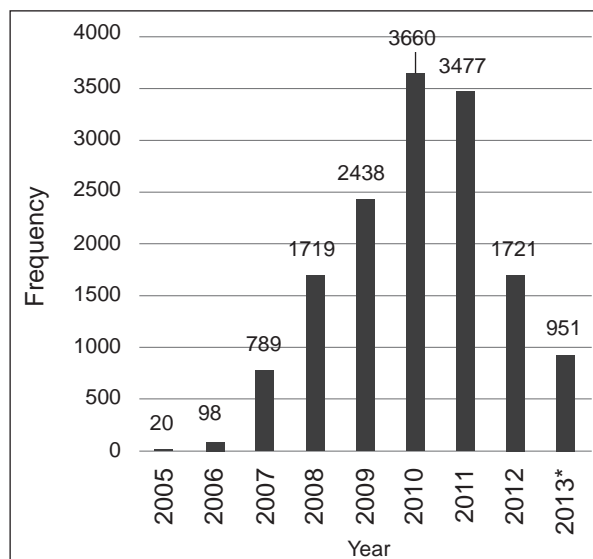


Figure 1. Medication errors reports by year of occurrence, 2005-2013, Colombia
*January to September

Table 2. General characteristics of medication errors, Colombia, 2005-2013

	All errors (A-I)	Reached patients (C-I) n=2299	Caused harm (E-I) n=79
Type of medication error			
Wrong concentration	32.3	38.1	22.0
Improper dose/quantity	26.5	16.9	16.0
Wrong drug	21.2	27.0	48.0
Incomplete formula	3.7	0.9	0.0
Wrong patient	3.6	4.0	2.0
Wrong route	3.5	2.0	2.0
Extra drug	3.4	7.1	4.0
Wrong dosage form	3.2	2.6	4.0
Unreadable formula	2.4	1.2	0.0
Wrong technique	0.01	0.1	2.0
Process where the medication error was detected			
Medical prescription review	37.1	32.6	8.9
Dispensation	31.1	3.0	2.5
By the patient	11.3	27.1	48.1
Delivery or posterior	6.4	20.6	12.7
Enlistment	6.2	0.5	0.0
Patient review	5.0	6.2	8.9
Other	2.4	7.2	0.0
Medical follow-up	0.2	1.5	3.8
Dosing	0.2	0.3	0.0
Emergency room visit	0.1	1.0	15.2

Table 3. Most reported drugs in medication errors, Colombia, 2005-2013

All errors (A-I) (n=14,826)	%	Reached patients (C-I) (n=2,299)	%	Caused harm (E-I) (n=79)	%
Paracetamol	3.1	Cefalexin	2.4	Prednisolone	8.3
Metronidazole	3.0	Metronidazole	2.1	Butyl scopolamine	4.2
Losartan	2.7	Dexamethasone and anti-infective agents	1.9	Gemfibrozil	4.2
Levothyroxine sodium	2.7	Dicloxacilin	1.8	Metronidazole	4.2
Enalapril	2.1	Amoxiciline	1.8	Metoclopramide	2.8
Loratadine	2.0	Diphenhydramine	1.8	Insulin (human)	2.8
Amoxiciline	1.9	Nifedipine	1.7	Thiamine (vit. B1)	2.8
Metoprolol	1.7	Levothyroxine sodium	1.6	Enalapril	2.8
Chlorpheniramine	1.7	Ciprofloxacin	1.6	Medroxyprogesterone	2.8
Metoclopramide	1.6	Losartan	1.3	Levothyroxine sodium	2.8

66.8% of the errors were related to five ATC groups: C, A, N, R and J. The prescribed drug was different than the selected one in 43.3% of medication errors (n=6,420), of which 77.5% (n=4,974) were from a different subgroup, and 47.7% (n=3,061) were from a different ATC group. Finally, 20.3% (n=1,601) of the mismatched drugs reached the patient.

Multivariate analysis showed that medication errors during the administration, dispensation and transcription processes, sensory organs medications, antibacterials for systemic use, wrong medication name, and concentration, significantly increased the risk for the drug reaching the patient (categories B to I). Conversely, being cared for in Bogotá and wrong dosage form were found to diminish the risk of the error reaching the patient (table 4).

Errors reported in the database were analyzed and corrected, if possible, in the moment of detection by a pharmacist. Actions to prevent further similar errors were also considered and executed.

Discussion

The construction of a national reporting system for medication errors covering as many ambulatory and medical institutions as possible is the first step towards the creation of policies and local actions aimed at preventing medication errors. Most work around medication errors focuses on prevention inside the hospital, but this study shows the relevance of including ambulatory pharmacies in the strategies for medication errors prevention, as they represent a potential risk for patients (1), even though most errors reported were mild.

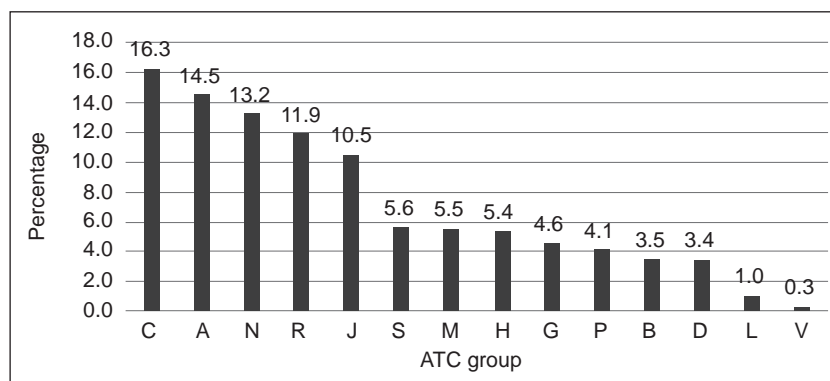


Figure 2. Medication errors by ATC group in ambulatory settings, Colombia, 2005-2013

C: Cardiovascular system; A: Alimentary tract and metabolism; N: Nervous system; R: Respiratory system; J: Anti-infective agents for systemic use; S: Sensory organs; M: Musculo-skeletal system; H: Systemic hormonal preparations excluding sex hormones and insulin; G: Genito-urinary system and sex hormones; P: Antiparasitic products, insecticides and repellents; B: Blood and blood forming organs; D: Dermatological medications; L: Antineoplastic and immunomodulating agents; V: Various

Table 4. Multivariate analysis with variables associated significantly to the occurrence of errors that reach the patient in Colombia during 2005-2013

Variables	n	%	p	OR	CI 95%
Process					
Administration	64	75.29	<0.001	87.49	48.58-171.72
Dispensation	2,113	38.09	<0.001	20.67	15.4-28.02
Transcription	47	13.24	<0.001	5.51	3.38-9.00
ATC group					
Sense organs	203	24.43	<0.001	2.02	1.47-2.78
Anti-infective drugs for systemic use	377	24.15	<0.001	1.98	1.52-2.57
Type					
Wrong concentration	614	15.94	0.05	1.29	1.00-1.66
Wrong drug name	435	17.21	0.01	1.43	1.11-1.86
Wrong dosage form	191	8.18	0.01	0.67	0.50-0.90
Occurrence location					
Bogotá	724	8.12	<0.001	0.61	0.49-0.75

The characteristics of the drug (wrong concentration, dose, quantity and drug) were involved in 80.0% of all errors, 82.0% of those that reached the patient and 86.0% of those that caused harm, contrary to the pharmacopeia report from the United States (US), that stated omission errors as the leading type, while only a small number of errors related to the drug (1,8). Look-alike sound-alike drug names have been identified as a clear cause of medication errors and the strategies to avoid them include both pharmacy practices (e.g., avoid storing drugs by alphabetical order and create “flags” in electronic dispensing systems) and drug labeling regulations to prevent confusions (9,10).

The medication errors found in this study were less severe than those reported in the USA, where 91.3% actually occurred and of those, 64.0% reached the patient (against 67.2% and 23.0% in

Colombia, respectively), while in both cases a low number of errors caused damage to the patient (3.0% Vs. 0.7%). Further studies are required to determine if this difference is explained by underreport of serious medication errors or more effective functioning of the program, since the errors are reported through surveillance and the rate of report is unknown. The overall percentage of errors reaching the patient (15.5%) could be explained by the difference between a hospital and an ambulatory environment, where the interaction between staff and patient is lower at all stages of drug consumption (1).

Moreover, medication errors that occur in ambulatory settings require different systems for vigilance and control. Efforts should be aimed at preventing errors during the distribution phase, which is the last contact between the health care personnel and

the patient in outpatient settings, and was linked to almost all errors that reached the patient and caused harm.

Administration errors comprised only 0.9% of the total, significantly less than studies performed previously in health institutions in US, Spain, Iran and Southeast Asian countries, which reported percentages between 15.2% and 88.6% (1,10-13). Nevertheless, three quarters of the administration errors that occurred reached the patient. These types of errors have been generally associated with nursing actions (14), and related to factors like a heavy workload, lack of knowledge, wrong calculations and distractions related to work environment in hospitals (13,15), while their occurrence in outpatient care may be related to inadequate prescription by the physician.

In contrast to our findings, more than half (59.1%) of the medication errors that reached the patient in a study performed in Danish community pharmacies were related to the transcription phase. These errors were mainly caused by handwritten prescriptions, similarities in packages or names, "traps" that lead to confusion or misunderstanding of prescriptions, lack of effective control (errors that are not detected by the pharmacist) and lack of concentration caused by interruptions (10). Despite this difference, the prevention of errors during prescription and transcription phases has a significant impact on the incidence of medication errors because problems related to handwritten medical prescriptions have been identified as inducing medication errors (2,16).

Another important strategy for the prevention and detection of medication errors are electronic prescription systems, that offer the possibility of connecting all steps in patient care in addition to preventing errors related to handwriting, dosing interval, dose, and drug interactions, and decreasing errors that happen during transcription; however, in many instances access to this device may be limited (16,17).

In this study, the main drugs involved in medication errors matched the drugs most used for the treatment of common illnesses like chronic diseases, pain and infections. This is similar to data found in Germany, where antibiotics, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), β -blocking agents and inhibitors of the renin-angiotensin system represent 35.3% of NOM detected in ambulatory dispensing. Even when these medications have wide security profiles, they require special attention due to their frequent use (6).

The Agency for Health Research and Quality (AHRQ) identified anti-infective agents as the pharmaceutical group most associated with drug adverse reactions, and different studies have shown these drugs to be among the medications most frequently involved in hospital and ambulatory medication errors (6,18-21). Additionally, in this work they increased the risk of reaching the patient. This pharmaceutical group requires specific approaches that take into consideration the dosage form, monitoring and dissemination of clinical practice guidelines, electronic prescribing systems and surveillance of all processes involved (2,22).

None of the ATC principles stood above the others significantly; moreover, the similar frequency of the ATC groups C, A, N, R and J was probably related to the frequency of use of different groups of medications in ambulatory care. On the other hand, medicines for sensory organs were involved in a small proportion of errors, but they were twice likely to reach the patient than other drugs, therefore, the dosage form must be evaluated and additional risk factors should be identified in order to implement corrective and preventive actions.

Three quarters of the medication errors happened in the biggest states and in the country's capital, where, despite the fact that pharmacies cover a large part of the territory, there is evidence that they have stricter monitoring programs and the staff is watchful and aware of the importance of notification. This may help to explain why having a prescription filled in Bogotá was found to be a protective factor for the error reaching the patient because of frequent reporting of all kinds of errors, while in other cities, only more severe errors were reported.

Based on the findings of this study, we can say that the most common medication errors in ambulatory practice were related to the dispensing and prescription processes, they were of low severity and usually did not reach the patient. On the other hand, medicines for sensory organs, anti-infective agents for systemic use, wrong medicine name or concentration were all identified as error characteristics that increase the risk of the drug reaching the patient.

Medication errors included in this paper were limited to those submitted on a self-report database, which included some of the errors but did not detect the totality of the actual errors that occurred. Besides, the final consequences in harmed patients and corrective measures taken after reviewing the error were not always recorded and, therefore, not

reported. These results are applicable to groups of population with similar socio-demographic characteristics and health insurance affiliation.

According to our results, the creation of a database that follows NCCMERP standards to gather the reports of medication errors occurring in different national institutions would improve health staffs' knowledge and awareness about this issue (1), and increase error detection. These programs should also include the continuous involvement of the pharmacist in the entire process of medication use and the development of systems for evaluation and control of factors that are determinant of severity, with emphasis on high-risk operative procedures and medicines. Finally, it is necessary to improve training and reporting of medication errors, especially in decentralized settings.

Conflicts of interest

The ideas and opinions expressed are the sole responsibility of the authors. No sources of funding were used in the preparation of this article. The authors have no conflicts of interest directly relevant to the content of this article.

Financial support

This research received support from Universidad Tecnológica de Pereira, and Audifarma, S. A.

References

1. Santell JP, Hicks RW, McMeekin J, Cousins DD. Medication errors: Experience of the United States Pharmacopeia (USP) MEDMARX reporting system. *J Clin Pharmacol*. 2003;43:760-7. <http://dx.doi.org/10.1177/0091270003254831>
2. Benjamin DM. Reducing medication errors and increasing patient safety: Case studies in clinical pharmacology. *J Clin Pharmacol*. 2003;43:768-83. <http://dx.doi.org/10.1177/0091270003254794>
3. Bootman JL, Wolcott J, Aspden P, Cronenwett LR. Preventing medication errors: Quality Chasm Series. Danvers, USA: National Academies Press; 2006.
4. Keers RN, Williams SD, Cooke J, Ashcroft DM. Prevalence and nature of medication administration errors in health care settings: A systematic review of direct observational evidence. *Ann Pharmacother*. 2013;47:237-56. <http://dx.doi.org/10.1345/aph.1R147>
5. Díaz GE, Lázaro LA, Horta HA. Analysis of pharmaceutical intervention in outpatient pharmacy department. *Farm Hosp*. 2012;37:295-9. <http://dx.doi.org/10.7399/FH.2013.37.4.588>
6. Nicolas A, Eickhoff C, Griese N, Schulz M. Drug-related problems in prescribed medicines in Germany at the time of dispensing. *Int J Clin Pharm*. 2013;35:476-82. <http://dx.doi.org/10.1007/s11096-013-9769-9>
7. The National Coordinating Council for Medication Error Reporting and Prevention. NCC MERP: The first ten years "defining the problem and developing solutions". Accessed on: January 2, 2014. Available at: <http://www.nccmerp.org/pdf/reportFinal2005-11-29.pdf>.
8. Gautam PL. Minimizing medication errors: Moving attention from individual to system. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. 2013;29:293-4. <http://dx.doi.org/10.4103/0970-9185.117037>
9. Berman A. Reducing medication errors through naming, labeling, and packaging. *J Med Syst*. 2004;28:9-29. <http://dx.doi.org/10.1023/B:JOMS.0000021518.60670.10>
10. Knudsen P, Herborg H, Mortensen AR, Knudsen M, Hellebek A. Preventing medication errors in community pharmacy: Root-cause analysis of transcription errors. *Qual Saf Health Care*. 2007;16:285-90. <http://dx.doi.org/10.1136/qshc.2006.022053>
11. Mansouri A, Ahmadvand A, Hadjibabae M, Kargar M, Javadi M, Gholami K. Types and severity of medication errors in Iran; a review of the current literature. *Daru*. 2013;21:49. <http://dx.doi.org/10.1186/2008-2231-21-49>
12. Merino P, Martín MC, Alonso A, Gutiérrez I, Álvarez J, Becerril F, et al. Medication errors in Spanish intensive care units. *Med Intensiva*. 2013;37:391-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medin.2012.11.002>
13. Salmasi S, Khan TM, Hong YH, Ming LC, Wong TW. Medication errors in the Southeast Asian countries: A systematic review. *PLoS One*. 2015;10:e0136545. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0136545>
14. Carlton G, Blegen MA. Medication-related errors: A literature review of incidence and antecedents. *Annu Rev Nurs Res*. 2006;24:19-38.
15. Ambrosio L, Pumar-Méndez MJ. The role of occupational context factors in medication administration errors. *An Sist Sanit Navar*. 2013;36:77-85.
16. Oliven A, Michalake I, Zalman D, Dorman E, Yeshurun D, Odeh M. Prevention of prescription errors by computerized, on-line surveillance of drug order entry. *Int J Med Inform*. 2005;74:377-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmedinf.2005.03.010>
17. Aronson JK. 50 - Medication errors. *Side Effects of Drugs Annual*. 2010;32:903-22. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-6080\(10\)32050-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-6080(10)32050-2)
18. Espinosa JC. Frecuencia y caracterización de los errores de medicación en un servicio de hospitalización de una clínica en Cali, Colombia. *Rev Colomb Cienc Quím Farm*. 2013;42:5-18.
19. Machado-Alba JE, Ossa-Ochoa L, Lotero-Jaramillo N, Valencia-Rojas A. Identification of medication errors in a first level hospital of Pereira, Colombia. *Rev Fac Med* 2013;61:267-73.
20. Gonzales K. Medication administration errors and the pediatric population: A systematic search of the literature. *J Pediatr Nurs*. 2010;25:555-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pedn.2010.04.002>
21. Engum SA, Breckler FD. An evaluation of medication errors - The pediatric surgical service experience. *J Pediatr Surg*. 2008;43:348-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2007.10.042>
22. Jeetu G, Girish T. Prescription drug labeling medication errors: A big deal for pharmacists. *J Young Pharm*. 2010;2:107-11. <http://dx.doi.org/10.4103/0975-1483.62218>

ARTÍCULO ORIGINAL

Asociación entre la fuerza de las piernas y el área de sección muscular transversal del músculo cuádriceps femoral y el grado de actividad física en octogenarios

Pedro Á. Latorre-Román, Juan Manuel Arévalo-Arévalo, Felipe García-Pinillos

Departamento de Expresión Corporal, Universidad de Jaén, Jaén, España

Introducción. El envejecimiento es un proceso fisiológico complejo cuya principal característica es la progresiva pérdida de funcionalidad, lo que es posible retardar o atenuar mejorando el estado físico.

Objetivo. Analizar la asociación entre la fuerza de las piernas y el área de sección muscular transversal del músculo cuádriceps femoral, así como el nivel de actividad física en octogenarios.

Materiales y métodos. Participaron 32 personas mayores de 80 años (hombres: $82,80 \pm 2,09$ años; mujeres: $83,77 \pm 4,09$ años) funcionalmente autónomas. Para su evaluación se emplearon el índice de Barthel, el *Yale Physical Activity Survey* y la prueba de sentarse y levantarse.

Resultados. Se encontraron diferencias significativas entre sexos en la variable de área muscular ($p < 0,001$), en la prueba de sentarse y levantarse ($p = 0,028$) y el índice de paseo ($p = 0,029$), con valores superiores en los varones. El área muscular y la prueba de sentarse y levantarse se correlacionaron de manera significativa con el índice de paseo ($r = 0,445$, $p < 0,005$ y $r = 0,522$, $p < 0,001$, respectivamente), y con el índice de actividad total semanal ($r = 0,430$, $p < 0,005$ y $r = 0,519$, $p < 0,001$, respectivamente). En el modelo de regresión lineal múltiple de este último índice, el área muscular y la prueba de sentarse y levantarse, solo esta última se comportó como variable predictora.

Conclusiones. La fuerza muscular y la masa muscular del músculo cuádriceps mostraron una asociación significativa con el grado de actividad física en personas mayores. La fuerza muscular de las piernas fue un indicador útil para revelar la masa muscular y el grado de actividad física en estas personas, lo cual tiene relevancia en la práctica clínica.

Palabras clave: anciano, índice de masa muscular, extremidad inferior, actividad motora.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2654>

Association between leg strength and muscle cross-sectional area of the quadriceps femoris with the physical activity level in octogenarians

Introduction: Aging is a complex physiological process whose main feature is the progressive loss of functionality, which may be delayed or attenuated by improving physical fitness.

Objective: To determine the association between leg strength and the muscle cross-sectional area of the quadriceps femoris in relation to physical activity level in the elderly.

Materials and methods: Thirty-two functionally autonomous people over 80 years (men: 82.80 ± 2.09 years; women: 83.77 ± 4.09 years) participated in this study. The Barthel Index, the Yale Physical Activity Survey and the Chair Stand Test were the instruments used.

Results: There were significant differences between sexes in muscle area ($p < 0.001$) in the Chair Stand Test ($p = 0.028$) and the walk index ($p = 0.029$), with higher values in men. The muscle area and the Chair Stand Test correlated significantly with the walk index ($r = 0.445$, $p < 0.005$, and $r = 0.522$, $p < 0.001$, respectively) and the total weekly activity index ($r = 0.430$, $p < 0.005$, and $r = 0.519$, $p < 0.001$, respectively). In the multiple linear regression models for the total weekly activity index, muscle area and the Chair Stand Test, only the latter behaved as a predictor variable.

Conclusions: Muscle strength and muscle mass of quadriceps showed a significant association with the physical activity level in older people. Leg muscle strength was useful to reveal muscle mass and physical activity level in older people, which is relevant as a clinical practice indicator.

Key words: Aged, body mass index, lower extremity, motor activity.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2654>

Contribución de los autores:

Pedro Á. Latorre-Román: diseño del estudio, análisis estadístico y redacción del artículo

Juan Manuel Arévalo-Arévalo: diseño del estudio y recolección de datos

Felipe García-Pinillos: redacción del artículo y recolección de datos

El envejecimiento es un proceso fisiológico complejo cuya principal característica es la progresiva pérdida de funcionalidad, lo cual puede retardarse o atenuarse si se mejora la salud y el buen estado físico y mental, se evitan conductas de riesgo (consumo de tabaco, consumo excesivo de alcohol, exposición excesiva al sol y obesidad), se adopta la práctica habitual del ejercicio físico y se sigue una dieta saludable (1). Las limitaciones funcionales, definidas como la restricción de las capacidades físicas y mentales que se requieren para efectuar las actividades y tareas de una vida independiente, son importantes predictores de la mortalidad, la morbilidad y la discapacidad en el adulto mayor (2).

El envejecimiento se ha relacionado con la fragilidad y la limitación funcional debido a tres factores: el proceso biológico irreversible, el 'desacondicionamiento' debido al estilo de vida sedentario y los efectos de la comorbilidad (3). La reducción de la masa y la fuerza del músculo esquelético asociada con la edad, se define como sarcopenia (4). La disminución de la masa muscular es más prominente en los miembros inferiores (5).

Por otra parte, la producción de la fuerza máxima también disminuye con la edad y contribuye a la dependencia física y a la mortalidad (6). La dinapenia, término que también se utiliza para describir la pérdida de la fuerza muscular y la potencia relacionada con la edad (7), predispone a los adultos mayores a un mayor riesgo de limitaciones funcionales, discapacidad, morbilidad y mortalidad (7-10). Es probable que los déficits subclínicos en la estructura y la función del sistema nervioso y el deterioro en las propiedades de generación de fuerza del músculo esquelético sean antecedentes de la dinapenia (7).

En diversos estudios longitudinales se ha demostrado que a partir de los 75 años la fuerza se pierde a un ritmo de 3,4 % anual en los hombres y de 2,5 a 3 % en las mujeres; asimismo, los cambios en la fuerza muscular ocurren dos a cinco veces más rápidamente que la pérdida de masa, por lo tanto, la pérdida de fuerza es un mayor riesgo para la discapacidad y la muerte que la pérdida de masa

muscular (11). En una reciente revisión, Schaap, *et al.* (12), revelaron una importante asociación entre la fuerza muscular y la reducción de la funcionalidad en personas mayores. Se ha comprobado que la fuerza de extensión de la rodilla en relación con el peso corporal está asociada de forma relevante con la función física en personas de más de 75 años (13), específicamente, con la velocidad de la marcha (14). En este sentido, Takata, *et al.*, han señalado la importancia de evaluar y conocer el estado de la condición física de las personas mayores, por ser un excelente indicador de la calidad de vida (15). En este caso, la evaluación de la fuerza de las piernas puede ser un factor que se debe tener en cuenta para determinar la funcionalidad y el grado de actividad física de las personas mayores.

En consecuencia, el objetivo de este estudio fue analizar la asociación de la fuerza de las piernas y el área muscular transversal de los cuádriceps femorales con el grado de actividad física en personas octogenarias.

Materiales y métodos

Participantes

En esta investigación participaron como voluntarios 32 sujetos (10 hombres y 22 mujeres) de una población de personas mayores de 80 años de ambos sexos (hombres: $82,80 \pm 2,09$ años; mujeres: $83,77 \pm 4,09$ años), funcionalmente autónomas y residentes en centros para adultos mayores de la provincia de Jaén (España).

Los siguientes fueron los criterios de inclusión: personas octogenarias sin antecedentes de enfermedades metabólicas, insuficiencia cardiaca congestiva, dolores articulares, dolor en el pecho, vértigos, angina durante el ejercicio, o presión sanguínea alta no controlada, que no tuvieran marcapasos ni catéter, a quienes no se les hubiera desaconsejado el ejercicio físico por razones médicas, que no estuvieran tomando medicamentos con efectos sobre la fuerza muscular, que no presentaran deterioro cognitivo y no portaran prótesis metálicas implantadas quirúrgicamente.

Instrumentos

Para la valoración de la discapacidad física, se utilizó la versión validada en español del índice de Barthel (16), el cual mide de forma general el grado de independencia funcional del sujeto con respecto a la ejecución de algunas actividades básicas de la vida diaria, mediante puntuaciones de 0 a 100 en una escala de menor a mayor (17).

Correspondencia:

Pedro Á. Latorre-Román, Departamento de Expresión Corporal, Universidad de Jaén, Paraje Las Lagunillas s/n, edificio D2, Despacho 142, 23071, Jaén, España

Teléfono: (34) 953 212 710

platorre@ujaen.es

Recibido: 23/12/14; aceptado: 30/10/15

Para la valoración del grado de actividad física, se emplearon los siguientes parámetros del *Yale Physical Activity Survey* en su versión en español (18): tiempo de actividad física, gasto energético semanal, índice de vigor, índice de paseo, índice de movimiento general, índice de estar de pie, índice de estar sentado e índice de actividad total semanal. La precisión, la validez y la reproducibilidad de este cuestionario aplicado en personas mayores son adecuadas (19,20).

La fuerza muscular de las extremidades inferiores se analizó mediante la prueba de sentarse y levantarse durante 30 segundos (21), la cual implica sentarse y levantarse de una silla tantas veces como sea posible durante 30 segundos con los brazos cruzados sobre el pecho. El área de la sección transversal de masa muscular del músculo cuádriceps femoral (AMusc) se analizó mediante resonancia magnética (General Electric, 2421N Mayfair Rd, Milwaukee, WI, USA).

Procedimiento

Los participantes fueron informados personalmente sobre el estudio en una primera reunión en los centros y residencias de la tercera edad en donde estaban internados. Se exceptuó a quienes no cumplían con los criterios de inclusión. Una vez reclutados, los sujetos firmaron el consentimiento informado y respondieron a los cuestionarios seleccionados, en los cuales se respetó el anonimato.

Posteriormente, se les practicaron una resonancia magnética y la prueba de fuerza de piernas, previa demostración de la forma de ejecutarla. Para la resonancia magnética, los participantes fueron examinados en posición supina, con las articulaciones de la rodilla y de la cadera extendidas y los brazos cruzados sobre el pecho. Se tomó una imagen situada en la mitad de la longitud del fémur, que comúnmente se utiliza para cuantificar la masa muscular del muslo, con cortes axiales de 5 mm contiguos a la espina ilíaca antero-superior en la línea de la articulación femorotibial de ambos muslos. Se identificaron dos puntos de referencia: 2 cm por debajo de la espina ilíaca antero-inferior (corte proximal) y la cara superior de la rótula (segmento distal). La distancia entre los sectores proximal y distal se dividió en partes iguales para seleccionar 17 cortes de la resonancia magnética. La masa muscular del cuádriceps femoral se determinó a partir de las mediciones hechas en estos 17 segmentos seleccionados.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa estadístico SPSS®, versión 19.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, USA). El nivel de significación (p) se fijó por debajo de 0,05. Los datos se expresaron como media y desviación típica. Para la comparación de las diferentes variables por sexos, se empleó la prueba t de Student para muestras independientes. Se establecieron las correlaciones de Pearson para las variables analizadas y se hizo una regresión lineal múltiple por pasos hacia adelante utilizando como variable dependiente el índice de actividad total semanal.

Consideraciones éticas

Los participantes en esta investigación firmaron un consentimiento informado y los procedimientos experimentales se ajustaron a las normas éticas previstas en la Declaración de Helsinki (versión 2013), el Comité de Ética en Investigación con Seres Humanos de la Red Euro-Americana de Motricidad Humana y las directrices de la Comunidad Europea para la Buena Práctica Clínica (111/3976/88 de julio de 1990), así como el marco legal español para la investigación clínica en seres humanos (Real Decreto 561/1993 sobre ensayos clínicos). El consentimiento informado y el estudio fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Jaén, España.

Resultados

En el cuadro 1 se exponen los resultados de cada variable analizada según el sexo. Se puede observar que hubo diferencias significativas entre los sexos en las variables de AMusc ($p < 0,001$), en la prueba de sentarse y levantarse ($p = 0,028$), en el gasto energético semanal ($p = 0,008$) y en el índice de paseo ($p = 0,029$), con valores superiores en los varones.

En la figura 1 se muestra el área de sección transversal de masa muscular del cuádriceps femoral de dos varones, uno con 17 repeticiones en la prueba de sentarse y levantarse y otro con 11. Del mismo modo, en la figura 2 se muestran dos mujeres con diferentes resultados en la prueba de sentarse y levantarse, una con 19 repeticiones y otra con diez repeticiones. En las dos figuras se puede observar cómo las áreas de sección transversal del músculo cuádriceps del hombre y la mujer con más bajo rendimiento en la prueba fueron menores.

En el cuadro 2 se presentan las correlaciones de Pearson de las diferentes variables analizadas. Se puede destacar que el AMusc y los resultados de la

Cuadro 1. Resultados de las variables analizadas por sexo

	Hombres Media (DT)	Mujeres Media (DT)	p
Edad	82,80 (2,09)	83,77 (4,09)	0,486
AMusc (mm ²)	13.544,28 (1534,64)	9.991,39 (1613,71)	<0,001
ChT (n ^o repet.)	12,50 (6,00)	8,27 (4,165)	0,028
TActvF (h/sem)	26,92 (15,75)	26,52 (42,08)	0,977
IGT (Kcal/sem)	6.116,10 (4213,88)	2.708,69 (2529,72)	0,008
IV	7,50 (10,34)	5,45 (9,24)	0,580
IP	24,80 (15,41)	12,73 (12,98)	0,029
IM	7,60 (5,06)	6,23 (4,20)	0,428
IE	5,40 (3,40)	4,45 (2,30)	0,363
IS	2,50 (0,97)	2,95 (0,89)	0,206
IAT	47,80 (27,03)	31,82 (21,58)	0,083
IB (0-100)	99,00 (3,16)	95,23 (10,05)	0,259

DT: desviación típica; AMusc: área muscular. ChT: prueba de sentarse y levantarse; TActvF: tiempo total de actividad física semanal; IGT: gasto energético semanal; IV: índice de vigor; IP: índice de paseo; IM: índice de movimiento general; IE: índice de estar de pie; IS: índice de estar sentado; IAT: índice de actividad total semanal; IB: índice de Barthel

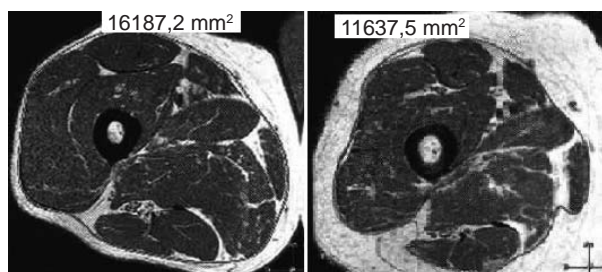


Figura 1. Área de la sección transversal de masa muscular del cuádriceps femoral de dos hombres; la figura de la izquierda corresponde a un hombre que ejecutó 17 repeticiones en la prueba de sentarse y levantarse y la figura de la derecha a otro que ejecutó 11 repeticiones en dicha prueba.

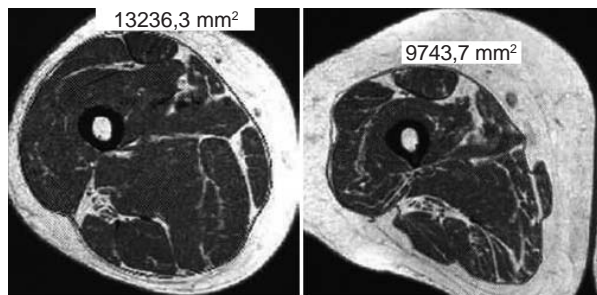


Figura 2. Área de la sección transversal de masa muscular del cuádriceps femoral de dos mujeres; la figura de la izquierda corresponde a una mujer que ejecutó 19 repeticiones en la prueba de sentarse y levantarse y la figura de la derecha a otra mujer que ejecutó diez repeticiones en dicha prueba.

prueba de sentarse y levantarse se correlacionaron de manera significativa con el índice de paseo ($r=0,445$, $p<0,05$ y $r=0,522$, $p<0,01$, respectivamente) y el índice de actividad semanal total ($r=0,430$, $p<0,05$ y $r=0,519$, $p<0,01$, respectivamente).

En el modelo de regresión lineal múltiple de los resultados del índice de actividad total semanal, el AMusc y la prueba de sentarse y levantarse ajustados según el sexo, solo los de esta última se comportaron como variable predictora ($B=2,450$; $t=3,321$; $p=0,002$). En la figura 3 se presenta el gráfico de dispersión de los resultados de la prueba de sentarse y levantarse y del índice de actividad semanal total, y se ve la asociación entre ellos tanto en hombres como en mujeres.

Discusión

El objetivo de este estudio fue analizar la asociación de la fuerza de las piernas y el área de sección muscular transversal de los cuádriceps femorales con el grado de actividad física en octogenarios. Como principal hallazgo se demostró que la prueba de sentarse y levantarse predijo el índice de actividad semanal total, pero no así el AMusc. Sin embargo, se registró una asociación de la prueba de sentarse y levantarse y el AMusc con el índice de paseo, el de actividad semanal total y el de Barthel. Estos resultados confirman la influencia del grado de actividad física total en la capacidad física, analizada en este caso mediante la prueba de sentarse y levantarse y la masa muscular.

En las personas de edad avanzada, la independencia funcional depende de la condición física y el envejecimiento se asocia con la disminución de las funciones de los sistemas y los órganos que determinan dicha condición (22). En este sentido, Bean, *et al.* (23), y Foldvari, *et al.* (24), han señalado la existencia de una asociación positiva entre la fuerza muscular y la capacidad de llevar a cabo actividades de la vida diaria, lo que puede ser

Cuadro 2. Correlación de Pearson para las diferentes variables

	Edad	AMusc	ChT	TActvF	IGT	IV	IP	IM	IE	IS	IAT	IB
Edad	1	-0,096	-0,158	-0,223	-0,071	-0,082	0,135	0,043	-0,078	0,008	0,049	-0,095
AMusc		1	0,604**	0,178	0,356*	0,265	0,445*	0,224	0,226	-0,279	0,430*	0,475**
ChT			1	0,528**	0,199	0,209	0,522**	0,458**	0,409*	-0,253	0,519**	0,484**
TActvF				1	0,115	0,039	0,454**	0,588**	0,639**	-0,378*	0,455**	0,259
IGT					1	0,501**	0,468**	0,262	0,333	-0,298	0,554**	0,348
IV						1	0,348	0,024	0,170	-0,250	0,617**	0,237
IP							1	0,685**	0,759**	-0,531**	0,934**	0,412*
IM								1	0,791**	-0,382*	0,683**	0,353*
IE									1	-0,485**	0,765**	0,372*
IS										1	-0,506**	-0,488**
IAT											1	0,430*
IB												1

AMusc: área muscular; ChT: prueba de sentarse y levantarse; TActvF: tiempo total de actividad física semanal; IGT: gasto energético semanal; IV: índice de vigor; IP: índice de paseo; IM: índice de movimiento general; IE: índice de estar de pie; IS: índice de estar sentado; IAT: índice de actividad total semanal; IB: índice de Barthel; *p<0,05, **p<0,01

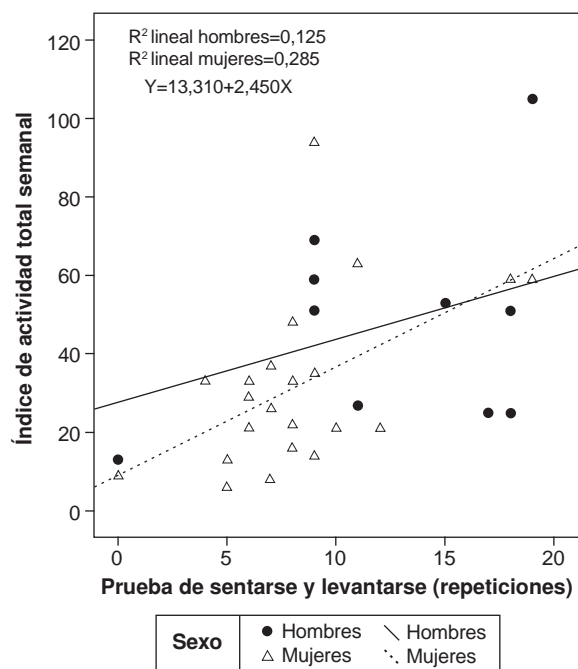


Figura 3. Diagrama de dispersión de la relación entre la variable de la prueba de sentarse y levantarse y el índice de actividad total semanal diferenciado por sexos

un predictor de la dependencia funcional (25,26). Hairi, *et al.*, registraron una reducción significativa de la fuerza del cuádriceps cada cinco años entre los 70 y los 90 años, y encontraron que la fuerza de las piernas constituía un importante descriptor de la limitación funcional (26). Del mismo modo, Bouchard, *et al.*, han señalado que la fuerza de las piernas es un importante predictor de la función física en adultos mayores (27). En un estudio prospectivo con personas entre los 70 y los 79 años de edad, Visser, *et al.*, demostraron

que la masa muscular escasa (área de la sección transversal más pequeña del cuádriceps), una mayor infiltración de grasa en el músculo y una menor fuerza muscular extensora de la rodilla, se asociaban con un mayor riesgo de pérdida de la movilidad en los hombres y las mujeres de más edad (28). La asociación entre la escasa masa muscular y la disminución funcional parece ser una función de la fuerza muscular subyacente; sin embargo, la fuerza muscular plantea un mayor riesgo relativo para el desarrollo de la discapacidad que la escasa masa muscular (6).

Otro hallazgo relevante de este estudio fue que las mujeres mostraron un menor grado de actividad física y de fuerza de las piernas en comparación con los hombres, lo que concuerda con los resultados de Palacios, *et al.* (29). Sims, *et al.*, reportaron en su estudio que la prevalencia de actividad física en los mayores de 65 años fue más elevada en hombres que en mujeres, y que las mujeres dedicaban menos tiempo a caminar que los hombres en todos los grupos de edad (30).

En este estudio el índice de paseo en las mujeres también fue más bajo que en los hombres. Esta disminución del grado de actividad física en mujeres mayores podría ser uno de los factores que explica la mayor prevalencia de dependencia funcional de las mujeres españolas ancianas en relación con los hombres: en España, 71,0 % de las personas dependientes son mujeres y 45,7 % de estas tiene 80 años de edad o más (31,32). Aunque la masa muscular parece ser el principal determinante de las diferencias por edad y por sexo en la fuerza, la pérdida de fuerza muscular relacionada con la edad se explica por la reducción de la masa muscular solo en parte, pues otros factores neurológicos (por

ejemplo, el reclutamiento de unidades motrices) y musculares (por ejemplo, la calidad contráctil y la infiltración de adipocitos), pueden desembocar en dinapenia.

Por lo tanto, mantener o ganar masa muscular no impide las caídas asociadas con el envejecimiento y la consecuente reducción de la fuerza muscular, y la relación de la debilidad muscular con la discapacidad física y la mortalidad es independiente de tales factores (7). Además, la actividad física puede ser una variable que interviene en la pérdida de fuerza muscular, de masa muscular (sarcopenia) y de calidad muscular (fuerza específica), en la limitación funcional y en la discapacidad física (26). En este sentido, en el estudio se registraron correlaciones significativas del índice de paseo y la actividad total semanal con el AMusc y la prueba de sentarse y levantarse.

Por último, cabe señalar que esta última prueba es un indicador accesible, sencillo y de bajo costo en la evaluación geriátrica. Su empleo facilita la detección de personas mayores con riesgo de dependencia funcional y la evaluación de los programas de intervención para la promoción de la autonomía personal en ancianos.

Una limitación del estudio fue que el análisis de la actividad física se basó en las respuestas a los cuestionarios y no en pruebas más objetivas como la acelerometría. Además, el carácter transversal del estudio obliga a ser cautos en las asociaciones encontradas entre las variables, por lo que se requieren estudios longitudinales y prospectivos para aclarar dichos hallazgos. Por otro lado, el empleo de la prueba de sentarse y levantarse durante 30 segundos para evaluar la fuerza debe considerarse como otra limitación del estudio, por lo cual el uso de métodos más precisos, como las máquinas isocinéticas, podría corroborar mejor los resultados. Asimismo, el hecho de que los sujetos estuviesen internados en instituciones restringe los resultados a este tipo de población.

En conclusión, se encontró una asociación significativa de la fuerza muscular y la masa muscular con el grado de actividad física en personas mayores, y la fuerza de las piernas resultó ser un indicador útil de su masa muscular y su grado de actividad física, lo cual tiene relevancia en la práctica clínica, especialmente en el seguimiento de la capacidad funcional de las personas mayores.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Financiación

No hubo fuentes de financiación externas.

Referencias

1. **Castillo M, Ortega FB, Ruiz J.** Mejora de la forma física como terapia antienvjecimiento. *Med Clin.* 2005;124:146-55. <http://dx.doi.org/10.1157/13071011>
2. **Reuben DB, Rubenstein LV, Hirsch SH.** Value of functional status as a predictor of mortality: Results of a prospective study. *Am J Med.* 1992;93:663-9.
3. **Rittweger J, Kwiet A, Felsenberg D.** Physical performance in aging elite athletes challenging the limits of physiology. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2004;4:159-60.
4. **Morley JE, Baumgartner RN, Roubenoff R, Mayer J, Nair KS.** Sarcopenia. *J Lab Clin Med.* 2001;137:231-43. <http://dx.doi.org/10.1067/mlc.2001.113504>
5. **Janssen I, Heymsfield SB, Wang ZM, Ross R.** Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr. *J Appl Physiol.* 2000;89:81-8.
6. **Clark BC, Manini TM.** Maximal voluntary force (strength) production declines with age and contributes to physical dependence and mortality. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2008;63:829-34.
7. **Clark BC, Manini TM.** What is dynapenia? *Nutrition.* 2012;28:495-503. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2011.12.002>
8. **Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, et al.** Sarcopenia: European Consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing.* 2010;39:412-23. <http://dx.doi.org/10.1093/ageing/afq034>
9. **Lauretani F, Russo CR, Bandinelli S, Bartali B, Cavazzini C, Di Iorio A, et al.** Age-associated changes in skeletal muscles and their effect on mobility: An operational diagnosis of sarcopenia. *J Appl Physiol.* 2003;95:1851-60. <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.00246.2003>
10. **Metter EJ, Talbot LA, Schrager M, Conwit R.** Skeletal muscle strength as a predictor of all-cause mortality in healthy men. *J Gerontol.* 2002;57:359-65. <http://dx.doi.org/10.1093/gerona/57.10.B359>
11. **Mitchell WK, Williams J, Atherton P, Larvin M, Lund J, Narici M.** Sarcopenia, dynapenia, and the impact of advancing age on human skeletal muscle size and strength; a quantitative review. *Front Physiol.* 2012;3:1-19. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2012.00260>
12. **Schaap LA, Koster A, Visser M.** Adiposity, muscle mass, and muscle strength in relation to functional decline in older persons. *Epidemiol Rev.* 2013;35:51-65. <http://dx.doi.org/10.1093/epirev/mxs006>
13. **Barbat-Artigas S, Rolland Y, Cesari M, Abellan van Kan G, Vellas B, Aubertin-Leheudre M.** Clinical relevance of different muscle strength indexes and functional impairment in women aged 75 years and older. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2013;68:811-9. <http://dx.doi.org/10.1093/gerona/gls254>
14. **Hicks GE, Shardell M, Alley DE, Miller RR, Bandinelli S, Guralnik J, et al.** Absolute strength and loss of strength as predictors of mobility decline in older adults: The InCHIANTI study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2012;67:66-73. <http://dx.doi.org/10.1093/gerona/glr055>

15. **Takata Y, Ansai T, Soh I, Awano S, Yoshitake Y, Kimura Y, et al.** Quality of life and physical fitness in an 85-year-old population. *Arch Gerontol Geriatr.* 2010;50:272-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archger.2009.04.005>
16. **Baztán JJ, Pérez del Molino J, Alarcón T, San Cristóbal E, Izquierdo G, Manzarbeitia J.** Índice de Barthel, instrumento válido para la valoración funcional de pacientes con enfermedad cerebrovascular. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 1993;128:32-40.
17. **Collin C, Wade DT, Davies S, Horne V.** The Barthel ADL Index, a reliability study. *Int Disabil Stud.* 1988;10:61-3. <http://dx.doi.org/10.3109/09638288809164103>
18. **De Abajo S, Larriba R, Márquez S.** Validity and reliability of the Yale Physical Activity Survey in Spanish elderly. *J Sports Med Phys Fitness.* 2001;41:479-85.
19. **Harada ND, Chiu V, King AC, Stewart AL.** An evaluation of three self-report physical activity instruments for older adults. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33:962-70. <http://dx.doi.org/10.1097/00005768-200106000-00016>
20. **Schuler PB, Richardson MT, Ochoa P, Wang MQ.** Accuracy and repeatability of the Yale Physical Activity Survey in assessing physical activity of older adults. *Percept Mot Skills.* 2001;93:163-77. <http://dx.doi.org/10.2466/pms.2001.93.1.163>
21. **Jones CJ, Rikli RE, Beam WC.** A 30-s chair-stand test as a measure of lower body strength in community-residing older adults. *Res Q Exerc Sport.* 1999;70:113-9. <http://dx.doi.org/10.1080/02701367.1999.10608028>
22. **Garatachea N, Lucía A.** Genes, physical fitness and ageing. *Ageing Res Rev.* 2013;12:90-102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2012.09.003>
23. **Bean JF, Leveille SG, Kiely DK, Bandinelli S, Guralnik JM, Ferrucci L.** A comparison of leg power and leg strength within the InCHIANTI study: Which influences mobility more? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2003;58:728-33. <http://dx.doi.org/10.1093/gerona/58.8.M728>
24. **Foldvari M, Clark M, Laviolette LC, Bernstein MA, Kaliton D, Castañeda C, et al.** Association of muscle power with functional status in community dwelling elderly women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2000;55:192-9. <http://dx.doi.org/10.1093/gerona/55.4.M192>
25. **Yoon BK, Kim CH, Lim HJ, Kim Y, Im J, Paik II, et al.** Association of physical performance and health-related factors among elderly Koreans. *International Sport Med Journal.* 2009;10:205-15.
26. **Hairi NN, Cumming RG, Naganathan V, Handelsman DJ, Le Couteur DG, Creasey H, et al.** Loss of muscle strength, mass (sarcopenia), and quality (specific force) and its relationship with functional limitation and physical disability: The Concord Health and Ageing in Men Project. *J Am Geriatr Soc.* 2010;58:2055-62. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1532-5415.2010.03145.x>
27. **Bouchard DR, Heroux M, Janssen I.** Association between muscle mass, leg strength, and fat mass with physical function in older adults: Influence of age and sex. *J Aging Health.* 2011;23:313-28. <http://dx.doi.org/10.1177/0898264310388562>
28. **Visser M, Goodpaster BH, Kritchevsky SB, Newman AB, Nevitt M, Rubin SM, et al.** Muscle mass, muscle strength, and muscle fat infiltration as predictors of incident mobility limitations in well-functioning older persons. *J Gerontol A Biol.* 2005;60:324-33. <http://dx.doi.org/10.1093/gerona/60.3.324>
29. **Palacios-Ceña D, Alonso-Blanco C, Jiménez-García R, Hernández-Barrera V, Carrasco-Garrido P, Pileño-Martínez E, et al.** Time trends in leisure time physical activity and physical fitness in elderly people: 20 year follow-up of the Spanish population national health survey (1987-2006). *BMC Public Health.* 2011;11:799. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2458-11-799>
30. **Sims J, Birrell CL, Hunt S, Browning C, Burns RA, Mitchell P.** Prevalence of physical activity behaviour in older people: Findings from the Dynamic Analyses to Optimise Ageing (DYNOPTA) project and Australian national survey data. *Australas J Ageing.* 2014;33:105-13. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1741-6612.2012.00648.x>
31. **Abellán-García A, Esparza-Catalán C, Pérez-Díaz J.** Evolución y estructura de la población en situación de dependencia. *Cuad Relac Laborales.* 2011;29:93-123.
32. **Abellán A, Esparza C, Castejón P, Pérez J.** Epidemiología de la discapacidad y la dependencia de la vejez en España. *Gaceta Sanitaria.* 2011; 25:5-11.

ARTÍCULO ORIGINAL

Pérdida de seguimiento y factores asociados en pacientes inscritos en el programa de HIV/sida del Hospital Universitario San Ignacio, Colombia, 2012-2013

José Roberto Támara-Ramírez¹, Carlos Arturo Álvarez², Jesús Rodríguez³

¹ Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario San Ignacio, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

² Clínica Universitaria Colombia, Colsanitas, S.A., Bogotá, D.C., Colombia

³ Centro de Proyectos para el Desarrollo (CENDEX), Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El seguimiento clínico regular a largo plazo, es un componente importante en la atención de los pacientes con HIV.

Objetivo. Describir las razones de la pérdida de seguimiento de los pacientes inscritos en el programa de HIV/sida de un hospital universitario.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio de casos y controles anidado en una cohorte retrospectiva, entre el 1º de enero de 2012 y el 31 de julio de 2013.

Resultados. Se seleccionaron 45 pacientes; la tasa de densidad de incidencia de los pacientes que se perdieron en el seguimiento fue de 17,7 por 100 pacientes por año. En el análisis bivariado, el desempleo ($p=0,000$), el consumo de alcohol ($p=0,004$), el tiempo de la evolución de la enfermedad en años ($p=0,032$), el sexo ($p=0,027$), y la edad promedio de 34 años ($p=0,000$) fueron estadísticamente significativos en relación con la pérdida de seguimiento. Al hacer el ajuste por regresión logística para la probabilidad de pérdida de seguimiento, se evidenció que las variables de edad promedio de 34 años ($p=0,019$; IC_{95%} 0,871-0,976), sexo femenino ($p=0,017$; IC_{95%} 1,903-31,83), consumo de alcohol ($p=0,028$; IC_{95%} 0,040-0,830) y desempleo ($p=0,001$; IC_{95%} 4,696-464,692) tuvieron significación estadística.

Conclusiones. Es necesario que los programas de HIV/sida establezcan sistemas de seguimiento y rastreo, con el fin de establecer estrategias para mejorar la retención de los pacientes y, por ende, su calidad de vida a largo plazo.

Palabras clave: infecciones por HIV, síndrome de inmunodeficiencia adquirida/terapia, pérdida de seguimiento, factores de riesgo, incidencia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2939>

Loss of follow-up and associated factors in patients enrolled in the HIV/AIDS program of the Hospital Universitario San Ignacio, Colombia, 2012-2013

Introduction: Regular long-term clinical follow-up is an important component of HIV care.

Objective: To describe the reasons for follow-up loss among patients enrolled in the HIV/AIDS program of a university hospital.

Materials and methods: A nested case-control study was carried out on a retrospective cohort between January 1st, 2012 and July 31st, 2013.

Results: A group of 45 patients was selected; the incidence density rate of patients lost to follow-up was 17.7 per 100 patient/years. The following variables were significantly linked to follow-up loss in the bivariate analysis: Unemployment ($p=0.000$); alcohol consumption ($p=0.004$); number of years of evolution of the disease ($p=0.032$); gender ($p=0.027$), and mean age of 34 years ($p=0.000$). When logistic regression was adjusted for the probability of follow-up loss the significant variables were: Mean age of 34 years ($p=0.019$, 95% CI: 0.871-0.976); female ($p=0.017$, 95% CI: 1.903-31.83); alcohol consumption ($p=0.028$, 95% CI: 0.040-0.830), and unemployment ($p=0.001$, 95% CI: 4.696-464.692).

Conclusions: HIV/AIDS programs need to establish follow-up systems and means to trace any losses in order to establish strategies to improve patient retention and, thus, their long-term quality of life.

Key words: HIV infections, acquired immunodeficiency syndrome/therapy, lost to follow-up, risk factors, incidence.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2939>

Contribución de los autores:

José Roberto Támara-Ramírez: concepción, diseño, base de datos, entrevista, recolección e interpretación de los datos
Jesús Rodríguez y Carlos Arturo Álvarez: ajuste del diseño y análisis estadístico
Todos los autores participaron en la redacción y revisión del artículo.

La disponibilidad del tratamiento antirretroviral de gran eficacia ha transformado el pronóstico del paciente infectado con el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) en los últimos años (1,2), lo cual ha significado una reducción acentuada en la morbilidad y la mortalidad relacionadas con la infección (3). En el manejo a largo plazo del paciente con HIV, han surgido retos adicionales como la toxicidad de los medicamentos (4,5), el fracaso del tratamiento debido a un cumplimiento inadecuado (6,7), la resistencia a los medicamentos antirretrovirales (8) con el consecuente cambio en el esquema de tratamiento, y un incremento en la morbilidad y la mortalidad no asociadas al HIV (9,10). Los pacientes con HIV requieren un seguimiento clínico prolongado para vigilar la progresión de la enfermedad y determinar el momento oportuno para iniciar el tratamiento y para evaluar la respuesta terapéutica, el cumplimiento del tratamiento antirretroviral y los efectos secundarios, y para abordar los aspectos de salud sexual y las necesidades de prevención del HIV (11).

En el 2006 se diseñó en Colombia el modelo de gestión programática en HIV/sida, según lo recomendado en la guía de atención formulada en el 2000 por el Ministerio de Salud (Resolución 412), que hoy se denomina "Guía de atención en HIV basada en la evidencia". Los objetivos de dicha guía fueron los de contener la epidemia, detectar tempranamente la infección por HIV, detener su progresión a sida y evitar la aparición de resistencia al tratamiento antirretroviral, y, por último, vigilar y evaluar el tratamiento a largo plazo (12,13).

La pérdida de seguimiento es perjudicial para el asesoramiento y el seguimiento clínico y de laboratorio, lo que trae consecuencias individuales y colectivas, ya que el éxito virológico (supresión de la carga viral del HIV mediante el tratamiento antirretroviral) se relaciona con el aumento de la supervivencia (14) y con la reducción de la transmisión del virus (15), mientras que la pérdida de seguimiento y la consecuente interrupción del tratamiento pueden ser un marcador de progresión

de la enfermedad o de muerte, que en el plano colectivo se asocia con una mayor probabilidad de transmisión del HIV (16).

La retención a largo plazo de los pacientes con HIV es, por lo tanto, un componente importante de su atención. Además, las altas tasas de pérdida de seguimiento podrían comprometer la eficacia de la atención de estos pacientes, por lo cual es necesario conocer las tasas y las razones de la pérdida de seguimiento en nuestro país, con el fin de desarrollar estrategias para optimizar la retención en los programas de atención de HIV/sida.

Materiales y métodos

Se hizo un estudio de casos y controles anidado en una cohorte retrospectiva, entre el 1º de enero de 2012 y el 31 de julio de 2013. Se tomó como muestra la población de pacientes del programa de HIV/sida del Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá, y se consideraron como casos todos aquellos que hubieran faltado durante tres o más meses a la consulta y, como controles, a quienes seguían asistiendo a las citas de seguimiento; los participantes se seleccionaron de forma secuencial en la misma cohorte hasta completar dos controles por caso.

La pérdida de seguimiento se definió como la ausencia de un paciente durante tres meses o más a partir de la última cita de control. Se consideraron cortes a los cuatro, cinco y seis meses o más.

Se diseñó un formato de entrevista para indagar sobre los factores asociados a la pérdida de seguimiento en un programa de atención en salud de pacientes con HIV/sida. El cuestionario se ajustó después de cinco entrevistas con pacientes que no participaban en el estudio, con quienes se hizo la prueba piloto.

Los datos del cuestionario se resumieron en medidas de tendencia central y de dispersión para las variables cuantitativas, y en frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas.

Análisis descriptivo

Los pacientes definidos como casos de pérdida en el seguimiento, se caracterizaron según las variables sujetas a medición. Se calculó la tasa de densidad de la incidencia del programa de HIV/sida del Hospital Universitario San Ignacio, representada por los nuevos casos de pacientes perdidos en el seguimiento en relación con el número de personas por año durante el tiempo del estudio.

Correspondencia:

José Roberto Támara, Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario San Ignacio, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 N° 40-62, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 594 6161, extensión 2930
jrtamara2101@gmail.com

Recibido: 02/07/15; aceptado: 02/11/15

Análisis comparativo bivariado

Los pacientes se agruparon en dos grupos: los que se mantenían en el seguimiento y aquellos que no habían continuado el seguimiento. Se identificaron las diferencias entre los grupos con respecto a las variables de edad, sexo, nivel educativo, ocupación, tipo de ocupación, acceso a los servicios de salud, lugar de residencia, modo de contagio, tiempo de evolución de la enfermedad en años, carga viral basal, carga viral posterior a la pérdida de seguimiento, tratamiento antirretroviral, suspensión del tratamiento antirretroviral, falla del tratamiento, tabaquismo, consumo de drogas psicoactivas (drogadicción), consumo de alcohol, alteración del estado de ánimo, atención psicológica, hospitalizaciones, tiempo de pérdida de seguimiento y pérdida de seguimiento previo. Para la determinación de las diferencias se utilizaron las pruebas t de Student y ji al cuadrado.

Análisis comparativo multivariado

Las variables que resultaron asociadas estadísticamente con la pertenencia o no al grupo de pacientes perdidos en el seguimiento al hacer el análisis bivariado, se incluyeron en un modelo multivariado de regresión logística para evaluar la importancia relativa de cada una frente a la probabilidad de pertenecer al grupo de perdidos en el seguimiento, en tanto que se controlaba el efecto de las restantes.

Para evaluar el ajuste del modelo de regresión logística, se utilizó el test de Hosmer y Lemeshow. En todas las pruebas el nivel de significación fue de 5 % para la identificación de las diferencias estadísticamente significativas. Para el procesamiento de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS® (IBM Corp., released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

Consideraciones éticas

Este trabajo contó con el aval del Comité de Ética Médica del Hospital Universitario San Ignacio y se clasificó como de mínimo riesgo según los criterios de la Declaración de Helsinki y de la guía de buenas prácticas clínicas. La participación de los pacientes fue libre y voluntaria, y todos los seleccionados firmaron el consentimiento informado.

Resultados

El programa de HIV/sida del Hospital Universitario San Ignacio contaba con una población de 1.691 pacientes mayores de 18 años durante el periodo del estudio (19 meses de seguimiento, entre el 1º

de enero de 2012 y el 31 de julio de 2013). De dicho total, 1.004 (59,4 %) se mantenían en el seguimiento, 347 (20,5 %) habían sido trasladados a otra institución prestadora de salud (IPS), 137 (8,1 %) asistían a control cada cuatro o seis meses y no recibían tratamiento antirretroviral, y 203 (12 %) se habían perdido en el seguimiento (casos). La tasa de densidad de la incidencia de los pacientes perdidos en el seguimiento fue de 17,74 por 100 personas por año (203/1.143,75 pacientes por año).

Se citaron y entrevistaron 45 pacientes del total de los considerados como perdidos en el seguimiento (casos): 38 hombres (84,44 %) y siete mujeres (15,55 %). Dos de estos pacientes no se incluyeron en el análisis por no tener la información completa. Del grupo de pacientes que cumplían con el seguimiento, se escogieron al azar 85 que conformaron el grupo de control del estudio. Las características sociodemográficas y de comportamiento de los pacientes perdidos (casos), se describen en el cuadro 1. En el cuadro 2 se señalan las 21 razones expuestas por los 43 pacientes para haberse ausentado del programa de HIV/sida del hospital, las cuales se clasificaron en tres grandes grupos: factores administrativos del aseguramiento, factores ocupacionales y factores psicosociales.

Los hallazgos del análisis de casos y controles se describen en el cuadro 3, en el cual se resalta que la inclusión en el grupo de casos (perdidos en el seguimiento) fue estadísticamente significativo; siete mujeres (16,3 %) y cuatro hombres (4,7 %) quedaron incluidos en el grupo de control, es decir, el conformado por los pacientes que continuaban en el seguimiento ($p=0,027$). En la variable de desempleo hubo 18 pacientes perdidos en el seguimiento (41,9 %), y ninguno en el grupo de control ($p=0,000$), y el consumo de alcohol fue la razón más frecuente dada por los integrantes del grupo de casos en comparación con el grupo de control ($p=0,006$).

En el análisis multivariado (cuadro 4) se seleccionaron cinco variables, en algunas de las cuales se hicieron categorizaciones adicionales para facilitar la interpretación de los resultados. La edad ($p=0,027$), el empleo o renta y el desempleo ($p=0,000$), el consumo de alcohol ($p=0,004$), el tiempo de evolución de la enfermedad en años ($p=0,032$) y la edad promedio ($p=0,000$), se asociaron estadísticamente con la pérdida en el seguimiento en el grupo de los casos. Las variables de sexo ($p=0,017$),

Cuadro 1. Características sociodemográficas y de comportamiento de los pacientes perdidos en el seguimiento

Variables	Hombres		Mujeres		p
	n	%	n	%	
Grupos de edad (años)					
20 a 30	12	33	3	42,9	0,913
31 a 40	15	41,7	3	42,9	
41 a 50	8	22,2	1	14,3	
51 y más	1	2,8	0	0	
Escolaridad					
Primaria incompleta	2	5,6	0	0	0,217
Primaria completa	2	5,6	1	14,3	
Secundaria incompleta	2	5,6	0	0	
Secundaria completa	5	13,9	3	42,9	
Técnica	11	30,6	3	42,9	
Universitaria	14	38,9	0	0	
Ocupación					
Ocupado	20	55,6	4	57,1	0,938
Desocupado	16	44,4	3	42,9	
Obrero/empleador	12	33,3	4	57,1	
Patrón/empleador	3	8,3	0	0	
Tipo de ocupación					
Trabajador independiente	5	13,9	0	0	0,629
Pensionado	1	2,8	0	0	
Desempleado	15	41,7	3	42,9	
Acceso a los servicios de salud					
Sí	17	47,2	4	57,1	0,631
No	19	52,8	3	42,9	
Modo de contagio					
Heterosexual	9	25	7	100	0,001
Homosexual	26	72,2	0	0	
Transfusión	1	2,8	0	0	
Tratamiento antirretroviral en el momento de la pérdida					
Sí	34	94,4	7	100	0,523
No	2	5,6	0	0	
Carga viral posterior a la pérdida					
<50 copias	4	11,1	0	0	0,354
>50 copias	32	88,9	7	100	
Suspensión del tratamiento					
Sí	32	88,9	7	100	0,354
No	4	11,1	0	0	
Falla del tratamiento					
Sí	16	94,1	1	100	0,354
No	16	84,2	6	100	
Tiempo de evolución (años)					
0-4	18	50	3	42,9	0,016
5-9	11	30,6	4	57,1	
10-14	4	11,1	0	0	
15 o más	3	8,3	0	0	
Tiempo de pérdida de seguimiento (meses)					
3	8	22,2	0	0	0,368
4	8	22,2	1	14,3	
5	6	16,7	1	14,3	
6 o más	14	38,9	5	71,4	
Pérdida de seguimiento previo					
Sí	25	69,4	6	85,7	0,38
No	11	30,6	1	14,3	
Tiempo de pérdida y falla del tratamiento (meses)					
3	1	5,9	0	0	0,368
4	3	17,6	0	0	
5	4	23,5	0	0	
6 o más	9	52,9	1	100	
Tiempo de pérdida y hospitalización (meses)					
3	1	33,3	0	0	0,584
4	0	0	0	0	
5	0	0	0	0	
6 o más	2	66,7	0	0	
Frecuencia de consumo alcohol					
Nunca	9	25	3	42,9	0,566
Una o menos veces al mes	20	55,6	4	57,1	
2 a 4 veces por mes	6	16,7	0	0	
2 a 3 veces por semana	1	2,8	0	0	
Consumo de cigarrillo o tabaco					
Sí	9	25	1	14,3	0,539
No	27	75	6	85,7	
Consumo de drogas					
Sí	3	8,3	0	0	0,009
No	32	91,4	7	100	
Alteración del estado de ánimo					
Sí	20	55,6	7	100	0,026
No	16	44,4	0	0	
Alteración del estado de ánimo y ayuda psicológica					
Sí	6	30	3	43	0,016
No	14	46,7	4	100	

Nota: los valores en negrilla son estadísticamente significativos.

Cuadro 2. Causas expuestas por los pacientes para explicar la pérdida de seguimiento

Causas	n	%
Factores administrativos del aseguramiento		
No tenían trabajo	14	32,55
No tenían seguridad social	13	30,23
No tenían trabajo fijo	2	4,65
Trabas en el cambio de régimen de afiliación	1	2,32
Atraso en pagos de la empresa a la EPS	1	2,32
Problemas administrativos de la seguridad social	3	6,97
Suma del porcentaje		79,04
Factores ocupacionales		
Viajes	4	9,3
Carga laboral	4	9,3
Distancia al centro del programa de HIV	2	4,65
Estudios	2	4,65
Trabajo	1	2,32
Suma del porcentaje		30,22
Factores psicosociales		
Negación de la enfermedad	2	4,65
Falta de interés	3	6,97
Reacción negativa al tratamiento	2	4,65
Por voluntad propia	1	2,32
Búsqueda de medida alternativa	1	2,32
Abandono del tratamiento	3	6,97
Miedo a pedir permiso	1	2,32
Problema familiar	1	2,32
Depresión	1	2,32
Adicción al tramadol	1	2,32
Suma del porcentaje en factores psicosociales		37,16

Nota: se establecieron 21 razones dadas por los 43 pacientes para ausentarse del programa de HIV/sida del Hospital Universitario San Ignacio. EPS: empresa promotora de salud

edad ($p=0,019$), el no consumir alcohol ($p=0,028$) y el desempleo ($p=0,001$), resultaron asociadas estadísticamente con el riesgo de pertenecer al grupo de casos al hacer el ajuste según un modelo multivariado de regresión logística (cuadro 5). El ajuste del modelo de regresión logística se evaluó mediante el test de Hosmer y Lemeshow.

Discusión

El 20 % de las personas que viven con la infección por HIV en los Estados Unidos no son conscientes de las implicaciones de su estado, y cerca de 50 % de las diagnosticadas no están comprometidas con ningún programa de atención de pacientes con HIV. Cerca de 60 % de los individuos infectados por el virus en ese país no reciben atención regular en los centros de cuidado de HIV. Del 40 % restante, 80 % requiere tratamiento antirretroviral y 80 % de los individuos tratados tiene una carga viral indetectable (<50 copias/ml).

Estos 210.000 individuos con carga viral indetectable corresponden a solo 19 % de la población infectada con HIV en los Estados Unidos, en tanto

que en 80 % de los individuos infectados con el HIV la carga viral es detectable. Estas cifras posiblemente se explican por la diversidad de las variables que pueden afectar a dichos pacientes: diagnóstico tardío, inclusión irregular en programas de atención, fallas en el suministro del tratamiento antirretroviral y cumplimiento deficiente del tratamiento, barreras estas que impiden resultados óptimos en el tratamiento de los individuos con HIV (17).

El programa de HIV/sida del Hospital Universitario San Ignacio presentó una tasa de densidad de la incidencia de la pérdida en el seguimiento de 17,74 por 100 personas por año, mucho más alta que la observada en otros estudios (3,72; 5,1 y 9,1 por 100 personas por año) (18-20), aunque en otras poblaciones se han descrito tasas de pérdida en el seguimiento superiores a lo reportado en este estudio (25,1 y 21,4 por 100 personas por año) (21,22). Las diferencias entre los estudios podrían deberse a las diversas metodologías aplicadas, así como a diferencias en la definición de pérdida en el seguimiento, en los tiempos de seguimiento de los estudios, en las poblaciones infectadas con HIV estudiadas y en las estructuras médicas locales (18,20).

La probabilidad de retornar a un programa de atención de pacientes con HIV ha demostrado ser mayor en aquellos pacientes con empleo que en los desempleados (23). En otro estudio se observó la relación entre el desempleo, los bajos ingresos y la pérdida de seguimiento (24,25). Clouse, *et al.*, reportaron una asociación entre la pérdida en el seguimiento en jóvenes de 18 a 29 años y el desempleo (26), en tanto que Maskew, *et al.* (27), encontraron que las dificultades financieras de la población fueron la causa principal para no retomar los controles médicos; otras razones expuestas en este mismo estudio fueron sociales, y se relacionaban con la toma de los medicamentos y con factores ocupacionales como la carga laboral y la distancia del lugar de residencia al centro de atención del programa de HIV. Una de las razones por las que los pacientes considerados como perdidos en el seguimiento retornaron a los centros de atención, fue haber encontrado trabajo (28).

En otros estudios se ha reportado que la falta de seguridad social es un factor asociado a la pérdida de seguimiento (29,30). Los resultados de este trabajo corroboran los reportes consultados en el sentido de que una situación de gran impacto

Cuadro 3. Comparación entre los pacientes perdidos en el seguimiento y aquellos que lo continuaron (grupo de control)

Variables	Grupo de control		Pacientes perdidos en el seguimiento		p
	n	%	n	%	
Sexo					
Masculino	81	95,3	36	83,7	
Femenino	4	4,7	7	16,3	0,027
Escolaridad					
Ninguna	1	1,2	0	0	0,657
Primaria incompleta	2	2,4	2	4,7	
Primaria completa	6	7,1	3	7	
Secundaria incompleta	8	9,4	2	4,7	
Secundaria completa	16	18,8	8	18,6	
Técnica	26	30,6	14	32,6	
Universitaria	21	24,7	14	32,6	
Postgrado	5	5,9	0	0	
Modo de contagio					
Heterosexual	25	29,4	16	37,2	
Homosexual	55	64,7	26	60,7	0,409
Transfusión	1	1,2	1	2,3	
Bisexual	4	4,7	0	0	
Tratamiento antirretroviral					
Sí	82	96,5	41	95,3	0,757
No	3	3,5	2	4,7	
Tipo de ocupación					
Obrero/empleador	53	62,4	16	37,2	
Patrón/empleador	3	3,5	3	7	
Trabajador familiar no remunerado	17	20	5	11,6	
Pensionado	1	1,2	0	0	
No sabe	9	10,6	1	2,3	
Desempleado	2	2,4	0	0	
	0	0	18	41,9	0,000
Frecuencia de consumo de alcohol					
Nunca	50	58,8	12	27,9	0,006
Una o menos veces al mes	29	34,1	24	55,8	
2 a 4 veces al mes	6	7,1	6	14	
2 a 3 veces por semana	0	0	1	2,3	
Consumo de cigarrillo o tabaco					
Sí	14	16,5	10	23,3	0,353
No	71	83,5	33	76,7	
Consumo de drogas					
Sí	6	7,1	3	7,1	0,986
No	79	92,9	39	92,9	
Alteración del estado de ánimo y atención psicológica					
Sí	13	100	9	100	0,349
No	33	45,8	18	52,9	
Tiempo de evolución de la enfermedad en años					
0-4	38	44,7	21	48,8	0,074
5-9	25	29,4	15	34,9	
10-14	21	24,7	4	9,3	
15 o más	1	1,2	3	7	

Nota: los valores en negrilla son estadísticamente significativos

local es la pérdida del cubrimiento de los planes de aseguramiento en salud o los cambios que se presentan en dichos planes (paso del régimen contributivo al subsidiado); el factor más relevante reportado como razón para el abandono de los programas de atención es el paso del empleo formal a la condición de cesante.

Las mujeres con HIV se enfrentan a barreras similares en cuanto al proceso de aseguramiento en salud (31). Arrivillaga, *et al.*, encontraron asociaciones estadísticamente significativas en los patrones cualitativos del cumplimiento del tratamiento y la posición social; las mujeres de posición social media y alta presentaron un mayor

Cuadro 4. Análisis multivariado de las comparaciones que resultaron estadísticamente significativas, según se muestra en el cuadro 3

Variables	Grupo de control		Pacientes perdidos en el seguimiento		p
	n	%	n	%	
Empleo					
Con empleo o renta	83	100,0	25	58,1	0,000
Desempleado	0	0,0	18	41,9	
Consumo alcohol					
Nunca	50	58,8	12	27,9	0,004
Una o menos al mes	29	34,1	24	55,8	
2 o más veces al mes/semana	6	7,1	7	16,3	
Tiempo de evolución de enfermedad en años					
0-9	63	74,1	38	83,7	0,032
10-14	21	24,7	4	9,3	
15 o más	1	1,2	3	7	
Sexo					
Masculino	81	95,3	36	83,7	0,027
Femenino	4	4,7	7	16,3	
Edad (promedio)		40,3		34,0	0,000

Nota: los valores en negrilla son estadísticamente significativos

Cuadro 5. Resultados del ajuste del modelo de regresión logística para la probabilidad de pérdida en el seguimiento de pacientes con HIV/sida

Variables en el modelo	Significación estadística	Razón de momios	IC _{95%} para razón de momios	
			Inferior	Superior
Sexo	0,017	7,787	1,903	31,863
Edad	0,019	0,922	0,871	0,976
Tiempo de evolución				
0-9 años	0,791	0,631	0,021	18,994
10-14 años	0,681	0,486	0,016	15,201
15 o más años	1,000			
Consumo de alcohol				
Nunca consumió	0,028	0,182	0,040	0,830
Una vez o menos al mes	0,159	0,344	0,078	1,521
2 o más veces al mes/semana	1,000			
Desempleo	0,001	46,716	4,696	464,692
Constante	0,588	3,643		

nivel de cumplimiento que aquellas de posición social baja. Además, se han descrito otras barreras críticas para el cumplimiento de los tratamientos, como el ser cuidadoras de niños con HIV y los estilos de afrontamiento individual (32).

Algunas características observadas en este estudio, como la reacción negativa al tratamiento, la depresión y la negación de la enfermedad, se han considerado como factores psicosociales asociados a la pérdida en el seguimiento en otros estudios (33). En este estudio, al ajustar el modelo multivariado de regresión logística, se encontró que las mujeres con una edad promedio de 34 años tenían riesgo de pertenecer al grupo de pacientes

perdidos en el seguimiento. En su estudio, Rice, *et al.*, reportaron que ser mujer y tener una edad entre los 15 y los 35 años, se asociaban con la pérdida en el seguimiento (34), lo cual contradice lo hallado en otros estudios, en los cuales la mayor pérdida en el seguimiento se presentó entre hombres jóvenes (35-37).

El consumo de alcohol se asoció a la pérdida de seguimiento en algunos estudios prospectivos llevados a cabo en Sudáfrica y Botsuana en torno a las características sociales y clínicas de pacientes con tratamiento antirretroviral, aunque dicho factor no predijo la pérdida en el seguimiento de los pacientes (38,39).

En este estudio no se presentaron complicaciones clínicas en los 43 pacientes que se perdieron en el seguimiento clínico, aunque hubo tres casos de hombres en el grupo con más de seis meses de pérdida en el seguimiento que fueron hospitalizados por motivos que no tenían significación clínica relacionada con el tiempo de pérdida. Es posible que si el tiempo de seguimiento hubiese sido mayor, los eventos clínicos, e incluso la muerte, podrían haber sido más frecuentes, como lo demuestran algunos estudios en los que la pérdida de seguimiento se relacionó con la enfermedad avanzada y la muerte (40). Cabe señalar que estas situaciones no se producen inmediatamente después de la suspensión del tratamiento, sino que suelen ocurrir al cabo de un año y dependen, sobre todo, del recuento de células T CD4 en el momento en que se suspende el tratamiento.

En el presente estudio se encontró que en 17 de los 39 (90,7 % del total) pacientes que suspendieron el tratamiento este falló después de la pérdida de seguimiento, lo cual se evidenció por dos cargas virales detectables después de reiniciarlo. La pérdida del seguimiento clínico, así como el incumplimiento del tratamiento, la inasistencia a las citas médicas y la supresión viral de corta duración, se consideran factores predictores del fracaso del tratamiento (41). Este es uno de los aspectos más preocupantes de la pérdida de seguimiento, dado que algunos pacientes suspenden completamente los medicamentos, mientras que otros los toman de manera irregular, con consecuencias complejas desde el punto de vista biológico, ya que esta es la principal causa de resistencia del HIV a los medicamentos.

Los alcances de estos hallazgos no solo tienen implicaciones clínicas (cambio del esquema de tratamiento antirretroviral con menores opciones en el futuro), sino también, implicaciones económicas (normalmente el segundo o tercer esquema es más costoso) y de salud pública (mayor riesgo de transmisión de virus resistentes). Este último aspecto es, quizá, el de mayor impacto en las políticas nacionales de salud y constituye el eje de las discusiones sobre las implicaciones para los pacientes, el sistema de salud y la población general, pues un individuo con infección por HIV que pierde el seguimiento y, como sucede muchas veces, suspende el tratamiento, representa un riesgo mayor de transmisión de virus resistentes a sus eventuales parejas.

Los principales obstáculos para lograr un resultado óptimo del tratamiento en personas con HIV/sida, son el diagnóstico tardío, la demora en la vinculación a los centros de atención, la deficiente retención de los pacientes en dichos centros, la demora en el inicio del tratamiento antirretroviral y su incumplimiento (descontinuación o intermitencia del tratamiento), así como la ausencia de tratamiento para las enfermedades concomitantes no asociadas al HIV y las necesidades básicas insatisfechas (42-44).

La atención de los pacientes diagnosticados con HIV es crítico. En un estudio en Brasil, se establecieron las siguientes barreras para acceder a los servicios de atención de los pacientes con infección por HIV: los obstáculos relacionados con los servicios de salud (atención de mala calidad, prolongados tiempos de espera y problemas en el suministro de los medicamentos); los retos psicosociales y

emocionales (miedo a la divulgación y la dificultad para aceptar el diagnóstico); los costos indirectos (transporte y ausentismo en el trabajo o la escuela); la percepción equivocada del riesgo y la toxicidad, y la complejidad de los esquemas de tratamiento antirretroviral. Los esfuerzos para eliminar las barreras más frecuentes pueden mejorar la continuidad asistencial a lo largo de las múltiples etapas de la atención (45).

El presente estudio es el primero en Colombia que ha establecido y analizado las causas de la pérdida de seguimiento en los pacientes que asisten a un programa de HIV. El estudio, sin embargo, tiene limitaciones metodológicas como la imposibilidad de contactar e identificar a todos los pacientes que podrían haber participado en el estudio, lo que disminuyó su poder, aunque ello no afectó de forma global la validez de las conclusiones. Algunas variables, como la de los pacientes fallecidos, la clasificación de las situaciones no reportadas y su significación clínica, y las posibles conductas del paciente durante la fase inicial de abandono del seguimiento (posiblemente asociadas a una falsa percepción del riesgo en salud), podrían haberse clasificado como casos. Otras variables que podrían haber sido de interés para el análisis incluyen el estrato social, el nivel de ingresos y el tipo de afiliación al régimen de salud. La selección de los casos puede haber comprometido la validez de los resultados, ya que no se pudo trabajar con el total de los pacientes, y el grupo con el cual se contó para el análisis no se seleccionó aleatoriamente.

Los resultados hallados para la población de pacientes con HIV del estudio no pueden extrapolarse a otras porque las causas de la pérdida de seguimiento pueden depender de la naturaleza de la población, el sitio de residencia, los métodos de seguimiento y la continuidad de los pacientes en los programas de atención.

Recientemente, se declaró constitucional la nueva ley de salud del país y se unificaron los beneficios de los regímenes contributivo y subsidiado, pero, en la realidad, cuando un paciente pierde su empleo no es trasladado al régimen subsidiado con la suficiente rapidez para garantizar la continuidad en sus tratamientos. Es necesario que el sistema de salud del país implemente un mecanismo para facilitar una transición ágil y rápida al régimen subsidiado en los casos de pérdida de empleo, y evitar la interrupción temporal o permanente de la atención integral a las personas con HIV. En todos los países se registran pérdidas considerables en

el seguimiento, pero no se puede permitir que, además de las causas descritas en otros lugares, la pérdida del empleo se añada a las demás, sobre todo en un país como Colombia, con cifras elevadas de informalidad laboral.

Los hallazgos de este estudio sugieren que el ser mujer, joven, estar desempleado y consumir alcohol, se asocian a la pérdida en el seguimiento. Un mejor conocimiento de todos estos factores y su impacto en los programas de atención de HIV/sida, podría contribuir en la búsqueda de un mecanismo de prevención. La pérdida de seguimiento debe definirse para la población colombiana con HIV con la metodología adecuada y teniendo en cuenta el tiempo de seguimiento durante los estudios, el tipo de población y la región del país, para así diseñar estrategias que mejoren la retención de los pacientes y suministren información a largo plazo para evaluar los resultados de la atención a las personas con HIV.

El incumplimiento de los pacientes con HIV/sida debe analizarse teniendo en cuenta los factores relacionados con el tratamiento antirretroviral, así como los factores socioeconómicos, y los relacionados con la enfermedad y el sistema de salud, pues todos están implicados en la pérdida de seguimiento en los programas de atención de las personas que viven con HIV/sida.

Conflicto de intereses

Los autores de este trabajo no declaran ningún conflicto de intereses.

Financiación

No se recibió financiación externa para la elaboración de este trabajo.

Referencias

1. **Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration.** Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: A collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet*. 2008;372:293-9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61113-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61113-7)
2. **Smit C, Geskus R, Walker S, Sabin C, Coutinho R, Porter K, et al.** Effective therapy has altered the spectrum of cause specific mortality following HIV seroconversion. *AIDS*. 2006;20:741-9. <http://dx.doi.org/10.1097/01.aids.0000216375.99560.a2>
3. **Kaplan JE, Hanson D, Dworkin MS, Frederick T, Bertolli J, Lindegren ML, et al.** Epidemiology of human immunodeficiency virus associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2000;30(Supl.1):S5-14. <http://dx.doi.org/10.1086/313843>
4. **Grinspoon S, Carr A.** Cardiovascular risk and body-fat abnormalities in HIV-infected adults. *N Engl J Med*. 2005;352:48-62. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra041811>
5. **Núñez M.** Hepatotoxicity of antiretrovirals: Incidence, mechanisms and management. *J Hepatol*. 2006;44:S132-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2005.11.027>
6. **Paterson DL, Swindells S, Mohr J, Brester M, Vergis EN, SQUIER C, et al.** Adherence to protease inhibitor therapy and outcomes in patients with HIV infection. *Ann Intern Med*. 2000;133:21-30. <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-133-1-200007040-00025>
7. **Low-Beer S, Yip B, O'Shaughnessy MV, Hogg RS, Montaner JS.** Adherence to triple therapy and viral load response. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2000;23:360-1.
8. **Taiwo B.** Understanding transmitted HIV resistance through the experience in the USA. *Inter J Infect Dis*. 2009;13:552-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2008.10.008>
9. **Palella FJ, Baker RK, Moorman AC, Chmiel JS, Wood KC, Brooks JT, et al.** Mortality in the highly active antiretroviral therapy era: Changing causes of death and disease in the HIV outpatient study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006;43:27-34. <http://dx.doi.org/10.1097/01.qai.0000233310.90484.16>
10. **D:A:D Study Group, Sabin CA, Worm SW, Weber R, Reiss P, El-Sadr W, et al.** Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients enrolled in the D:A:D study: A multi-cohort collaboration. *Lancet*. 2008;371:1417-26. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60423-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60423-7)
11. **British HIV Association.** Standards for HIV clinical care. London: BHIVA; 2007.
12. **Ministerio de la Protección Social.** Resolución número 3442 de 2006. Por la cual se adoptan las Guías de Práctica Clínica Basada en Evidencia para la prevención, diagnóstico y tratamiento de pacientes con VIH/sida y enfermedad renal crónica y las recomendaciones de los modelos de gestión programática en VIH/sida y de prevención y control de la enfermedad renal crónica. Bogotá: Ministerio de la Protección Social; 2006.
13. **Ministerio de Protección Social, Fundación para la Investigación y Desarrollo de Salud y la Seguridad Social (FEDESALUD), Programa de Apoyo a la Reforma de Salud - PARS.** Modelo de gestión programática en VIH/sida. Bogotá: Ministerio de la Protección Social; 2006.
14. **Mugavero MJ, Dávila JA, Nevin CR, Giordano TP.** From access to engagement: Measuring retention in outpatient HIV clinical care. *AIDS Patient Care STDS*. 2010;24:607-13. <http://dx.doi.org/10.1089/apc.2010.0086>
15. **Weigel R, Hochgesang M, Brinkhof MW, Hosseinipour MC, Boxshall M, Mhango E, et al.** Outcomes and associated risk factors of patients traced after being lost to follow-up from antiretroviral treatment in Lilongwe, Malawi. *BMC Infect Dis*. 2011;11:31. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-11-31>
16. **Brinkhof MW, Pujades-Rodríguez M, Egger M.** Mortality of patients lost to follow-up in antiretroviral treatment programmes in resource-limited settings: Systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2009;4:e5790. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005790>

17. **Gardner EM, McLees MP, Steiner JF, Del Río C, Burman WJ.** The spectrum of engagement in HIV care and its relevance to test-and-treat strategies for prevention of HIV infection. *Clin Infect Dis.* 2011;52:793-800. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciq243>
18. **Mocroft A, Kirk O, Aldins P, Chies A, Blaxhult A, Chentsova N, et al.** Loss to follow-up in an international, multicentre observational study. *HIV Med.* 2008;9:261-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-1293.2008.00557.x>
19. **Krishnan S, Wu K, Smurzynski M, Bosch RJ, Benson CA, Collier AC, et al.** Incidence rate of and factors associated with loss to follow-up in a longitudinal cohort of antiretroviral-treated HIV-infected persons: An AIDS Clinical Trials Group (ACTG) Longitudinal Linked Randomized Trials (ALLRT) analysis. *HIV Clin Trials.* 2011;12:190-200. <http://dx.doi.org/10.1310/HCT1204-190>
20. **Elenga N, Georger-Sow MT, Messiaen T, Lamaury I, Favre I, Mathieu Nacher, et al.** Incidence and risk factors for follow-up interruption of HIV infected patients in Guadeloupe. *J Aids Clin Res.* 2013;4:238. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-6113.1000238>
21. **Ochieng-Ooko V, Ochieng D, Sidle JE, Holdsworth M, Wools-Kaloustian K, Siika AM, et al.** Influence of gender on loss to follow-up in a large HIV treatment programme in Western Kenya. *Bull World Health Organ.* 2010;88:681-8. <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.09.064329>
22. **Zhou J, Tanuma J, Chaiwarith R, Lee CK, Law MG, Kumarasamy N, et al.** Loss to follow-up in HIV-infected patients from Asia-Pacific Region: Result from TAHOD. *AIDS Res Treat.* 2012;2012:375217. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/375217>
23. **Larson BA, Brennan A, McNamara L, Long L, Rosen S, Sanne I, et al.** Early loss to follow up after enrolment in pre-ART care at a large public clinic in Johannesburg, South Africa. *Trop Med Int Health.* 2010;15(Supl.1):43-7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02511.x>
24. **Namusobya J, Semitala FC, Amanyire G, Kabami J, Chamie G, Bogere J, et al.** High retention in care among HIV-infected patients entering care with CD4 levels >350 cells/ μ L under routine program conditions in Uganda. *Clin Infect Dis.* 2013;57:1343-50. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cit490>
25. **Bassett IV, Wang B, Chetty S, Mazibuko M, Bearnot B, Giddy J, et al.** Loss to care and death before antiretroviral therapy in Durban, South Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009;51:135-9. <http://dx.doi.org/10.1097/QAI.0b013e3181a44ef2>
26. **Clouse K, Pettifor A, Maskew M, Bassett J, van Rie A, Gay C, et al.** Initiating antiretroviral therapy when presenting with higher CD4 cell counts results in reduced loss to follow-up in a resource-limited setting. *AIDS.* 2013;27:645-50. <http://dx.doi.org/10.1097/QAD.0b013e32835c12f9>
27. **Maskew M, MacPhail P, Menezes C, Rubel D.** Lost to follow up: Contributing factors and challenges in South African patients on antiretroviral therapy. *S Afr Med J.* 2007;97:853-7.
28. **Gill VC, Krentz HB.** Patient perspectives on leaving, disengaging, and returning to HIV care. *AIDS Patient Care STDS.* 2015;29:400-7. <http://dx.doi.org/10.1089/apc.2015.0001>
29. **Lebouché B, Yazdanpanah Y, Gérard Y, Sissoko D, Ajana F, Alcaraz I, et al.** Incidence rate and risk factors for loss to follow-up in a French clinical cohort of HIV-infected patients from January 1985 to January 1998. *HIV Med.* 2006;7:140-5. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-1293.2006.00357.x>
30. **Hassan AS, Fielding KL, Thuo NM, Nabwera HM, Sanders EJ, Berkley JA.** Early loss to follow-up of recently diagnosed HIV-infected adults from routine pre-ART care in a rural district hospital in Kenya: A cohort study. *Trop Med Int Health.* 2012;17:82-93. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3156.2011.02889.x>
31. **Arrivillaga M.** Análisis de las barreras para la adherencia terapéutica en mujeres colombianas con VIH/sida: cuestión de derechos de salud. *Salud Pública Mex.* 2010;52:350-6.
32. **Arrivillaga M, Ross M, Useche B, Alzate ML, Correa D.** Social position, gender role, and treatment adherence Colombian women living with HIV/AIDS: Social determinants of health approach. *Rev Panam Salud Pública.* 2009;26:502-10. <http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892009001200005>
33. **Udeagu CC, Webster TR, Bocour A, Michel P, Shepard CW.** Lost or just not following up: Public health effort to re-engage HIV-infected persons lost to follow-up into HIV medical care. *AIDS.* 2013;27:2271-9. <http://dx.doi.org/10.1097/QAD.0b013e328362fdde>
34. **Rice BD, Delpech VC, Chadborn TR, Elford J.** Loss to follow-up among adults attending human immunodeficiency virus services in England, Wales, and Northern Ireland. *Sex Transm Dis.* 2011;38:685-90. <http://dx.doi.org/10.1097/OLQ.0b013e318214b92e>
35. **Odafe S, Idoko O, Badru T, Aiyenigba B, Suzuki C, Khamofu H, et al.** Patients' demographic and clinical characteristics and level of care associated with lost to follow-up and mortality in adult patients on first-line ART in Nigerian hospitals. *J Int AIDS Soc.* 2012;15:17424. <http://dx.doi.org/10.7448/IAS.15.2.17424>
36. **Ndiaye B, Ould-Kaci K, Salleron J, Bataille P, Bonnevie F, Choisy P, et al.** Incidence rate and risk factors for loss to follow-up in HIV-infected patients from five French clinical centres in Northern France - January 1997 to December 2006. *Antivir Ther.* 2009;14:567-75.
37. **Nacher M, El Guedj M, Vaz T, Nasser V, Randrianjohany A, Álvarez F, et al.** Risk factors for follow-up interruption of HIV patients in French Guiana. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74:915-7.
38. **Peltzer K, Ramlagan S, Khan MS, Gaede B.** The social and clinical characteristics of patients on antiretroviral therapy who are 'lost to follow-up' in KwaZulu-Natal, South Africa: A prospective study. *SAHARA J.* 2011;8:179-86. <http://dx.doi.org/10.1080/17290376.2011.9725002>
39. **Gust DA, Mosimaneotsile B, Mathebula U, Chingapane B, Gaul Z, Pals SL, et al.** Risk factors for non-adherence and loss to follow-up in a three-year clinical trial in Botswana. *PLoS One.* 2011;6:e18435. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018435>
40. **Karcher H, Omondi A, Odera J, Kunz A, Harms G.** Risk factors for treatment denial and loss to follow-up in an antiretroviral treatment cohort in Kenya. *Trop Med Int Health.* 2007;12:687-94. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01830.x>

41. **Robbins GK, Daniels B, Zheng H, Chueh H, Meigs JB, Freedberg KA.** Predictors of antiretroviral treatment failure in an urban HIV clinic. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007;44:30-7. <http://dx.doi.org/10.1097/01.qai.0000248351.10383.b7>
42. **Castilla J, Sobrino P, De La Fuente L, Noguera I, Guerra L, Parras F.** Late diagnosis of HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy: Consequences for AIDS incidence. *AIDS.* 2002;16:1945-51.
43. **Gardner LI, Metsch LR, Anderson-Mahoney P, Loughlin AM, del Río C, Strathdee S, et al.** Efficacy of a brief case management intervention to link recently diagnosed HIV-infected persons to care. *AIDS.* 2005;19:423-31.
44. **Lo W, MacGovern T, Bradford J.** Association of ancillary services with primary care utilization and retention for patients with HIV/AIDS. *AIDS Care.* 2002;14(Supl.1):S45-57. <http://dx.doi.org/10.1080/0954012022014992049984>
45. **Hoffmann M, MacCarthy S, Batson A, Crawford-Roberts A, Rasanathan J, Nunn A, et al.** Barriers along the care cascade of HIV-infected men in a large urban center of Brazil. *AIDS Care.* 2015;20:1-6. <http://dx.doi.org/10.1080/09540121.2015.1062462>

ARTÍCULO ORIGINAL

Tratamiento farmacológico y deterioro de la función pulmonar en pacientes con diabetes de tipo 2: un estudio de corte transversal

Henry A. Vargas^{1,2}, Martín Rondón³, Rodolfo Dennis^{1,2,3}

¹ Departamento de Medicina Interna, Fundación Cardioinfantil-Instituto de Cardiología, Bogotá, D.C., Colombia

² Programa de Postgrado en Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad del Rosario, Bogotá, D.C., Colombia

³ Departamento de Epidemiología Clínica y Bioestadística, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La relación de la diabetes mellitus de tipo 2 con el deterioro de la función pulmonar no es clara, como tampoco si el tipo de tratamiento modifica los parámetros espirométricos e inflamatorios.

Objetivo. Comparar la función pulmonar de pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 tratados con un agente de sensibilización a la insulina (metformina) y de los tratados con secretagogos, así como de estos combinados con insulinas, y evaluar las diferencias en los biomarcadores de inflamación de los grupos.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio analítico de corte transversal en 196 pacientes con diabetes mellitus de tipo 2. Se midieron las variables espirométricas y la concentración sanguínea de biomarcadores de inflamación (ferritina, fibrinógeno, proteína C reactiva, interleucina 6 y factor de necrosis tumoral alfa). Se analizaron los valores residuales (valores observados menos valores predichos) para la capacidad vital forzada y el volumen espiratorio forzado en los diferentes tipos de tratamiento. También, se compararon las diferencias en las medianas de las concentraciones de los biomarcadores, según los tipos de tratamiento.

Resultados. Después de ajustar según los factores determinantes de la función pulmonar y el control y la duración de la diabetes mellitus de tipo 2, los valores esperados de la capacidad vital forzada de los pacientes tratados con agentes de sensibilización a la insulina fue menor que los de aquellos tratados con secretagogos (-212,1 ml Vs. -270,2 ml; $p=0,039$), y lo mismo se registró en el volumen espiratorio forzado durante el primer segundo (-133,2 ml Vs. -174,8 ml; $p>0,05$), aunque dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas. En el grupo de pacientes tratados con agentes de sensibilización a la insulina, las concentraciones de ferritina y del factor de necrosis tumoral alfa fueron menores ($p<0,01$).

Conclusión. Los resultados de este estudio respaldan la hipótesis de que los agentes de sensibilización a la insulina estarían asociados con un menor deterioro de la función pulmonar y una menor inflamación sistémica en los pacientes diabéticos. Asimismo, sirve como base para la formulación de nuevas hipótesis y trabajos de investigación.

Palabras clave: diabetes mellitus, pulmón, inflamación, metformina, insulinas, espirometría.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2752>

Pharmacological treatment and impairment of pulmonary function in patients with type 2 diabetes: a cross-sectional study

Introduction: There is no clear relationship between type 2 diabetes mellitus and lung function decline; it is also unclear whether the type of treatment can modify spirometric variables and levels of inflammatory biomarkers.

Objectives: To compare pulmonary function in patients with type 2 diabetes treated with an insulin-sensitizing agent (metformin) and in those treated with secretagogues, as well as combined with insulin, and to evaluate differences in inflammatory biomarkers between treatment groups.

Material and methods: We conducted a cross-sectional analytic study in 196 diabetic patients with type 2 diabetic mellitus. Spirometric variables and levels of inflammatory biomarkers (ferritin, fibrinogen, C-reactive protein, interleukin 6, tumor necrosis factor- α), were obtained. Residual values (observed minus expected) for forced vital capacity and for forced expiratory volume were calculated and compared

Contribución de los autores:

Henry Vargas: redacción del protocolo del estudio, coordinación de la depuración de la información y manejo de la base de datos

Martín Rondón: análisis de la información y diseño de las tablas

Rodolfo Dennis: concepción del estudio, colaboración en la elaboración del protocolo del estudio, y en el análisis y la discusión de resultados

Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

between treatment types. Differences in median levels of biomarkers were also compared.

Results: After adjustment by known determinants of lung function, and by the control and duration of type 2 diabetes, patients treated with the insulin-sensitizing agent had statistically significant lower differences against expected values for forced vital capacity compared with secretagogues (-212.1 ml vs 270.2 ml, $p=0.039$), as well as for forced expiratory volume but without statistical significance (-133.2 mL vs -174.8 mL, $p>0.05$). In the group of patients treated with the insulin-sensitizing agent, ferritin and tumor necrosis factor- α levels were lower ($p<0.01$).

Conclusion: This study supports the hypothesis that insulin-sensitizing agents appear to be associated with less deterioration of lung function and less systemic inflammation in type 2 diabetes. The present study serves to formulate new hypothesis and research projects.

Key words: Diabetes mellitus, lung, inflammation, metformin, insulins.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2752>

La información sobre la diabetes mellitus de tipo 2 abunda y cada día se registran nuevos hallazgos sobre su relación con los efectos sistémicos y con la aparición de otras enfermedades. Sin embargo, aunque la función pulmonar puede ser anormal en 60 % de los pacientes adultos asintomáticos con diabetes mellitus de tipo 2 (1), son relativamente pocos los reportes que se centran en los cambios en la función pulmonar asociados con esta enfermedad; asimismo, es poco conocido el papel de la inflamación crónica propia de la diabetes en el pulmón. En el estudio de Litonjua, *et al.* (2), se encontró que la función pulmonar medida por el volumen espiratorio forzado durante el primer segundo (VEF_1) y la capacidad vital forzada (CVF), disminuía proporcionalmente. En este estudio y en otro más reciente (3), se demostró que las personas que aún no han desarrollado la diabetes, o cuyo nivel de hemoglobina 'glucosilada' está en el límite normal alto, ya tienen su función pulmonar disminuida con respecto a los que no han desarrollado la enfermedad, lo cual respalda la hipótesis de que la sola resistencia a la insulina predispone a un declive más temprano de dicha función.

En otros reportes, como el *Fremantle Diabetes Study* (4), se ha observado que la función pulmonar es menor en pacientes con diabetes mellitus de tipo 2. Asimismo, en el estudio ulterior de la cohorte de Framingham (5), el cual contó con 3.254 participantes, 2.974 sin diabetes y 280 con la enfermedad, se encontró que los pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 tenían menor VEF_1

y CVF que los individuos del grupo de control (sanos), diferencia que se mantenía en los distintos grupos de fumadores (activos, exfumadores, no fumadores). Hallazgos similares se reportaron con base en el estudio ARIC (6) y en el *British Women's Heart and Health Study* en 2004 (7).

La patogénesis de la diabetes mellitus de tipo 1 se ha relacionado con los procesos inflamatorios y otros mecanismos inmunitarios, y en recientes estudios epidemiológicos se ha demostrado la asociación entre la diabetes mellitus de tipo 2 y el incremento acusado de la concentración de los marcadores de inflamación sistémica (8-10). Por ejemplo, la alta concentración de ferritina se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar diabetes (11). Asimismo, en la patogénesis de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se han asociado varios mediadores inflamatorios, como las interleucinas 1 y 6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), así como la resistencia a la insulina (12). En este contexto, se puede postular que la reducción de la resistencia de los tejidos a la insulina podría disminuir el estado de glucosilación no enzimática de las proteínas y la actividad inflamatoria, y, consecuentemente, mejorar la función pulmonar en los pacientes diabéticos.

El principal objetivo de este estudio fue evaluar si existe asociación entre el uso de un agente de sensibilización a la insulina, o de la combinación de varios de ellos y el tratamiento con insulina, y la función pulmonar. El objetivo secundario fue evaluar si se puede demostrar la asociación entre el tipo de tratamiento de los pacientes diabéticos y la disminución de la concentración de los marcadores y mediadores de la inflamación.

Materiales y métodos

Se hizo un estudio observacional, analítico, de corte transversal, con base en los datos obtenidos en estudios previos de Dennis, *et al.* (13-15). Se

Correspondencia:

Rodolfo J. Dennis, Departamento de Investigaciones, Fundación Cardioinfantil, Calle 163B N° 28-14, 5° piso, Bogotá, D.C., Colombia

Telefax: (571) 679 1236

rdennis@cardioinfantil.org

Recibido: 30/03/15; aceptado: 05/11/15

seleccionó una muestra no probabilística de 495 pacientes que asistían a consulta en la Asociación Colombiana de Diabetes entre julio de 2005 y septiembre de 2007, y se incluyeron de forma consecutiva los casos de diabetes mellitus de tipo 2.

Los criterios de inclusión del estudio base fueron los siguientes: pacientes de ambos sexos entre 35 y 65 años de edad con diagnóstico médico de diabetes mellitus de tipo 2 según la definición de la Asociación Latinoamericana de Diabetes (glucemia casual igual o mayor de 200 mg/dl, o glucemia en ayunas igual o mayor de 126 mg/dl, o glucemia igual o mayor de 200 mg/dl dos horas después de una carga de glucosa en una prueba de tolerancia oral a la glucosa) (16).

Se excluyeron los pacientes con diagnóstico previo de artritis reumatoide u otra enfermedad del colágeno, las mujeres en embarazo, aquellos con antecedentes de heridas o traumatismo en el tórax o de procedimientos como pleurodesis o toracostomía, así como quienes tuvieran diagnóstico previo de traqueomalacia, fibrosis quística, cáncer de pulmón, tuberculosis pulmonar, cirugías del tórax, corazón o pulmón, y deformidades de la boca u otra limitación para realizar apropiadamente las pruebas de función pulmonar.

El tamaño de la muestra (495 sujetos) se basó en el promedio de los valores residuales esperados del VEF_1 en los participantes diabéticos y los sujetos de control, el cual debía ser de 60 ml o más, con desviación estándar entre 100 y 250 ml en adultos mayores de 21 años, y con una probabilidad de error de tipo I de 5 % y un poder de 80 %.

Se excluyeron del análisis los pacientes que recibían simultáneamente secretagogos y agentes de sensibilización a la insulina, al igual que aquellos que estaban tratados únicamente con insulina y otros medicamentos como los análogos del receptor PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) y los inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4).

Para determinar los grupos de comparación, se definieron como expuestas a la insulina a aquellas personas que, cumpliendo con la definición de diabetes mellitus de tipo 2, informaran al momento de ingreso al estudio estar recibiendo insulina inyectable subcutánea; de igual forma, se definió como expuestas a un agente de sensibilización a la insulina a aquellos pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 que estuviesen recibiendo tratamiento oral con metformina, y como pacientes expuestas a hipoglucemiantes orales del tipo de los

secretagogos a aquellos pacientes que estuviesen recibiendo tratamiento solo con glibenclamida. Se analizó, además, la combinación de dos tratamientos de la siguiente forma: insulinas con metformina o insulinas con secretagogos. No se logró recopilar información sobre el tiempo de uso de uno u otro hipoglucemiante.

Después de verificar que los pacientes que asistían a la Asociación Colombiana de Diabetes cumplían con los criterios de inclusión, se procedió a solicitarles la firma del consentimiento informado para participar en el estudio. Si el paciente aceptaba participar, se le hacía una encuesta a cargo del personal del grupo de investigación mediante un cuestionario diseñado especialmente para la recolección de las variables de interés en este estudio. Para la recolección de la información, se utilizó un cuestionario de enfermedades respiratorias previamente traducido al español de uso en Colombia, con preguntas adicionales para las variables relacionadas con la función pulmonar.

Manejo y procesamiento de las muestras

Los pacientes elegibles con base en la encuesta fueron citados a una segunda visita para medir la glucemia en ayunas, la hemoglobina 'glucosilada', el fibrinógeno, la ferritina, el TNF- α , la interleucina 6 y la proteína C reactiva. Las muestras de sangre se tomaron después de un mínimo de seis horas de ayuno utilizando tubos de vacío, los cuales se centrifugaron en el laboratorio siguiendo los procedimientos estándar. Un grupo de muestras se almacenó a -20 °C durante un máximo de dos meses para el análisis posterior. Las concentraciones de TNF- α , interleucina 6 y proteína C reactiva de alta sensibilidad, se midieron con un método inmunométrico enzimático secuencial en fase sólida por quimioluminiscencia usando el analizador Immulite 1000™ (EURO/DPC Ltd, Llanberis, UK). Cada medición de proteína C reactiva, TNF- α e interleucina 6 (alta y baja), se procesó por duplicado para cumplir con el estándar de control de ensayos específicos del fabricante, y la de la proteína C reactiva se hizo por triplicado (alta, intermedia y baja).

Personal entrenado en el uso del espirómetro portátil se encargó de practicar las pruebas de función pulmonar (curva de flujo de volumen) a los participantes, para determinar la CVF y el VEF_1 . El control de calidad de estas mediciones se basó en las recomendaciones de la *American Thoracic Society* y en la calibración periódica de los neumotacógrafos (17).

Análisis estadístico

La base de datos se elaboró en el programa ACCES/Office 2000, y los análisis estadísticos se hicieron con el programa STATA®, versión 10.0. Después de filtrar los datos en la base original de 495 pacientes, se encontraron 64 que habían estado recibiendo solamente agentes de sensibilización a la insulina (metformina) y 47 tratados con secretagogos. Se hizo un análisis adicional de las mismas variables del estudio con los resultados de la combinación de los medicamentos hipoglucemiantes orales y las insulinas (un grupo recibía metformina y, otro, secretagogos), con el fin de confirmar que, si se registraban diferencias, estas se debieran principalmente al tipo de hipoglucemiante oral utilizado y no al efecto de la insulina, y analizar el efecto de la insulina en las variables estudiadas. Por esta razón, el número de pacientes se amplió así: en el grupo que recibía agentes de sensibilización a la insulina más insulinas, se incluyeron 118 pacientes y, en el grupo que recibía secretagogos más insulinas, 78 pacientes.

En los análisis comparativos ajustados, las variables dependientes fueron el VEF₁, la CVF, la relación entre estos, las concentraciones de proteína C reactiva, de ferritina, de fibrinógeno, de interleucina 6 y de TNF- α , en tanto que la variable independiente fue el tipo de tratamiento de la diabetes. Se definió como un mal control de la diabetes una concentración de hemoglobina 'glucosilada' mayor de 7 %. Las diferencias estadísticas en las variables categóricas (tabaquismo, antecedentes de enfermedad) entre los pacientes que recibían secretagogos o agentes de sensibilización a la insulina, o una combinación de secretagogos e insulinas, o agentes de sensibilización e insulinas, se evaluaron mediante la prueba de ji al cuadrado o el test exacto de Fisher (dependiendo del número de eventos), y en las variables continuas (VEF₁, CVF), mediante pruebas para establecer las diferencias entre promedios (t de Student) o medianas (U de Mann-Whitney).

La función pulmonar se evaluó a partir del valor de la diferencia entre los resultados obtenidos y los esperados, es decir, el valor residual entre el valor observado del VEF₁, la CVF, y la relación entre uno y otra, y el resultado esperado o predicho. Se obtuvieron los valores esperados de VEF₁, CVF y de uno y otra ajustados por edad, sexo y estatura para cada sujeto mediante las ecuaciones de predicción obtenidas por Hankinson, *et al.*, para sujetos mexicano-americanos, validadas para Colombia (18,19).

La asociación entre los resultados de las pruebas de función pulmonar y los tipos de tratamiento ajustados según variables conocidas que son determinantes de la función pulmonar, se analizó mediante regresión lineal múltiple. Después se hizo un análisis adicional entre las distintas combinaciones de tratamiento de los pacientes. Para el análisis de las concentraciones de los marcadores inflamatorios con respecto al tipo de tratamiento, se utilizó la prueba t de Student o su equivalente no paramétrico cuando se juzgó necesario después de verificar la distribución en la muestra, y lo mismo se hizo para el análisis de los biomarcadores de inflamación en cada grupo de tratamiento.

Consideraciones éticas

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Fundación Cardioinfantil, el cual se ajusta a lo dispuesto en la declaración de la iniciativa STROBE (*Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology*) para la comunicación de estudios observacionales de corte transversal (20).

Resultados

Los dos grupos estudiados se diferenciaron en algunas características como sexo, peso, concentración de hemoglobina 'glucosilada' y control de la diabetes. Los pacientes que utilizaban el agente de sensibilización a la insulina tenían un nivel más bajo de hemoglobina 'glucosilada' y, por lo tanto, un mejor control de la diabetes, que los pacientes que utilizaban secretagogos. En el caso del peso, en el grupo que recibía tratamiento con agentes de sensibilización a la insulina había pacientes con mayor peso (cuadro 1). En cuanto a las enfermedades y antecedentes de exposición de los pacientes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de tratamiento (cuadro 2).

Al comparar a los pacientes tratados con metformina con aquellos que recibían secretagogos, no se encontraron diferencias en cuanto a las variables de la función pulmonar o los valores esperados menores de 70 % para la CVF, el VEF₁ y la relación entre una y otra (cuadro 3).

En el análisis de los valores residuales, y después de ajustar según variables determinantes de la función pulmonar ya conocidas (sexo, edad, talla, tabaquismo, exposición a humo de leña), control de la diabetes (hemoglobina 'glucosilada') y tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la

Cuadro 1. Características basales de la población de los dos grupos de tratamiento

Variable	Agentes de sensibilización a la insulina (metformina)	Secretagogos	p
Sexo			0,039
Masculino	31 (48,44)	32 (68,09)	
Femenino	33 (51,56)	15 (31,91)	
Edad (años)			0,702
35-45	10 (15,63)	7 (14,89)	
46-55	29 (45,31)	18 (38,30)	
56-65	25 (39,06)	22 (46,81)	
Hemoglobina glucosilada	7,31±1,72	8,96±2,19	0,00001
Mal control de la diabetes*	30 (46,88)	38 (80,85)	0,0001
Tiempo de diagnóstico	5,5±4,87	6,7±4,66	0,09
Talla	161,84±9,87	162,23±10,10	0,41
Peso	76,74±15,00	71,17±13,4	0,97
Tabaquismo			0,178
No fuma	30 (46,88)	15 (31,91)	
Fumó previamente	23 (35,94)	25 (53,19)	
Fuma actualmente	11 (17,19)	7 (14,89)	
Cigarrillos/día	9,09±9,74	5,28±5,18	0,82
Mediana (p75-p25)	(1-18)	(2-10)	

(n, %, media ± desviación estándar)

* Según definición empleada en el estudio de Nathan DM, *et al.* (21)**Cuadro 2.** Antecedentes de enfermedad por grupos de tratamiento

Variable	Agentes de sensibilización a la insulina (metformina) (n=64)	Secretagogos (n=47)	p
Hipertensión	20 (31,25)	12 (25,53)	0,511
Infarto agudo de miocardio	2 (3,13)	2 (4,26)	0,752
Insuficiencia cardiaca	0	0	(-)
Eventos cerebrovasculares	0	0	(-)
Embolia pulmonar	0	0	(-)
Bronquitis crónica	1 (4,26)	2 (1,56)	0,387
Enfisema pulmonar	0	1 (0,90)	0,241
Asma bronquial	0	1 (2,19)	0,241
Exposición a polvo	20 (31,25)	17 (36,17)	0,587
Exposición a gases	8 (12,5)	7 (14,89)	0,715
Exposición a humo de leña	11 (17,19)	11 (23,40)	0,417

(n, %, media ± desviación estándar)

enfermedad, los pacientes tratados con metformina tuvieron valores residuales de CVF mayores que los tratados con agentes secretagogos (-212,1 ml Vs. -270,2 ml; $p=0,039$) (cuadro 4). También, se encontraron menores valores residuales en el VEF₁, pero sin significación estadística (-133,2 Vs. -174,8 ml; $p>0,05$). No se registraron cambios en los valores residuales de las variables de la

función pulmonar cuando se compararon los grupos de tratamiento combinados, es decir, en el análisis del grupo que recibía insulinas y metformina comparado con el que recibía secretagogos más insulinas (cuadro 5).

Con respecto a los valores promedio de los biomarcadores de inflamación, estos fueron uniformemente más bajos en el grupo de pacientes tratados con agentes de sensibilización a la insulina, sin embargo, solo alcanzaron significación estadística los de la ferritina (132,34 µg/l Vs. 204,30; $p=0,0027$) y los del TNF- α (8,00±3,65 Vs. 10,62; $p=0,009$) (cuadro 6). Esta diferencia se mantuvo incluso después de comparar la combinación de grupos de tratamiento, es decir, el uso simultáneo de agentes de sensibilización a la insulina e insulinas comparado con el uso de secretagogos e insulinas (cuadro 7).

Discusión

Los datos presentados en este estudio respaldan la hipótesis de que el uso de agentes de sensibilización a la insulina comparado con el uso de secretagogos en pacientes diabéticos, parece disminuir el deterioro de la función pulmonar, como se evidencia en el menor valor residual de la CVF, incluso después de ajustar los resultados según variables conocidas que afectan la función pulmonar, y según el control de la diabetes, los valores de hemoglobina 'glucosilada' y la duración de la enfermedad. Además, se evidenció una tendencia no significativa a registrar un menor valor residual del VEF₁ en el grupo de pacientes tratados con agentes de sensibilización a la insulina del tipo de la metformina. Estos resultados confirman un

Cuadro 3. Función pulmonar por grupos de tratamiento

Variable	Agentes de sensibilización a la insulina (metformina) (n=64)	Secretagogos (n=47)	p
VEF1	2,76±0,77	2,76±0,70	0,977
CVF	3,45±0,93	3,49±0,87	0,837
VEF /CVF	80,1±7,39	79,63±7,33	0,739
VEF1<70 %*	3 (4,69)	2 (4,26)	0,914
CVF<70 %*	2 (3,13)	3 (6,38)	0,414
VEF1/CVF<70 %*	5 (7,81)	3 (6,38)	0,774

(n, %, media ± desviación estándar)

* Predicción con base en las ecuaciones de Hankinson, *et al.* (18)

VEF₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; CVF: capacidad vital forzada; VEF₁/CVF: relación entre VEF₁-CVF; VEF₁<70 %: valor predicho menor de 70 % para VEF₁; CVF<70 %: valor predicho menor de 70 % para CVF; VEF₁/CVF: <70 %: valor predicho menor de 70 % para la relación entre VEF₁ y CVF

Cuadro 4. Medias del valor residual para la función pulmonar por grupos de tratamiento (*)

Variable	Agentes de sensibilización a la insulina		Secretagogos		Media	Diferencia		p
	N	Media	N	Media		IC _{95%}		
						LI	LS	
rVEF ₁	64	-133,2	47	-174,8	-41,63	5,67	-88,93	0,083
rCVF	64	-212,1	47	-270,2	-58,09	-2,95	-113,23	0,039
rVEF ₁ /CVF	64	1.014	47	1.017	0,033	0,016	-0,009	0,617

(*) Ajustadas por diferencia en sexo, edad, índice de masa corporal, hemoglobina glucosilada, tabaquismo y tiempo de diagnóstico de la diabetes
 IC: intervalo de confianza; LI: límite inferior; LS: límite superior; rVEF₁: valor residual de VEF₁; rCVF: valor residual de CVF; rVEF₁/CVF: valor residual de la relación ente VEF₁ y CVF

Cuadro 5. Medias del valor residual de la función pulmonar por grupos de tratamiento más insulina (*)

Variable	Agentes de sensibilización a la insulina más insulinas		Secretagogos más insulinas		Media	Diferencia		p
	N	Media	N	Media		IC _{95%}		
						LI	LS	
rVEF ₁	118	-181,3	78	-175,5	5.729	-29,79	41,25	0,750
rCVF	118	-283,1	78	-283,0	-0,066	-40,84	40-97	0,997
rVEF ₁ /CVF	118	1.020	78	1.023	0,0021	-0,006	-12	0,641

(*) Ajustado por diferencias en sexo, edad, índice de masa corporal, hemoglobina glucosilada, tabaquismo y tiempo de diagnóstico de la diabetes
 IC: intervalo de confianza; LI: límite inferior; LS: límite superior; rVEF₁: valor residual de VEF₁; rCVF: valor residual de CVF; rVEF₁/CVF: valor residual de la relación entre VEF₁ y CVF

Cuadro 6. Concentración de los biomarcadores de inflamación por grupo de tratamiento

Biomarcador	Agentes de sensibilización a la insulina	Secretagogos	p
Proteína C reactiva ultrasensible (mg/dl)	2,06±3,46	2,72±3,93	0,3558
Ferritina (µg/l)	132,34±108,62	204,30±158,55	0,0054
Fibrinógeno (mg/dl)	414,17±101,80	423,14±108,6	0,6563
Interleucina 6 (pg/ml)	3,57±2,74	4,29±6,36	0,4240
Factor de necrosis tumoral alfa (pg/ml)	8,00±3,65	10,62±4,97	0,0018

Cuadro 7. Concentración de los biomarcadores de inflamación por grupo de tratamiento más insulinas

Biomarcador	Agentes de sensibilización a la insulina más insulinas (n=118)	Secretagogos más insulinas (n=78)	p
Proteína C reactiva ultrasensible (mg/dl)	2,89±6,79	2,28±1,52	0,4630
Ferritina (µg/l)	120,30±111,03	185,46±154,05	0,0008
Fibrinógeno (mg/dl)	434,82±119,22	445,64±118,8	0,535
Interleucina 6 (pg/ml)	3,53±2,85	4,14±5,17	0,2963
Factor de necrosis tumoral alfa (pg/ml)	8,28±4,05	10,09±5,63	0,0096

informe previo (22). Asimismo, el presente estudio es el único que simultáneamente ha registrado las diferencias en los biomarcadores de inflamación.

En el único estudio de comparación del efecto de los agentes de sensibilización a la insulina y el de otros medicamentos en la función pulmonar de los pacientes diabéticos, llevado a cabo por Kim,

et al., se observó que los valores residuales de la CVF eran menores que los del VEF₁ en pacientes tratados con agentes de sensibilización a la insulina (22). Por otro lado, en el reporte del *Copenhagen City Heart Study*, un estudio de corte transversal, se evidenció que el VEF₁ y la CVF en los pacientes diabéticos tratados con insulinas era menor que en aquellos tratados con hipoglucemiantes orales

(23). Este hallazgo explicaría por qué al agregar insulinas a los dos grupos de tratamiento en el presente estudio (metformina Vs. secretagogos), se perdieron los beneficios relacionados con un menor deterioro del VEF₁ y la CVF. Aunque no hay una explicación fisiopatológica que tenga un respaldo científico válido, podría tratarse de un efecto mitogénico de la insulina sobre el endotelio y sobre la pared alveolar, mediado por varias vías intracelulares como las cinasas de proteína activadas por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinases*, MAPK) (24).

Se han postulado diversas teorías sobre la fisiopatología del daño pulmonar de los pacientes diabéticos. Los hallazgos en las autopsias de estos pacientes y de ratas con la enfermedad revelan el compromiso microangiopático de los capilares alveolares de los tabiques y de las arterias pleurales, incluido el engrosamiento de la membrana basal epitelial y de la capilar, la hialinosis vascular, la fibrosis nodular intraseptal, los granulomas y la proteinosis focal (1). Dichos cambios anatómicos parecen deberse a la alteración bioquímica de los constituyentes del tejido conjuntivo causada por una glucosilación no enzimática de los péptidos y de proteínas como la elastina, y de las fibras de colágeno, las cuales se encuentran principalmente en la matriz extracelular pulmonar y son constitutivas de la membrana alvéolo-capilar, lo que es, a su vez, resultado de la elevación crónica de la concentración de glucosa (1).

Una de las teorías sobre la génesis de esta condición plantea que está relacionada con el estado inflamatorio crónico que provoca una mayor producción y actividad de los mediadores de inflamación, como el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB), el cual actúa principalmente en el endotelio, y de otras citocinas (interleucinas 1 y 6, TNF- α). También, se han postulado otros factores como el estrés oxidativo, el cual cumple una función patogénica en el daño de las células beta y, además, contribuye al desarrollo de la vasculopatía y la disfunción endotelial (9,10). También se ha descrito que la ferritina y las altas concentraciones de hierro pueden alterar el correcto funcionamiento celular, ya que se asocian con un aumento de la producción de radicales del tipo hidroxilo, que lesionan los lípidos de la membrana celular, de las proteínas y los ácidos nucleicos (11).

En este sentido, resulta interesante plantear que, si el principal mecanismo de alteración pulmonar está mediado por la resistencia a la insulina y la

inflamación, la utilidad de los agentes de sensibilización a la insulina sería mayor en pacientes con sobrepeso, y constituirían marcadores de la resistencia a la insulina mucho antes de que se haga el diagnóstico de diabetes. En algunos estudios longitudinales se ha encontrado que mucho antes del diagnóstico de la enfermedad los pacientes ya acusaban cambios en la función pulmonar (3,25,26). Los valores elevados de los biomarcadores pueden estar relacionados con la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares, renales y pulmonares, e incluso del cáncer, en los pacientes diabéticos (27,28). Esto también respaldaría el planteamiento de que, a largo plazo, el uso de los agentes de sensibilización a la insulina podría ayudar a disminuir la incidencia de las enfermedades cardiovasculares y pulmonares e, incluso, la probabilidad de desarrollar cáncer y de aumentar la supervivencia en pacientes con resistencia a la insulina (29-32).

Las limitaciones del presente estudio responden al hecho de que no es de naturaleza experimental y, dado que no se hizo asignación aleatoria, pudo producirse confusión debida a la prescripción de un tratamiento específico por parte del médico tratante, así como una confusión residual después del ajuste por las variables de control glucémico y de menor duración de la evolución de la diabetes. Otras limitaciones del estudio incluyen su carácter transversal y no longitudinal, lo cual no permitió hacer inferencias sobre la evolución en el tiempo, así como el tamaño de la muestra, que pudo haber influido en la poca precisión de algunos de los estimativos obtenidos, y los posibles sesgos de memoria sobre el uso previo de otros medicamentos, el uso concomitante de uno u otro agente farmacológico, y la efectiva toma de los medicamentos en el momento del estudio. Por ello, los hallazgos deben considerarse estímulos para el planteamiento de hipótesis con miras a futuras investigaciones.

En conclusión, la importancia del presente estudio radica en que se encontró una asociación entre el uso de agentes de sensibilización a la insulina del tipo de la metformina y un menor deterioro de la CVF en los pacientes diabéticos; además, el uso de este medicamento se correlacionó con valores más bajos de los biomarcadores de inflamación en sangre, específicamente el TNF- α y la ferritina. Aunque por sí solos estos resultados no podrían llevar a modificar las guías actuales de práctica clínica, sirven como base para la formulación de nuevas hipótesis, el desarrollo de trabajos

longitudinales de investigación e, incluso, ensayos clínicos para evaluar el efecto económico del uso más temprano de agentes de sensibilización a la insulina en caso de comprobarse su relación con un menor deterioro de la función pulmonar en pacientes con signos de hiperinsulinismo, y las ventajas a más largo plazo frente a enfermedades como el cáncer.

Agradecimientos

A María Ximena Rojas, a Pablo Aschner, al personal y a la dirección de la Asociación Colombiana de Diabetes y de la Fundación Neumológica Colombiana, por su colaboración en el diseño y la ejecución del estudio inicial. A María Sacramento Esguerra, auxiliar de enfermería, quien actuó como coordinadora local del estudio inicial; a Andrea Fonseca, terapeuta respiratoria, quien hizo las espirometrías del estudio; a Rubby Guanés y Martha Ríos, bacteriólogas, quienes tomaron y procesaron las muestras, y a Héctor Restrepo, epidemiólogo, por garantizar la calidad de la base de datos. Sin ellos el estudio no hubiera sido posible.

Conflictos de intereses

Ninguno de los autores declara la existencia de conflictos de intereses relacionados con el tema del estudio.

Financiación

Este estudio fue posible gracias a la financiación del Programa de Ciencia y Tecnología de la Salud de Colciencias (código del proyecto: 2239-04-16300).

Referencias

- Kaparianos A, Argyropoulou E, Sampsonas F, Karkoulias K, Tsiamita M, Spiropoulos K.** Pulmonary complications in diabetes mellitus. *Chron Respir Dis.* 2008;5:101-8. <http://dx.doi.org/10.1177/1479972307086313>
- Litonjua A, Lazarus R, Sparrow D, DeMollesc D, Weiss S.** Lung function in type 2 diabetes: The Normative Aging Study. *Respir Med.* 2005;9:1583-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmed.2005.03.023>
- Oh IH, Park JH, Lee CH, JS Park.** The association of normal range glycosylated hemoglobin with restrictive lung pattern in the general population. *PLoS One.* 2015;10:e0117725. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0117725>
- Davis TM, Knuiman M, Kendall P, Vu H, Davis WA.** Reduced pulmonary function and its associations in type 2 diabetes: The Fremantle Diabetes Study. *Diabetes Res Clin Pract.* 2000;50:153-9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8227\(00\)00166-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8227(00)00166-2)
- Walter RE, Beiser A, Givelber RJ, O'Connor GT, Gottlieb DJ.** Association between glycemic state and lung function: The Framingham Heart Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:911-6. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.2203022>
- Yeh HC, Punjabi NM, Wang NY, Pankow JS, Duncan BB, Cox CE, et al.** Cross-sectional and prospective study of lung function in adults with type 2 diabetes. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Diabetes Care.* 2008;31:741-6. <http://dx.doi.org/10.2337/dc07-1464>
- Lawlor DA, Ebrahim S, Smith GD.** Associations of measures of lung function with insulin resistance and type 2 diabetes: Findings from the British Women's Heart and Health Study. *Diabetologia.* 2004;47:195-203. <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-003-1310-6>
- Hsia CC, Raskin P.** Lung involvement in Diabetes: Does it matter? *Diabetes Care.* 2008;31:828-9. <http://dx.doi.org/10.2337/dc08-0103>
- García C, Feve B, Ferre P, Halimi S, Baizri H, Bordier L, et al.** Diabetes and inflammation: Fundamental aspects and clinical implications. *Diabetes Metab.* 2010;36:327-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2010.07.001>
- Tiengo A, Fadini GP, Avogaro A.** The metabolic syndrome, diabetes and lung dysfunction. *Diabetes Metab.* 2008;34:447-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2008.08.001>
- Jiang R, Manson J, Meigs J, Ma J, Rifai N, Hu FB.** Body iron stores in relation to risk of type 2 diabetes in apparently healthy women. *JAMA.* 2004;291:711-7. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.291.6.711>
- Klein OL, Krishnan JA, Glick S, Smith LJ.** Systematic review of the association between lung function and type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2010;27:977-87. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1464-5491.2010.03073.x>
- Dennis R, Restrepo H, Rondón M, Rojas MX, Torres Y, Aschner P.** Comparación de las pruebas de función pulmonar de pacientes con DM tipo 2 sometidos a tratamiento con insulina inyectada vs. tratamiento con hipoglucemiantes orales. *Acta Med Colomb.* 2010;35:113-8.
- Dennis R, Maldonado D, Rojas MX, Aschner P, Rondón M, Charry L, et al.** Diabetes mellitus tipo 2 y deterioro de la función pulmonar. *Acta Med Colomb.* 2008;33:105-10.
- Dennis R, Maldonado D, Rojas MX, Aschner P, Rondón M, Charry L, et al.** Inadequate glucose control in type 2 diabetes is associated with impaired lung function and, systemic inflammation: A cross-sectional study. *BMC Pulm Med.* 2010;10:38-42. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2466-10-38>
- Asociación Latinoamericana de Diabetes.** Guías ALAD 2000. Revista de la Asociación Latinoamericana de Diabetes. 2000; ¿Volumen?(Supl.1):101-67.
- American Thoracic Society.** Lung function testing: Selection of reference values and interpretative strategies. *Am Rev Respir Dis.* 1991;144:1202-18. <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm/144.5.1202>
- Hankinson JL, Odencrantz JR, Fedan KB.** Spirometric reference values from a sample of the general US population. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159:179-87. <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.159.1.9712108>
- Rojas MX, Dennis R.** Valores de referencia para parámetros espirométricos en la población adulta residente en Bogotá, DC, Colombia. *Biomédica.* 2010;30:82-94. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v30i1.156>

20. **Kim HJ, Lee JY, Jung HS, Kim DK, Lee SM, Yim JJ, et al.** The impact of insulin sensitizers on lung function in patients with chronic obstructive pulmonary disease and diabetes. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2010; 4:362-7.
21. **Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferranini E, Holman RR, Shewin R, et al.** Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: A consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: A consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care.* 2009;32:193-203. <http://dx.doi.org/10.2337/dc08-9025>.
22. **von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP.** STROBE Initiative. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: Guidelines for reporting observational studies. *J Clin Epidemiol.* 2008;61:344-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclinepi.2007.11.008>
23. **Lange P, Groth S, Kastrup J, Mortensen J, Appleyard M, Nyboe J, et al.** Diabetes mellitus, plasma glucose and lung function in a cross-sectional population study. *Eur Respir J.* 1989;2:14-9.
24. **Goalstone ML, Carel K, Leitner J, Draznin B.** Insulin stimulates the phosphorylation and activity of farnesyl-transferase via the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology.* 1997;138:5119-23. <http://dx.doi.org/10.1210/endo.138.12.5621>
25. **McKeever TM, Weston PJ, Hubbard R, Fogarty A.** Lung function and glucose metabolism: An analysis of data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol.* 2005;161:546-56. <http://dx.doi.org/10.1093/aje/kwi076>
26. **Hickson DA, Burchfiel CM, Liu J, Petrini MF, Harrison K, White WB, et al.** Diabetes, impaired glucose tolerance, and metabolic biomarkers in individuals with normal glucose tolerance are inversely associated with lung function: The Jackson Heart Study. *Lung.* 2011;189:311-21. <http://dx.doi.org/10.1007/s00408-011-9296-1>
27. **Guo Y, Xu F, Lu T, Duan Z, Zhang Z.** Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treat Rev.* 2012;38:904-1010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.04.007>
28. **Kang X, Kong F, Wu X, Ren Y, Wu S, Wu K, et al.** High glucose promotes tumor invasion and increases metastasis-associated protein expression in human lung epithelial cells. *Cell Physiol Biochem.* 2015;35:1008-22. <http://dx.doi.org/10.1159/000373928>
29. **Lin JJ, Gallagher EJ, Sigel K, Mhango G, Galsky MD, Smith CB, et al.** Survival of patients with stage IV lung cancer with diabetes treated with metformin. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;191:448-54. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201407-1395OC>
30. **Mahmood K, Naeem M, Rahimnadjad N.** Metformin: The hidden chronicles of a magic drug. *Euro J Intern Med.* 2013;24:20-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2012.10.011>
31. **DeCensi A, Matteo P, Goodwin P, Cazzaniga M, Gennari A, Bonanni B, et al.** Metformin and cancer risk in diabetic patients: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev Res (Phila).* 2010;3:1451-61. <http://dx.doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0157>
32. **Sakoda LC, Ferrara A, Achacoso NS, Peng T, Ehrlich SF, Quesenberry CP Jr, et al.** Metformin use and lung cancer risk in patients with diabetes. *Cancer Prev Res.* 2015;8:174-9. <http://dx.doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0291>

ORIGINAL ARTICLE

Serotonin transporter gene (*5-HTT*) polymorphism and major depressive disorder in patients in Bogotá, Colombia

Isabel Pérez-Olmos¹, Delia Bustamante², Milcíades Ibáñez-Pinilla¹

¹ Centro de Investigación, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, D.C., Colombia

² Programa de Especialización en Psiquiatría, Universidad del Rosario, Bogotá, D.C., Colombia

Introduction: The *5-HTT* short allele has been controversially associated with an increased risk of major depressive disorder.

Objective: To determine the association of *5-HTT* short allele with major depression in Bogotá, Colombia.

Materials and methods: We carried out a study of cases (n=68) matched 1:1 with controls by gender and age (± 5 years). Major depression was diagnosed using the Mini-International Neuropsychiatric Interview, and *5-HTT* polymorphism using PCR.

Results: Females were predominant (82.4%). The S (short) allele predominated in cases compared with controls (S: 72.1% vs. 63.2; L (long): 27.9% vs. 36.8%), and the SL genotype was more frequent in cases (SL: 45.6% vs. 36.8%; LL: 27.9% vs. 36.8%; SS: 26.5% vs. 26.5%), although not significantly. There were significant differences in those under age 37, with a predominance of the S allele in cases ($p=0.038$; OR=2.75; 95% CI: 0.88-8.64). Multivariate analysis, adjusted for comorbid anxiety disorders, showed a significant association of major depression with the SL genotype ($p=0.049$; OR=3.20; 95% CI: 1.00-10.23); the S allele was close to statistical significance ($p=0.063$; OR=2.94; 95% CI: 0.94-9.13), and it was statistically significant in cases under 37 years of age ($p=0.026$; OR=10.79; 95% CI: 1.32-80.36).

Conclusions: The SL genotype was associated with major depressive disorder in patients of all ages. The S allele was significantly associated with major depressive disorder in patients under age 37, adjusted for comorbid anxiety disorders.

Key words: serotonin; polymorphism, genetic; depressive disorder, major; anxiety disorders; suicide; risk; comorbidity.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.3014>

Polimorfismo del gen del transportador de serotonina (*5-HTT*) y trastorno de depresión mayor en pacientes en Bogotá, Colombia

Introducción. El polimorfismo *5-HTT* se ha asociado con el trastorno de depresión mayor, aunque el planteamiento ha generado controversia.

Objetivo. Determinar la asociación del polimorfismo *5-HTT* con la depresión mayor en Bogotá, Colombia.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio de casos y controles pareado por sexo y edad (± 5 años), con una razón de uno a uno (68:68). El trastorno de depresión mayor se diagnosticó con el cuestionario *Mini-International Neuropsychiatric Interview*, y, el polimorfismo *5-HTT*, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Resultados. Las mujeres predominaron entre los participantes (82,4 %). El alelo corto (*short*, S) predominó en los casos comparados con los controles (S: 72,1 % Vs. 63,2; L (*long*): 27,9 % Vs. 36,8 %), y el genotipo SL fue más frecuente en los casos (SL: 45,6 % Vs. 36,8 %; LL: 27,9 % Vs. 36,8 %; SS: 26,5 % Vs. 26,5 %), aunque no significativamente. Hubo diferencias significativas en menores de 37 años, con predominio del alelo S en los casos ($p=0,0384$; *odds ratio* - OR=2,75; IC_{95%}: 0,88-8,64). El análisis multivariado ajustado por trastornos concomitantes de ansiedad mostró una asociación significativa de la depresión mayor con el genotipo SL ($p=0,049$; OR=3,20; IC_{95%}: 1,003-10,233); el alelo S estuvo cerca de la significación estadística ($p=0,063$; OR=2,94; IC_{95%}: 0,94-9,13), y fue estadísticamente significativo en los casos de menores de 37 años ($p=0,026$; OR=10,79; IC_{95%}: 1,32-80,36).

Author's contributions:

All authors significantly contributed to the study design, the research protocol, the search of bibliography on the topic, data base quality, statistical analysis, and to the drafting of the manuscript.

Conclusiones. El genotipo SL se asoció con el trastorno de depresión mayor en pacientes de todas las edades. El alelo S se asoció significativamente con el trastorno de depresión mayor en pacientes menores de 37 años al ajustar por trastornos concomitantes de ansiedad.

Palabras clave: serotonina, polimorfismo genético, trastorno depresivo mayor, trastornos de ansiedad, suicidio, riesgo, comorbilidad.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.3014>

The major depressive disorder is a globally significant public health problem. It is highly prevalent, chronic and incapacitating, it occurs frequently with comorbidities, and results in loss of productivity, increased mortality rates, and, additionally, its medical treatment is very expensive for countries.

Lifetime prevalence of major depression episodes in the general population varies considerably among countries, although in most it is 8-12%; in some, like Japan, it is 3%, and in others, like the United States, it is 16.9% (1). In Colombia, the last National Mental Health Survey conducted in 2003 showed a lifetime prevalence of mood disorders of 15.0%, with major depressive disorder being the most frequent (12.1%) (2).

According to the World Health Organization (WHO), the major depressive disorder is one of the most common causes of disability and burden of disease worldwide (3,4); it is projected that it will be in the second place in 2020, and in the first place in 2030 (4). The major depressive disorder is one of the five main factors associated with absenteeism and decreased work capacity (5). Added to the medical treatment costs are those caused by the loss of productive capacity and decreased work performance (6).

In Colombia, the major depressive disorder is the first cause of disease burden in women, and the second in men, after cardiovascular diseases, especially in the most productive ages (7).

The major depressive disorder is a complex, multifactorial disease, with very heterogeneous clinical manifestations, whose etiological and pathological mechanisms have not been completely elucidated. It is considered inheritable, of polygenic origin, with clinical manifestations resulting from genetic-

environmental interactions (8). The heritability of the major depressive disorder has been estimated at 37%, with a range of 31-42% (9). The characteristics of the familial pattern include early appearance of symptoms, chronic course, and frequent recurrences (10). Having a first-degree relative with major depressive disorder increases the risk of developing it by two to three times, compared with the risk of the general population (11). In addition, some authors have proposed a greater heritability of the major depressive disorder in women than in men (12).

One of the most noted factors in the biological etiology and pathological pathways of the major depressive disorder has been the serotonin transporter, 5-HTT (SERT); many current antidepressant medications exert their effect here. The transporter regulates the concentration of serotonin in the synaptic space, being essential for mood regulation (13).

The gene that codes the serotonin transporter protein in the presynaptic neurons is located on the long arm of human chromosome 17 (17q11-12). The insertion/deletion (in/del) polymorphism of 44 bp in the transcription control region has been one of the most studied in the *5-HTT* gene. This polymorphism results in two allele variations with different sizes and activity: A long allele (L) with 16 repetitions, and a short one (S), with 14. Each individual may be a carrier of one of the two homozygotic combinations, LL, SS, or a heterozygotic combination, SL. In human cells, the S allele reduces the activity of the transporter, which decreases the levels of messenger RNA and the expression of presynaptic 5-HTT (14-16). It has been found that the LL cells can produce messenger RNA levels for *5-HTT* 1.4 to 1.7 times greater than those of the short allele (14). In turn, the LL variant of *5-HTT* is capable of removing 1.9 to 2.2 times more serotonin from the synaptic cleft than the SS or SL variants (17). The short allele of this polymorphism produces lower levels of transporter transcription, which has associated it with a greater risk of bipolar and unipolar mood disorders (18,19).

Corresponding author:

Isabel Pérez-Olmos, Centro de Investigación, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Carrera 24 N° 63C-69, Bogotá, D.C., Colombia
Telefax: (571) 297 0200, extension 3426
isabel.perez@urosario.edu.co

Received: 03/08/15; accepted: 06/01/16

The association of this mutation with major depressive disorder has been one of the most researched, reporting a statistically significant association. Haenisch, *et al.*, found a significant association between the short (S) allele and major depressive disorder (19). However, the results have been controversial, since they have not coincided among researchers. Some authors have found this statistical association between the 5-HTT (in/del O indel) polymorphism and mood disorders, particularly major depression, shown additionally in meta-analyses such as that of López-León (19-21). Anguelova, *et al.*, also found a strong association between the 5HTT gene in/del polymorphism and the risk of suicide (22), and other authors demonstrated the association between this polymorphism and bipolar affective disorder (20,23). However, in Western European descendants, Hoehe, *et al.*, found no significant differences in the genotypic or allele frequencies of the 5-HTT polymorphism in 36 patients with major depression, 79 with bipolar I disorder, and 294 controls (24). In Germany, Minov, *et al.*, found a greater proportion of SS homozygotes in 173 cases of major depression (23.1%) compared with 121 controls (14.0%), although the difference was not statistically significant (25). Medlewicz, *et al.*, in a large, multi-centric study in Europe, found no significant differences in 539 cases of major unipolar depression and 821 controls regarding the effect of this polymorphism on the susceptibility to major depression; in this study, the authors discarded the possibility of negative results being attributable to a lack of statistical power (26). Serretti, in turn, did not find an association between 5HTT polymorphism and severe psychotic disorders in Italy (27).

Three studies have been published in Colombia on the association of 5-HTT polymorphism with mood disorders. Two of them have involved bipolar disorder cases (BPD I): one in Medellín with participants from all the department of Antioquia (28), and the other, in the Colombian coffee-growing region (departments of Risaralda and Quindío) (29).

Only one of the Colombian studies involved major depressive disorder cases (30). These three studies found no statistically significant association between 5-HTT polymorphism and the evaluated mood disorder. However, this last study on major depressive disorder showed that the absence of the S allele conferred a protective tendency against the major depressive disorder, although it did not achieve statistical significance.

The present study evaluated the association between the in/del polymorphism of the serotonin transporter gene (5-HTT) and major depressive disorder in a group of Colombian patients residing in Bogotá, Colombia.

Materials and methods

This was a case-control study paired by sex and age (± 5 years).

Recruitment process

Cases and controls were recruited between September, 2011, and July, 2013, in outpatient departments and hospitalization services in private psychiatric institutions and public hospitals in Bogotá, especially in those where *Universidad del Rosario's* psychiatry residents and collaborating psychiatrists carried out their practice. Patients and controls assessed with the Mini-International Neuropsychiatric Interview (MINI), were screened for major depressive disorder and other axis I disorders.

Selection criteria

The inclusion of participants was based on the fulfillment of the diagnostic criteria for major depressive disorder established in the American Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV-TR). The potential cases were patients diagnosed as major depressive disorder cases in the psychiatric services in Bogotá. Exclusion criteria for cases included those patients who had a major depressive episode in the context of a bipolar mood disorder, mental retardation, or pervasive developmental disorder; patients with psychotic symptoms characteristic of schizophrenia or other psychoses, or those who did not want to participate in the study. After evaluating the inclusion and exclusion criteria, and signing the informed consent, 87 cases that fulfilled the selection criteria were initially pre-selected.

We selected the controls from hospital and university academic and administrative personnel after inviting adult volunteers from all departments of the institutions collaborating in the study to participate. An individual appointment was set up to evaluate the inclusion and exclusion criteria and for participants to sign the informed consent, until the required number of controls was recruited among those who did not fulfill the diagnostic criteria for major depressive disorder using the structured MINI interview.

The exclusion criteria for controls were the following: those who had a bipolar affective disorder, potential controls with a family history of major depressive

disorder, or controls using illegal psychoactive substances, due to the known association between these disorders and mood disorders. We selected 131 controls from the above-mentioned institutions. Participants were between 18 and 79 years old, residing in Bogotá, who agreed to participate in the study by signing the informed consent.

Data collection and study variables

The data collection instrument included demographic variables (age, educational level, gender, marital status, socioeconomic status), as well as the body mass index (BMI), co-morbidities, use of psychoactive substances, smoking and/or alcohol consumption, other axis I diagnoses from the DSM-IV-TR, prior hospitalizations in mental health units, prior treatment with anti-depressants, family history of mental illness, characteristics of the major depressive illness (relapses, presence of melancholic symptoms), suicidal behavior, and the results on the presence of *5-HTT* gene polymorphism.

Genetic analysis

Blood samples were taken for genotyping. For both cases and controls, subjects on whom genotyping could not be performed were excluded. After applying the inclusion and exclusion criteria, and the pairing techniques according to sex and age variables to pre-selected cases and controls, the final group included 136 participants, 68 cases and 68 controls, paired by sex and age (± 5 years).

Genetic analysis was performed in the Genetics Department of the *Universidad del Rosario* as described below. The peripheral blood samples underwent DNA extraction using conventional salting out techniques. A polymerase chain reaction (PCR) was performed with specific primers designed for analyzing *5-HTT* polymorphism. All the amplified products were analyzed in agarose gels stained with 1.2% ethidium bromide. For each PCR run, a negative control was used, which established the absence of contamination. Genotypification was performed by two geneticists from the *Universidad del Rosario* Genetics Department, with independent evaluations. No analytical discrepancies or Mendelian errors were seen. The analyzed alleles pertained to insertion (419 bp) or deletion (375 bp) of 44 bp.

Statistical analysis

The information obtained from the cases and controls was transcribed to a data base (Microsoft Office Excel, version 2010). In order to guarantee

the quality of the information and avoid classification biases, data base cleansing was performed with verification by two observers. Finally, transcription errors were evaluated with simple frequencies and logical cross-checks between variables. Processing was done on Epi-Info, version 7.0; STATA® 11.0, and SPSS®, version 20.0.

We described independent variables and evaluated the normality of the quantitative variables using the Shapiro-Wilk test with a 10% significance level ($p < 0.10$). For continuous and discrete quantitative variables with an approximately normal distribution, the arithmetic mean was used as the measure of central tendency, and standard deviation as the measure of dispersion. For quantitative variables with a non-normal distribution, we used the median and the range. Categorical variables were displayed in tables with absolute and relative frequencies expressed in percentages.

In the bivariate analysis, we evaluated the probability of the presence of associated qualitative factors with a dichotomous variable (exposure) and major depression. We used 2 x 2 tables to obtain the odds ratio (OR) and its respective 95% confidence interval, with estimations of paired maximum-likelihood, McNemar's chi squared test for asymptotic association, and the Mantel-Haenszel test without correction and with continuity correction (expected values ≥ 5), or Fisher's exact test, or the mid-p test, for related samples (expected values < 5).

In factors associated with a multinomial variable, we used the conditional logistic regression for paired cases and controls with a 1:1 ratio through contrasts for indicator variables, taking one of the k categories as a base and creating $k-1$ indicator variables. Factors with a quantitative variable were also evaluated using conditional logistic regression. The interaction or modification of the factors' effects was evaluated in the conditional logistic regression model. Previously, we evaluated the assumption of multi-collinearity between the independent variables.

We evaluated the association between *5-HTT* gene polymorphism and major depressive disorder adjusting for confounding variables, and using the conditional logistic regression model, as well as the presence of Hardy-Weinberg equilibrium by Pearson's chi-squared test. The level of significance used in the bivariate and multivariate analysis was 5% ($p < 0.05$).

We performed a post hoc power analysis. Exploring the association of the *5-HTT* polymorphism and major depression disorder in a multivariate analysis

of 68 matched cases and controls of all ages, the SL genotype was present in 36.8% of controls and in 45.6 % of cases, yielding an OR of 3.2 with a 95% confidence level ($p=0.049$) and a statistical power of 90.6%.

We analyzed the association of the 5-HTT polymorphism and major depression disorder in 35 matched young cases (36 years old or younger), and found that the S allele was present in 51.5% of controls and in 74% of cases, yielding an OR of 2.75 with a 95% confidence level; however, the statistical power was 49.1%, probably because the younger cases were a small sample of 35 cases and 33 controls.

The project was approved by the Research Ethics Committee of the *Universidad del Rosario*, and classified as a minimal risk study, since a blood sample no greater than 10 ml was taken from participants. All patients and controls signed an informed consent for the use of their DNA samples. The project adhered to the national ethical norms as stated in Resolution 8430 of 1993, and the international ethical norms for human research.

Results

The study group included 136 individuals: 68 cases and 68 controls. According to the results of the structured DSM-IV-TR MINI interview, the cases fulfilled the criteria for major depressive disorder; 70.6% of these patients had melancholic symptoms, and 64.2% had some degree of suicide risk; the suicide risk was classified as slight (32.8%), severe (25.4%), and moderate (6.0%); 47.1% ($n=32$) of participants had received prior antidepressant therapy, and 19.1% of them ($n=13$), more than one treatment. The most prescribed medications were fluoxetine (40%), sertraline (24%) and amitriptyline (9%).

In the general group there was a 4.7:1 female-male ratio, a mean age of 37.7 ± 11.1 O 37.7 ± 11.1 years and a median of 36 years that was used as a cut-off point for exploring the association of the 5-HTT gene polymorphism and the major depressive disorder risk. Although most participants were single (42.8%), 43.4% reported having a stable partner; 25.7% of participants had professional training; 20.6% had completed graduate studies, and 1.5% had not attended school. As for their socio-economic status, most participants belonged to middle levels: 39.7% to level 3 (out of 6) and 25.7% to level 2 (out of 6). There were no significant differences in demographic variables between cases and controls (table 1).

Table 1. Socio-demographic variables, 5-HTT polymorphism, and major depressive disorder. Paired case-control study. Bogotá, Colombia, 2013.

Variable	Cases		Controls		p
	n	%	n	%	
Age group (years)					
≤36	35	51.5	33	48.5	0.732
≥37	33	48.5	35	51.5	
Total	68	100	68	100	
Sex					
Women	56	82.4	56	82.4	1.000
Men	12	17.6	12	17.6	
Total	68	100	68	100	
Marital status					
Married or stable partner	39	57.4	39	57.4	1.000
Single or separated	29	42.6	29	42.6	
Total	68	100	68	100	
Economic status					
Low (1 & 2)	20	29.4	16	23.5	0.690
Middle (3 & 4)	41	60.3	43	63.2	
High (5 & 6)	7	10.3	9	13.2	
Total	68	100	68	100	
Educational level					
High	30	44.1	33	48.5	0.112
Middle	22	32.4	28	41.2	
Low	16	23.5	7	10.3	
Total	68	100	68	100	

Clinical characteristics and history

The average body mass index (BMI) of cases was 24.7 ± 4.8 O 24.7 ± 4.8 kg/m² (med=24), and of controls, 23.9 ± 3.1 kg/m² (med=24), without significant differences ($p=0.576$, Wilcoxon's test). The prevalence of current smoking was significantly greater in cases than in controls (23.5% vs. 2.9%; $p=0.0003$; OR=15; 95% CI: 1.98-113.56); there was no association between alcohol use and major depression. In the evaluation of family and personal history there was a greater frequency of prior depression and antidepressant therapy in cases than in controls ($p<0.001$, McNemar's test) (table 2).

Psychiatric comorbidities

The comorbidities found to be significantly associated with major depressive disorder among cases were anxiety disorder sometime in their lifetime, and generalized anxiety disorder; the other comorbidities did not show a significant association. The severity of suicide risk was greater in cases than in controls (slight: 32.8% vs. 4.4 %, moderate: 6.0% vs. 0%, and severe: 25.4% vs. 0%) ($p<0.001$; OR=42.0; 95% CI: 5.78-305.16) (table 3).

Table 4 shows the distribution of the genotype and allele frequencies of the 5-HTT gene in the study sample. The study population was in Hardy-

Weinberg equilibrium ($p > 0.05$). The SL genotype and S allele group frequency was greater in cases than in controls, although with no significant difference; the frequency of the S allele was significantly greater in the group of cases under the age of 37.

Multivariate analysis

In the conditional logistic regression model, the SL heterozygote of the *5-HTT* gene polymorphism was found to be significantly associated with major depression after adjusting for co-morbid anxiety disorders (generalized anxiety and anxiety disorder at least once in their lifetime). The severity of the suicide risk was found to be very significantly associated with major depression, and was ultimately excluded from the model due to its high colinearity with generalized anxiety disorder ($p = 0.018$; OR=5.15; 95% CI: 1.26-20.96) and with anxiety disorder at least once in their lifetime ($p = 0.003$; OR=3.89; 95% CI: 1.53-9.88).

In the conditional logistic regression model, the S allele was found to be borderline significant for

major depression ($p = 0.063$; OR=2.94; 95% CI: 0.94-9.13) after adjusting for the same variables (table 5).

Stratifying by age group, in those under 37 years, the S allele showed a significant association with major depression after adjusting for comorbid anxiety disorders ($p = 0.026$; OR=10.79; 95% CI: 1.32-80.36).

Discussion

The socio-demographic characteristics of the participants in this study were similar to those reported in other parts of the world (31). Major depressive disorder is more frequent in women, the unemployed, and single or separated individuals, irrespective of socio-economic status. Likewise, the frequency of use of psychoactive substances did not differ greatly from that found previously in the national population, except for a higher frequency of smoking in the major depressive disorder cases in this study (2).

Our results showed a distribution of the *5-HTT* gene polymorphism similar to that of three other

Table 2. Clinical and familial variables, *5-HTT* polymorphism and major depressive disorder. Paired case-control study. Bogotá, Colombia, 2013

Variable	MDD Cases		Controls		p value	OR (95% CI)
	n	%	n	%		
PSC consumption	3	4.4	0	0	NA	
Lifetime smoking	19	27.9	10	14.7	0.046	2.29 (2.29-5.56)
Current alcohol consumption	17	25.0	25	36.8	0.103	0.50 (0.214-1.168)
Psychiatric hospitalization	11	16.2	0	0	NA	
Previous antidepressant treatment	32	47.1	1	1.5	<0.001	
More than one antidepressant treatment	13	19.1	0	0	NA	
MDD in family	26	38.2	3	4.4	<0.001	12.50 (2.961-52.774)
BPD in family	3	4.4	4	5.9	0.500	0.750 (0.168-3.351)
Suicide in family	5	7.4	0	0	NA	
Schizophrenia in family	4	5.9	3	4.4	0.500	1.33 (0.298-5.958)

PSC: Psychoactive substance consumption; BPD: Bipolar disorder; MDD: Major depression disorder; NA: Does not apply

Table 3. Psychiatric diagnosis and comorbidity, *5-HTT* polymorphism and major depressive disorder (MDD). Paired case-control study. Bogotá, Colombia, 2013

		MDD cases		Controls		p	OR (95% CI)
		n	%	n	%		
Lifetime anxiety disorder	+	21	30.9	2	2.9	<0.001	20.0 (2.684-149.028)
Agoraphobia	+	7	10.3	0	0	NA	
Social phobia	+	5	7.4	4	5.9	0.500	1.25 (0.336-4.655)
Obsessive-compulsive disorder	+	4	5.9	3	4.4	0.500	1.33 (0.298-5.958)
Anorexia	+	2	2.9	0	0	NA	
Bulimia	+	3	4.4	2	2.9	0.500	1.50 (0.251-8.977)
Generalized anxiety disorder	+	9	13.2	1	1.5	0.011	9.00 (1.140-71.040)

NA: Does not apply

Table 4. 5-HTT polymorphism and major depressive disorder. Genotype and allele frequency by age group. Paired case-control study. Bogotá, Colombia, 2013

Age (years)	5-HTT polymorphism	Cases		Controls		p	OR (95% CI)
All ages	Genotype	n	%	n	%		
	LL	19	28	25	36.8		1.000
	SS	18	27	18	26.5	0.514	1.38 (0.524-3.629)
	SL	31	46	25	36.8	0.237	1.62 (0.729-3.596)
	Alleles						
	S	49	72	43	63.2	0.173	1.54 (0.724-3.299)
	L	19	28	25	36.8		1.000
≤36	Genotype						
	LL	9	26	16	48.5		1.000
	SS	10	29	9	27.3	0.299	2.32 (0.475-1.306)
	SL	16	46	8	24.2	0.079	2.83 (0.887-9.011)
≥37	Alleles						
	S	26	74	17	51.5	0.038	2.75 (0.876-8.637)
	L	9	26	16	48.5		
	LL	10	30	9	25.7		1.000
	SS	8	24	9	25.7	0.731	0.79 (0.203-3.061)
	SL	15	46	17	48.6	0.838	0.87 (0.237-3.219)
	S	23	70	26	74.3	0.500	0.83 (0.254-2.730)
	L	10	30	9	25.7		

Table 5. Multivariate analysis of association of the 5-HTT polymorphism and major depression disorder. Paired case-control study. Bogotá, Colombia, 2013

Variable	p	OR	OR 95 % CI
Generalized anxiety disorder	0.110	6.38	0.656 - 62.132
Lifetime anxiety disorder	0.003	23.80	2.849 -198.763
SS genotype	0.288	2.14	0.527 - 8.672
SL genotype	0.049	3.20	1.003 - 10.238
LL genotype	1.000		

studies carried out in Colombian population (28-30). The genotype frequencies of Colombian cases and controls including those from the present study are summarized in table 6.

In both Colombian studies on borderline personality disorder 1 (BPD1) cases, a greater frequency of the SS genotype and S allele was found in the evaluated population, similar to what was found in a Spanish population compared with European populations. The study by Ospina-Duque, *et al.*, found an excess of the S allele, 53% in controls from Antioquia. Although Ospina-Duque did not find an association of 5-HTT polymorphism with BPD 1, they did find a greater frequency of some clinical characteristics of BPD 1 in the presence of the S allele: Greater clinical severity, greater frequency of manic episodes, younger age at onset of the disorder, and psychotic symptoms. The psychotic symptoms associated with the S allele reached statistical significance when the Ospina-Duque

group combined them with data reported by Ho, *et al.*, thereby confirming the hypothesis that the S allele acts as a modifier of the BPD 1 phenotype (28,32).

On the other hand, the BPD1 cases evaluated by Rengifo in the Colombian coffee growing region showed a non-statistically significant increase of the LL genotype in cases compared to controls (22.6% vs. 13.3%). When separated by sex, the LL genotype was more frequent in women with BPD 1 than in control women (22.7% vs. 11.6%), although the frequency of this genotype was similar in women and men with BPD 1 (22.7 % vs. 22.2%). The distribution of the SS genotype was similar in cases of BPD 1 and controls in Rengifo's study (33.1% vs. 31.7%), and similar to the distribution found in cases of MDD and controls in our study (26.5% vs. 26.5%) (29).

The distribution of 5-HTT genotypes in Escobar, *et al.*'s major depressive disorder study in a population from Caldas department in Colombia, was similar to that in our study (30). Regarding the risk of major depression, Escobar's study showed a tendency to major depression risk in the presence of the S allele, and, therefore, protection in its absence, although according to our findings, this tendency did not reach statistical significance (30).

We found a high comorbidity of major depression and anxiety disorders, particularly anxiety disorders at least once in participants' lifetime. The literature

Table 6. *5-HTT* gene polymorphism frequency in Colombian populations

(28) n (%)			(29) n (%)		
BPD 103 (47.9)	Controls 112 (52.1)	Total (n=215)	BPD I 133 (52.6)	Controls 120 (47.4)	Total (n=253)
SS	27 (26.2)	29 (25.8)	56 (26)	44 (33.1)	38 (31.7)
LS	47 (46.5)	61 (54.4)	108 (50.2)	59 (44.4)	66 (55)
LL	29 (28.1)	22 (19.6)	51 (23.7)	30 (22.6)	16 (13.3)
(30) n (%)			This article n (%)		
MDD 59 (50)	Controls 59 (50)	Total (n=118)	MDD 68 (50)	Controls 68 (50)	Total (n=136)
SS	18 (30.5)	11 (18.7)	29 (24.6)	18 (26.5)	36 (26.5)
LS	27 (45.8)	30 (50.8)	57 (48.3)	31 (45.6)	56 (41.2)
LL	14 (23.7)	18 (30.5)	32 (27.1)	19 (27.9)	44 (32.4)

BPD: Bipolar disorder cases; BPD 1: Bipolar disorder 1 cases; MDD: Major depression disorder cases

has shown an association between anxiety disorders and the S allele and SS genotype of the *5-HTT* gene. As expected, major depression was also found to be strongly associated with suicide risk, and suicide risk with anxiety disorders, and this association persisted in the multivariate analysis, from which suicide risk had to be excluded due to its high colinearity with anxiety disorders. This strong association between the *5-HTT* S allele, anxiety disorders, major depressive disorder and the risk of suicide was found especially in individuals under 37 years with SS homozygotes or SL heterozygotes, similar to the findings of other authors (33). The literature also shows high rates of comorbidity between major depressive disorder and anxiety disorders. Some authors recognize anxiety as an axial symptom in major depression, and have found evidence of the relationship between the polymorphism evaluated in this study and anxious symptoms, the activity of the amygdala and the anxiety response (33-36). In addition, some authors have pointed out that the comorbid anxiety disorders of major depression increase implicit suicide risk (37).

Regarding the controversial results reported in the literature on the association of the *5-HTT* gene in/del polymorphism and major depression, it may be that sample size in some of the non-conclusive studies was very small and, thus, hindered their statistical power for finding significant differences between patients and controls, or they may have been affected by the selection of cases with very heterogeneous psychiatric phenotypes, a lack of

adequate classification of cases and controls, the age of the compared groups, or the geographic origin, among other reasons (20,21). With the increased number of studies of this polymorphism and the subsequent increase in sample size, a greater statistical significance has been registered for this association, especially in the meta-analyses that have been undertaken.

In this study's sample, the most frequent genotype was the SL heterozygote, which agrees with previous findings in the Colombian population.

The SL heterozygote polymorphism of the *5-HTT* gene was found to be significantly associated with major depression, after adjusting for comorbid generalized anxiety disorders and anxiety disorder at least once in their lifetime. The severity of suicide risk was found to be very significantly associated with major depression, and was ultimately excluded from the multivariate model due to its high colinearity with generalized anxiety disorder. The S allele of the *5-HTT* gene, adjusting for the same variables, was borderline significant.

After adjusting for co-morbid anxiety disorders, a statistically significant association was found between the S allele of the *5-HTT* gene and major depressive disorder in individuals under the age of 37. It is likely that younger cases of major depressive disorder have a higher genetic influence that has made them more susceptible to the earliest form of the disorder; therefore, it is more likely to find these genetic associations in younger people.

The factors associated with major depressive disorder were comorbidity with anxiety disorders (anxiety disorder at least once in their lifetime, and generalized anxiety disorder), suicide risk, and family history of depression. A familial tendency towards suicide was also found among cases.

This study evaluated the association between a single genetic polymorphism (5-HTT gene) and major depressive disorder. Given the polygenic nature of the major depressive disorder, new studies will be needed to evaluate multiple genetic characteristics.

Some associations showed a tendency towards a difference between the case and control groups, but the small sample size could have impeded a statistical significance level. The evaluated sample is not representative of the major depressive disorder cases in the city of Bogotá, nor do the controls represent the Bogotá's local population, and, therefore, results cannot be generalized. The sample was selected from the same population base and was homogeneous in terms of residence in Bogotá. Additionally, comparability between cases and controls and the validity of the statistical analysis is supported by the fact that no statistically significant differences between cases and controls were found in socio-demographic characteristics such as age, gender, education, socioeconomic level and marital status. It would be inferred that cases and controls differ as regards the presence or absence of the major depressive disorder and the factors closely related to the disorder.

It is also necessary to evaluate the triallelic model of the 5-HTT gene and the influence of polymorphisms of other genes involved in the susceptibility to major depressive disorder. Financial limitations prevented further assessment of other variants in 5-HTT gene, as well as the study of a larger sample of cases and controls. Subsequent studies are needed with larger samples that are representative of people with major depression in Bogotá and other regions of the country.

Acknowledgments

To the Psychiatric and Genetics Departments at *Universidad del Rosario*, particularly the geneticists Dora Fonseca and Jubby M. Gálvez, who typified the 5-HTT polymorphism, and to the psychiatrists who referred their patients to the study. To the patients and controls who, with their participation, made this study possible.

Conflicts of interest

There were no scientific, academic, or economic conflicts of interest.

Funding

This research was financed by *Universidad del Rosario*.

References

1. **Andrade L, Caraveo-Anduaga JJ, Berglund P, Bijl RV, De Graaf R, Vollebergh W, et al.** The epidemiology of major depressive episodes: Results from the International Consortium of Psychiatric Epidemiology (ICPE) Surveys. *Int J Methods Psychiatr Res.* 2003;12:3-21. <http://dx.doi.org/10.1002/mpr.138>
2. **Ministerio de la Protección Social de Colombia.** Estudio Nacional de Salud Mental, Colombia, 2003. Accessed: May 15, 2011. Available from: http://onsm.ces.edu.co/uploads/files/1243030_EstudioNacionalSM2003.pdf.
3. **Mathers CD, Loncar D.** Updated projections of global mortality and burden of disease, 2002-2030: Data sources, methods and results, 2005. Accessed: September 24, 2012. Available from: <http://www.who.int/healthinfo/statistics/bodprojectionspaper.pdf>.
4. **World Health Organization WHO.** The Global Burden of Disease: 2004 update. Accessed: June 10, 2012. Available from: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf.
5. **Kessler RC, Greenberg PE, Mickelson KD, Meneades LM, Wang PS.** The effects of chronic medical conditions on work loss and work cutback. *J Occup Environ Med.* 2001;43:218-25.
6. **Punakallio A, Lusa S, Luukkonen R, Airila A, Leino-Arjas P.** Musculoskeletal pain and depressive symptoms as predictors of trajectories in work ability among Finnish firefighters at 13-year follow-up. *J Occup Environ Med.* 2014;56:367-75. <http://dx.doi.org/10.1097/JOM.0000000000000139>
7. **Acosta N.** Carga de enfermedad, Colombia, 2005: resultados alcanzados. Documento técnico ASS/1502-08. 2008. Accessed: February 10, 2011. Available from: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/INEC/UNIV/PresentacionCarga_Informe2005.pdf.
8. **Ebmeier KP, Donaghey C, Steele JD.** Recent developments and current controversies in depression. *Lancet.* 2006;367:153-67. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)67964-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(06)67964-6)
9. **Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS.** Genetic epidemiology of major depression: Review and meta-analysis. *Am J Psychiatry.* 2000;157:1552-62. <http://dx.doi.org/10.1176/appi.ajp.157.10.1552>
10. **McGrath LM, Cornelis MC, Lee PH, Robinson EB, Duncan LE, Barnett JH, et al.** Genetic predictors of risk and resilience in psychiatric disorders: A cross-disorder genome-wide association study of functional impairment in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2013;162B:779-88. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.b.32190>
11. **Levinson DF.** The genetics of depression: A review. *Biol Psychiatry.* 2006;60:84-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.08.024>

12. **Kendler KS, Gardner CO, Neale MC, Prescott CA.** Genetic risk factors for major depression in men and women: Similar or different heritabilities and same or partly distinct genes? *Psychol Med.* 2001;31:605-16.
13. **Hariri AR, Holmes A.** Genetics of emotional regulation: The role of the serotonin transporter in neural function. *Trends Cogn Sci.* 2006;10:182-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tics.2006.02.011>
14. **Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, et al.** Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science.* 1996;274:1527-31. <http://dx.doi.org/10.1126/science.274.5292.1527>
15. **Neumeister A, Young T, Stastny J.** Implications of genetic research on the role of the serotonin in depression: Emphasis on the serotonin type 1A receptor and the serotonin transporter. *Psychopharmacology (Berl).* 2004;174:512-24. <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-004-1950-3>
16. **Stockmeier CA.** Involvement of serotonin in depression: Evidence from postmortem and imaging studies of serotonin receptors and the serotonin transporter. *J Psychiatr Res.* 2003;37:357-73. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3956\(03\)00050-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3956(03)00050-5)
17. **Serretti A, Calati R, Mandelli L, De Ronchi D.** Serotonin transporter gene variants and behavior: A comprehensive review. *Curr Drug Targets.* 2006;7:1659-69. <http://dx.doi.org/10.2174/138945006779025419>
18. **Furlong RA, Ho L, Walsh C, Rubinsztein JS, Jain S, Paykel ES, et al.** Analysis and meta-analysis of two serotonin transporter gene polymorphisms in bipolar and unipolar affective disorders. *Am J Med Genet.* 1998;81:58-63. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19980207\)81:1<58::AID-AJMG11>3.0.CO;2-V](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19980207)81:1<58::AID-AJMG11>3.0.CO;2-V)
19. **Haenisch B, Herms S, Mattheisen M, Steffens M, Breuer R, Strohmaier J, et al.** Genome-wide association data provide further support for an association between 5-HTTLPR and major depressive disorder. *J Affect Disord.* 2013;146:438-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2012.08.001>
20. **Anguelova M, Benkelfat C, Turecki G.** A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: I. Affective disorders. *Mol Psychiatry.* 2003;8:574-91. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4001328>
21. **López-León S, Janssens AC, González-Zuloeta Ladd AM, Del-Favero J, Claes SJ, Oostra BA, et al.** Meta-analyses of genetic studies on major depressive disorder. *Mol Psychiatry.* 2008;13:772-85. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4002088>
22. **Anguelova M, Benkelfat C, Turecki G.** A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: II. Suicidal behavior. *Mol Psychiatry.* 2003;8:646-53. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4001336>
23. **Lasky-Su JA, Faraone SV, Glatt SJ, Tsuang MT.** Meta-analysis of the association between two polymorphisms in the serotonin transporter gene and affective disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2005;133B:110-5. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.b.30104>
24. **Hoehe MR, Wendel B, Grunewald I, Chiaroni P, Levy N, Morris-Rosendahl D, et al.** Serotonin transporter (5-HTT) gene polymorphisms are not associated with susceptibility to mood disorders. *Am J Med Genet.* 1998;81:1-3. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19980207\)81:1<1::AID-AJMG1>3.0.CO;2-2](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19980207)81:1<1::AID-AJMG1>3.0.CO;2-2)
25. **Minov C, Baghai TC, Schüle C, Zwanzger P, Schwarz MJ, Zill P, et al.** Serotonin-2A-receptor and -transporter polymorphisms: Lack of association in patients with major depression. *Neurosci Lett.* 2001;303:119-22. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01704-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01704-9)
26. **Mendlewicz J, Massat I, Souery D, Del-Favero J, Oruc L, Nöthen MM, et al.** Serotonin transporter 5HTTLPR polymorphism and affective disorders: No evidence of association in a large European multicenter study. *Eur J Hum Genet.* 2004;12:377-82. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201149>
27. **Serretti A, Lilli R, Lorenzi C, Lattuada E, Cusin C, Smeraldi E.** Serotonin transporter gene (5-HTTLPR) and major psychoses. *Mol Psychiatry.* 2002;7:95-9. <http://dx.doi.org/10.1038/sj/mp.4000936>
28. **Ospina-Duque J, Duque C, Carvajal-Carmona L, Ortíz-Barrientos D, Soto I, Pineda N, et al.** An association study of bipolar mood disorder (type I) with the 5-HTTLPR serotonin transporter polymorphism in a human population isolate from Colombia. *Neurosci Lett.* 2000;292:199-202. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01464-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01464-6)
29. **Rengifo L, Gaviria D, Salazar L, Vélez JP, Lozano S.** Polimorfismos en el gen del transportador de serotonina (SLC6A4) y el trastorno afectivo bipolar en dos centros regionales de salud mental del Eje Cafetero. *Revista Colombiana de Psiquiatría.* 2012;41:86-100.
30. **Escobar CG, Calderón JH, Moreno GA.** Allelic polymorphism in the serotonin transporter gene in major depression patients. *Colombia Médica.* 2011;42:48-53.
31. **Akhtar-Danesh N, Landeen J.** Relation between depression and sociodemographic factors. *Int J Ment Health Syst.* 2007;1:4. <http://dx.doi.org/10.1186/1752-4458-1-4>
32. **Ho LW, Furlong RA, Rubinsztein JS, Walsh C, Paykel ES, Rubinsztein DC.** Genetic associations with clinical characteristics in bipolar affective disorder and recurrent unipolar depressive disorder. *Am J Med Genet.* 2000;96:36-42. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(20000207\)96:1<36::AID-AJMG8>3.0.CO;2-6](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(20000207)96:1<36::AID-AJMG8>3.0.CO;2-6)
33. **Pfeiffer PN, Ganoczy D, Ilgen M, Zivin K, Valenstein M.** Comorbid anxiety as a suicide risk factor among depressed veterans. *Depress Anxiety.* 2009;26:752-7. <http://dx.doi.org/10.1002/da.20583>
34. **Hirschfeld RM.** The comorbidity of major depression and anxiety disorders: Recognition and management in primary care. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry.* 2001;3:244-54.
35. **Lau JY, Goldman D, Buzas B, Fromm SJ, Guyer AE, Hodgkinson C, et al.** Amygdala function and 5-HTT gene variants in adolescent anxiety and major depressive disorder. *Biol Psychiatry.* 2009;65:349-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.08.037>
36. **Ressler KJ, Nemeroff CB.** Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depress Anxiety.* 2000;12(Suppl.1):2-19. [http://dx.doi.org/10.1002/1520-6394\(2000\)12:1+<2::AID-DA2>3.0.CO;2-4](http://dx.doi.org/10.1002/1520-6394(2000)12:1+<2::AID-DA2>3.0.CO;2-4)
37. **Murphy SE, Norbury R, Godlewska BR, Cowen PJ, Mannie ZM, Harmer CJ, et al.** The effect of the serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR) on amygdala function: A meta-analysis. *Mol Psychiatry.* 2013;18:512-20. <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2012.19>

COMUNICACIÓN BREVE

Comparación y utilidad de las regiones mitocondriales de los genes *16S* y *COX1* para los análisis genéticos en garrapatas (Acari: Ixodidae)

Luis Enrique Paternina^{1,2}, Daniel Verbel-Vergara¹, Eduar Elías Bejarano¹

¹ Grupo de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia

² Grupo BIOGEM, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia

Introducción. En las últimas décadas, el análisis de los genes mitocondriales se ha utilizado en los estudios poblacionales y filogenéticos de garrapatas, lo cual ha permitido numerosos avances en la sistemática de estos ácaros. El gen mitocondrial de la subunidad 16S del ARN ribosómico (*16S*) es uno de los más usados, mientras que el gen mitocondrial de la citocromo oxidasa 1 (*COX1*) se ha empleado recientemente y se propone como un marcador genético alternativo frente al *16S*.

Objetivo. Evaluar la utilidad de los genes *16S* y *COX1* en los estudios genéticos de las garrapatas mediante el análisis de secuencias en tres especies de la región Caribe de Colombia.

Resultados. El análisis de secuencias mostró que los dos genes permitieron identificar las tres especies con mucha confiabilidad y con niveles de divergencia genética interespecífica relativamente similares (19 a 22 %), aunque solo el gen *COX1* permitió detectar la variabilidad genética intraespecífica (hasta de ~0,8 %). El análisis de saturación de sustituciones indicó que el gen *16S* no se saturó con transiciones, mientras que el *COX1* mostró saturación a partir de distancias de ~17 %.

Conclusión. Los resultados indicaron que el gen *16S* parece tener mejores características para los análisis filogenéticos interespecíficos dada su alta divergencia genética y baja saturación de transiciones, mientras que el gen *COX1* parece ser más útil para estudios de variabilidad genética intraespecífica. Sin embargo, dado que el estudio se hizo a escala local, se requieren más investigaciones en diferentes escalas biogeográficas para establecer su utilidad en circunstancias más amplias y complejas.

Palabras clave: garrapatas, genética, ADN mitocondrial, filogenia, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.3116>

Comparison of *16S* and *COX1* genes mitochondrial regions and their usefulness for genetic analysis of ticks (Acari: Ixodidae)

Introduction: In recent decades the analysis of mitochondrial genes has been used for population and phylogenetic studies of ticks allowing many advances in their systematics. Mitochondrial ribosomal *16S* (*16S*) subunit is one of the most frequently used among those genes available for tick analysis, whereas cytochrome oxidase gene 1 (*COX1*) has recently been used and proposed as an alternative to the traditional *16S* gene marker.

Objective: To evaluate the usefulness of *16S* and *COX1* in genetic studies of ticks by analyzing sequences of three species commonly found in the Caribbean region of Colombia.

Results: The analysis of both genes sequences allowed us to identify the three species with high levels of confidence and interspecific genetic divergence (19-22%), although only *COX1* allowed us to detect intraspecific genetic variability (up to ~0.8%). A substitution saturation analysis indicated that the *16S* gene was not saturated with transitions while the *COX1* gene showed saturation distances starting at ~17%.

Conclusion: Our results indicated that the *16S* gene seems to have better features for interspecific phylogenetic analyses because of its high level of genetic divergence and low saturation pattern, while the *COX1* gene appears to be more useful for intraspecific genetic variability studies. However, as our study was conducted at a local scale, future studies at different biogeographical scales would help to establish its usefulness in wider and more complex scenarios.

Key words: ticks, genetics, DNA, mitochondrial, phylogeny, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.3116>

Contribución de los autores:

Luis Enrique Paternina: diseño del estudio, recolección de muestras y desarrollo de los análisis genéticos

Daniel Verbel-Vergara: recolección de muestras y ensayos moleculares

Eduar Elías Bejarano: diseño del estudio, coordinación del trabajo de laboratorio y análisis genéticos

Todos los autores participaron en la redacción del manuscrito.

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados de un gran número de vertebrados que tienen gran importancia veterinaria y médica por su papel en la transmisión de numerosas enfermedades (1). Entre las garrapatas más conocidas se encuentran las de la especie *Rhipicephalus microplus*, las cuales ocasionan enormes pérdidas económicas por los daños directos e indirectos que ocasiona en el ganado bovino (2). También están las garrapatas del complejo *R. sanguineus*, vectores de la erliquiosis y la trombocitopenia cíclica infecciosa en caninos (3,4), que también pueden transmitir enfermedades a los humanos, como la fiebre botonosa mediterránea (2) y la fiebre manchada de las Montañas Rocosas (5).

Clásicamente, la taxonomía y la sistemática de las garrapatas se han definido mediante estudios morfológicos; sin embargo, en las últimas décadas las herramientas moleculares han tenido un gran impacto en la sistemática de este importante grupo de artrópodos. Entre los ejemplos más notables de ajustes taxonómicos en los que los análisis genéticos han sido definitivos en la descripción de nuevas especies y en la identificación de complejos en las familias Ixodidae y Argasidae, están el complejo *Rhipicephalus sanguineus* (6-8), el grupo *Ornithodoros talaje* (9) y el complejo *Amblyomma cajennense* (10,11). Debido a las peculiaridades biológicas y ecológicas que presentan las diferentes especies y grupos de especies de garrapatas, los estudios genéticos se han convertido en una herramienta importante para explorar las relaciones poblacionales (8,12-14), delimitar las especies (15-17), hacer los análisis filogenéticos (18-20), e, incluso, identificar potenciales zonas de riesgo de transmisión de enfermedades (3,7,8).

Ante este auge de las metodologías moleculares para el estudio de diversos aspectos de la ecología y la taxonomía de las garrapatas (7), es necesario conocer los beneficios y limitaciones de los marcadores moleculares utilizados para tales fines. Entre dichos marcadores se encuentran las secuencias mitocondriales de la subunidad 16S del ARN ribosómico (16S), la subunidad 12S del ARN ribosomal (12S), la región D-loop, el gen de la citocromo oxidasa I (*COX1*), el gen de la

citocromo oxidasa II (*COX2*), la subunidad 5 de la deshidrogenasa de NADH (NAD5) y regiones nucleares como el espaciador interno transcrito 2 (ITS2), el gen 18S ribosómico, el gen de la subunidad grande ribosómica (*LSU*), el gen de la ARN polimerasa II (*RNAPol II*) y el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*G3PDH*) (10,14-18,20,21-26).

Entre las secuencias mencionadas, el gen 16S es uno de los más utilizados en los estudios de taxonomía y variabilidad genética de este grupo de artrópodos y, recientemente, algunos autores han empleado el gen mitocondrial *COX1* de la iniciativa de código de barras de ADN (*Barcode of Life*, www.barcodeoflife.org) (27), con la cual se aspira a identificar y reconocer la diversidad de especies a nivel global con base en la variabilidad genética que exhiben regiones del gen *COX1* en diversos grupos de artrópodos (16,26,28).

Dadas las múltiples opciones que existen para el trabajo en taxonomía o filogenética de las garrapatas y el creciente uso de las herramientas moleculares en la investigación sobre las enfermedades transmitidas por estas en Colombia, el objetivo del presente estudio fue evaluar la utilidad de los genes mitocondriales 16S y *COX1* en los estudios genéticos de las garrapatas duras a escalas geográficas locales.

Materiales y métodos

Áreas de estudio y garrapatas

Las garrapatas se recolectaron mediante la búsqueda en animales domésticos provenientes de cinco municipalidades pertenecientes a cuatro subregiones ecológicas del departamento de Sucre: Sincelejo (SinSP, subregión Montes de María), Sampués (SamCM, subregión Sabanas), Corozal (CorL, subregión Sabanas), Tolviejo (TolC, subregión golfo del Morrosquillo) y San Marcos (SanM, subregión San Jorge).

A pesar de su cercanía geográfica, con distancias lineales entre 9 y 92 km, estas localidades presentan diferencias considerables en cuanto al tipo y la densidad de la vegetación, la topografía, la hidrografía y las actividades económicas que eventualmente podrían influir en la variabilidad genética de las garrapatas (la información adicional sobre las subregiones puede consultarse en www.sucre.gov.co). Para el estudio se seleccionaron individuos sin alimentar del complejo *R. sanguineus*, *R. microplus* y *Dermacentor nitens*.

Correspondencia:

Luis E. Paternina, Carrera 14 N° 16B-32, barrio La Pajuela, Sincelejo, Colombia
Teléfono: (575) 282 0830
luispaterninat@gmail.com

Recibido: 12/11/15; aceptado: 22/02/16

Extracción de ácidos nucleicos y amplificación del ADN

Las garrapatas se trituraron en nitrógeno líquido y la extracción de los ácidos nucleicos se hizo utilizando el estuche Qiamp DNA Mini Kit™ (Qiagen, Hilden, Germany), según las instrucciones del fabricante. Los extractos de ADN de cada muestra se amplificaron utilizando los genes mitocondriales *16S*, el cual genera un fragmento de ~360 pb, y *COX1*, que genera un fragmento de ~710 pb, (18,28). La amplificación de los dos genes se hizo con la siguiente mezcla de reacción: 1,5 mM de MgCl₂, 3 μl del extracto de ADN, 15 pmol de cada cebador y 1 U de Taq Platinum de Invitrogen (Life Technologies). Los amplicones resultantes se secuenciaron mediante electroforesis capilar en un secuenciador ABI 3730XLs (Applied Biosystems).

Comparación de marcadores genéticos

Solo los individuos en los que fue posible la amplificación de ambos genes mitocondriales, *16S* (~360 pb) y *COX1* (~710 pb), se sometieron a la secuenciación directa del ADN; según la disponibilidad de estas muestras, se incluyó al menos un individuo de cada localidad para cada taxón analizado.

Los electroforegramas obtenidos para los genes *16S* y *COX1* se editaron manualmente con el programa Chromas Lite; se obtuvieron las secuencias de consenso por muestra y se alinearon utilizando el algoritmo de Clustal W, con lo cual se generó un alineamiento múltiple de 328 sitios para las secuencias del gen *16S* y de 690 sitios para las del gen *COX1*. Una vez obtenido el alineamiento, se procedió a estimar el mejor modelo de sustitución de nucleótidos mediante el JModelTest y con el criterio de información Akaike corregido (AICc) (29). Los árboles filogenéticos se analizaron con el algoritmo de máxima verosimilitud de 1.000 repeticiones con el método de *bootstrap* y el mejor modelo de sustitución de nucleótidos calculado previamente con el programa MEGA 5.2 (30). Además, se valoró el grado de saturación de las sustituciones de los marcadores genéticos mediante un gráfico de saturación con transiciones (s) y transversiones (v), así como la distribución de los sitios variables y el grado de variabilidad genética por sitio a lo largo de las matrices de secuencias de ambos genes mediante un análisis de entropía en el programa DAMBE 5 (31).

También, se calcularon las distancias intraespecíficas e interespecíficas para establecer una comparación entre los genes en el análisis hecho

con la herramienta MEGA 5.2, y se calcularon los estimadores de diversidad haplotípica (Hd), el número medio de diferencias pareadas entre nucleótidos (k) y la diversidad de los nucleótidos (π) obtenidos con el programa DnaSP, versión 5 (32).

Resultados

Se seleccionaron 15 de las 50 garrapatas analizadas para la secuenciación con ambos genes: seis del complejo *R. sanguineus*, cinco de *R. microplus* y cuatro de *D. nitens*. Los haplotipos del gen *16S* se encuentran depositados en GenBank bajo los códigos KT906174-KT906176 y los haplotipos encontrados del gen *COX1* bajo los códigos KT906177-KT906190.

En los árboles filogenéticos se observó que, como era de esperarse, ambos marcadores genéticos eran capaces de diferenciar con gran confiabilidad las tres especies de garrapatas (figura 1), aunque las distancias interespecíficas medias según el modelo de Tamura-Nei con el *COX1* siempre fueron mayores a las del gen mitocondrial *16S* (cuadro 1).

El alineamiento de secuencias evidenció que el gen *16S* presentaba 70 sitios variables, todos ellos parsimoniosamente informativos y con divergencias interespecíficas de entre 14,49 y 19,59 %, mientras que el alineamiento de la secuencia del gen *COX1* presentaba 171 sitios variables, de los cuales 169 eran parsimoniosamente informativos y con divergencias interespecíficas de entre 16,98 y 22,02 % (cuadro 1). A partir de la estimación de la entropía por sitio fue posible notar que los sitios variables del gen *COX1* se distribuían a lo largo de la matriz de secuencias, mientras que los sitios variables del gen *16S* eran menos frecuentes y se distribuían principalmente hacia la región central y el extremo 3' del fragmento analizado (figura 2).

Las distancias promedio totales fueron mayores cuando se utilizó el marcador *COX1* (13,91 %) en comparación con el marcador *16S* (11,89 %). Por otro lado, el rango de distancia interespecífica, calculado como la diferencia porcentual entre la distancia máxima (dMax) y la distancia mínima (dMin) de todas las secuencias de cada marcador mitocondrial, indicó que el gen *16S* proveía un mayor rango de distancias, con 5,1 %, mientras que el *COX1* fue similar aunque inferior, con 5,04 %. Con respecto al análisis de saturación (figura 3), a diferencia del gen *COX1*, el cual presentó saturación con transversiones a partir de distancias Tamura-Nei de ~17 %, el marcador *16S* no se

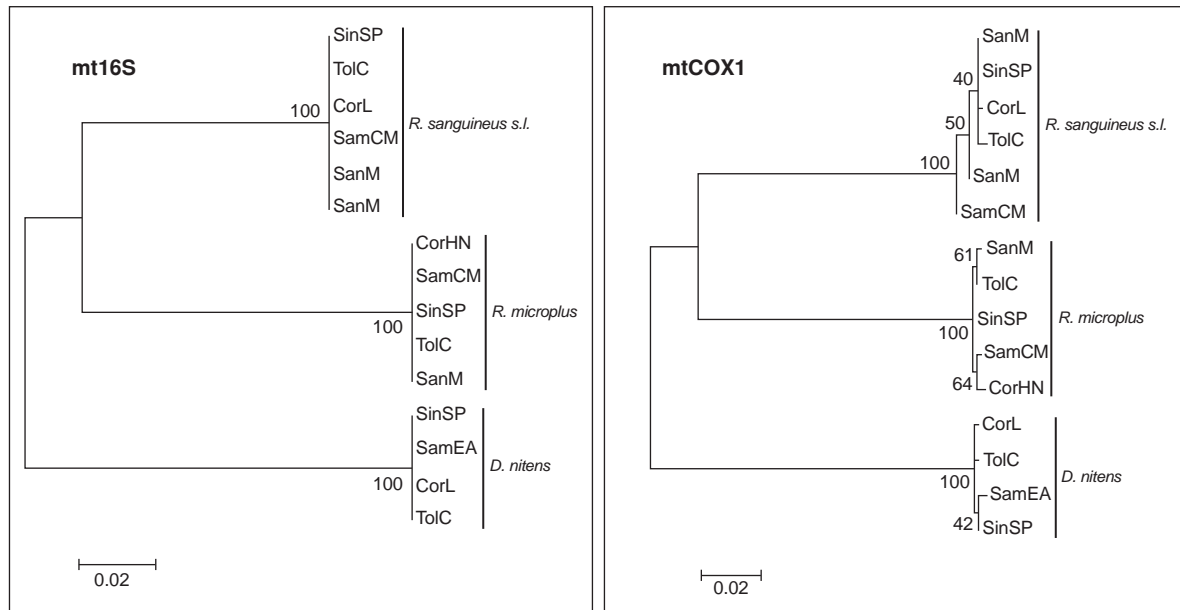


Figura 1. Árboles filogenéticos inferidos con el método de máxima verosimilitud con 1.000 réplicas en *bootstrap*. Los dos árboles se construyeron con el modelo de sustitución de nucleótidos de Tamura-Nei (TN93).

Cuadro 1. Variabilidad genética de las secuencias mitocondriales analizadas. La divergencia media (dMedia) corresponde a las de todas las secuencias analizadas.

	Gen	dMedia (%)	dMin (%)	dMax (%)	Sc	Sv	SPi	Hd	k	π
Interespecífica	16S	11,89	14,49	19,59	258	70	70	-	-	-
	COX1	13,91	16,98	22,02	519	171	169	-	-	-
	Especie	dMedia (%)	dMin (%)	dMax (%)	H	Sv	SPi	-	-	-
Intraespecífica (COX1)	<i>Rhipicephalus microplus</i>	0,41	0,15	0,73	5	6	2	1,0	2,80	0,0040
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	0,43	0,00	0,88	5	7	3	0,93	2,93	0,0042
	<i>Dermacentor nitens</i>	0,34	0,29	0,58	4	4	2	1,0	2,33	0,0033

dMin: calculada como la divergencia mínima de todas las secuencias; dMax: calculada como la divergencia máxima de todas las secuencias; Sc: sitios constantes; Sv: sitios variables; SPi: sitios parsimoniosamente informativos; Hd: diversidad haplotípica; k: número de diferencias medias pareadas de nucleótidos; π: diversidad de nucleótidos

saturó con sustituciones. Sin embargo, la remoción de la tercera posición del codón en el análisis de saturación del gen COX1 permitió superar este inconveniente, aunque la variabilidad máxima observada con las dos primeras posiciones del codón fue de hasta 6,24 % (no se presentan los datos).

En cuanto a la variabilidad intraespecífica, el gen 16S produjo un solo haplotipo de cada especie analizada, y se estimó una distancia genética de cero a nivel intraespecífico, lo cual contrasta claramente con los 14 haplotipos detectados en las 15 muestras analizadas con el gen COX1, el cual presentó distancias intraspecificas de entre 0,34 y 0,43 % (cuadro 1). La variabilidad intraespecífica (dMax-dMin) detectada con el marcador genético COX1, se relacionó con el número de muestras o

con la especie de garrapata analizada; en cuatro individuos de *D. nitens* la variabilidad fue de 0,29%; en cinco individuos de *R. microplus* la variabilidad fue de 0,58 % y para seis individuos de *R. sanguineus* la variabilidad genética fue de 0,88 %. En cuanto a los parámetros de diversidad genética k y π, quedó claro que el grado de diversidad genética detectable también guardó una estrecha relación con el tamaño de la muestra.

Discusión

Dada su gran importancia económica, los estudios sobre garrapatas en Colombia se han enfocado básicamente en su impacto en el sector productivo y en la identificación de las especies involucradas en los brotes de enfermedades transmitidas por

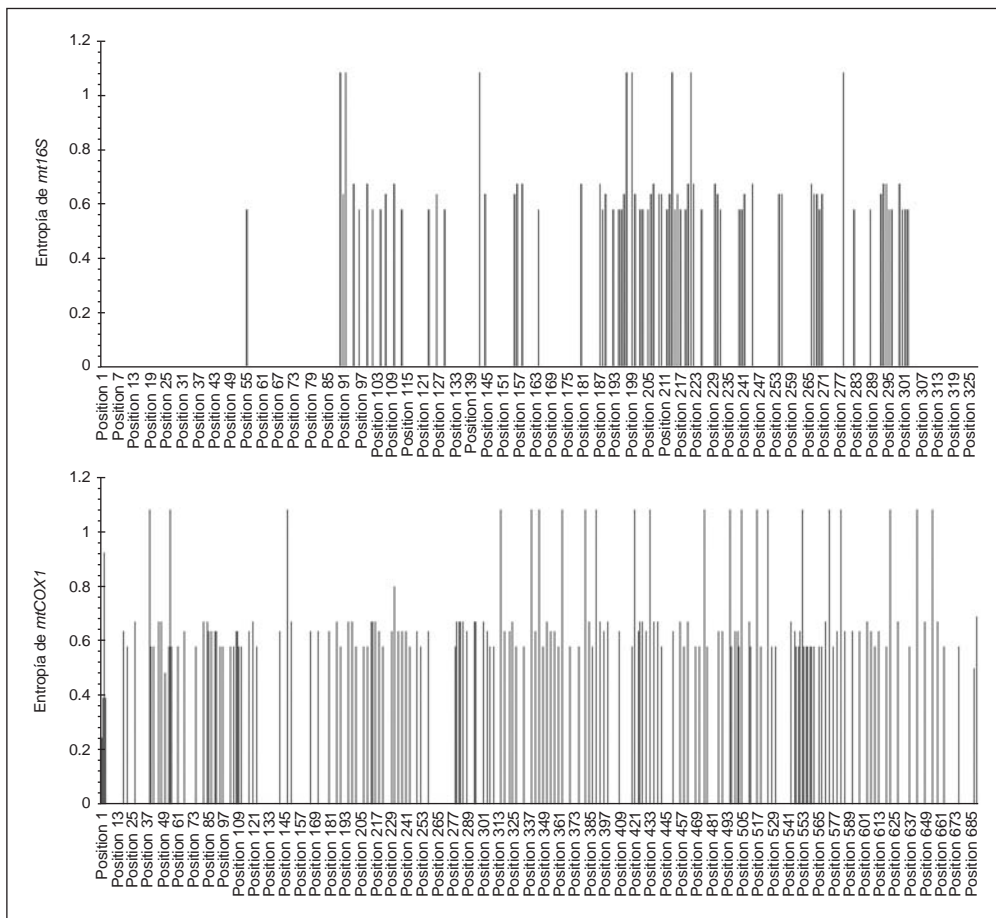


Figura 2. Variabilidad genética de los genes mitocondriales 16S y COX1 de acuerdo con el grado de entropía (incertidumbre) para cada sitio de los alineamientos

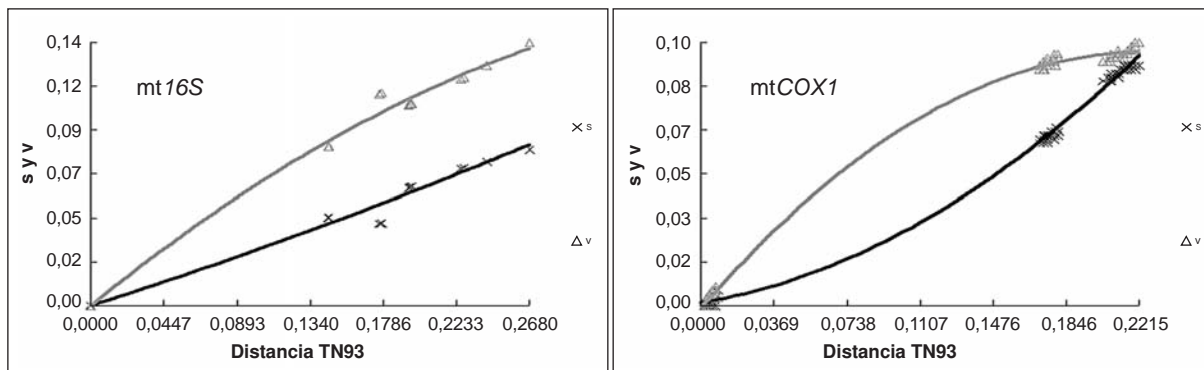


Figura 3. Análisis de saturación con transiciones y transversiones para los genes 16S y COX1. La progresión de saturación se contrastó con las distancias genéticas establecidas con el modelo de Tamura-Nei (TN93); s: transiciones; v: transversiones

ellas (33,34). En los últimos años se ha reconocido la existencia de múltiples complejos de especies en Latinoamérica y el papel que pueden tener algunos de ellos en la dinámica epidemiológica de enfermedades de interés médico y veterinario

en la región (3,4,7,8,10,11). Ante este panorama, los análisis genéticos de las garrapatas pueden proveer información relevante para el estudio y la vigilancia de las enfermedades transmitidas por garrapatas en nuestro país.

En la presente evaluación de los marcadores genéticos mitocondriales *16S* y *COX1*, el gen *16S* fue especialmente útil para la separación de especies debido a su baja variabilidad genética intraespecífica, lo cual facilita la asignación de especies y da un rango de distancia interespecífica ligeramente mayor, por lo que se sugiere que este marcador sea utilizado en los estudios sobre relaciones interespecíficas. Por otro lado, aunque el marcador *COX1* también permite diferenciar con gran confiabilidad las tres especies de garrapatas analizadas, fue evidente que es más útil para detectar una variabilidad genética intraespecífica de hasta 0,88 % en muestras que no presentaron variabilidad genética con el gen *16S*.

Por otro lado, el análisis de retención de la información filogenética mostró que el marcador *16S* no se saturaba con sustituciones a la escala taxonómica analizada en el presente trabajo, lo que respalda los hallazgos de otros autores que resaltan la utilidad de esta secuencia mitocondrial para filogenias en la escala analizada y para estudios de taxonomía molecular (18,21,35,36). Por el contrario, el análisis con el gen *COX1* mostró que este marcador se saturó a partir de distancias calculadas con el método de Tamura-Nei de ~17 %, lo que limita su utilidad filogenética aparente a los estudios intraespecíficos o a los análisis genéticos de complejos de especies relativamente incipientes, tal como lo han señalado otros autores en otros grupos de ácaros (36,37). Para reducir la saturación del gen *COX1* con el fin de utilizarlo en análisis filogenéticos interespecíficos, se recomienda la remoción de la tercera posición del codón (como se hizo en este caso). Sin embargo, esto reduce notoriamente la variabilidad genética del fragmento analizado y, a pesar de estos ajustes, es posible que sigan presentándose homoplasias que reduzcan la confiabilidad de los resultados, tal como ha sucedido en trabajos previos en ácaros de la familia Tetranychidae (37).

En conclusión, los dos marcadores genéticos evaluados presentan características diferentes que permitieron obtener una visión complementaria de las relaciones genéticas entre taxones de garrapatas y dentro de ellos. Por esta razón, se recomienda tener en cuenta las características propias de cada gen en futuros estudios genéticos.

Por último, dado que el presente trabajo se hizo con muestras obtenidas a partir de poblaciones cercanas de las tres especies de garrapatas, los estudios futuros en los que se comparen estos

dos marcadores genéticos a escalas geográficas mayores permitirán establecer la variabilidad y la utilidad de ambas secuencias en escenarios más amplios y complejos.

Agradecimientos

Al programa de Jóvenes Investigadores e Innovadores del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia (Colciencias), por el apoyo a Daniel Verbel-Vergara, y al programa de Becas Doctorales Nacionales de la misma entidad (Convocatoria 528/2011), por el apoyo a Luis Enrique Paternina. Agradecemos igualmente a Francisco Javier Díaz del Grupo de Inmunovirología de la Universidad de Antioquia, por sus recomendaciones en el análisis de la saturación de sustituciones, así como a los evaluadores anónimos del manuscrito, cuyos comentarios y críticas constructivas permitieron mejorarlo significativamente.

Conflicto de intereses

No existe conflicto de intereses para declarar.

Financiación

Colciencias, proyecto 112951929253 (Convocatoria 519/2010), y Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, proyecto 20810 (código QUIPU 201010013308).

Referencias

1. **Baneth G.** Tick-borne infections of animals and humans: A common ground. *Int J Parasitol.* 2014;44:591-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.03.011>
2. **Jongejan F, Uilenberg G.** The global importance of ticks. *Parasitology.* 2004;123:S3-14.
3. **Moraes-Filho J, Krawczak F, Costa FB, Soares JF, Labruna MB.** Comparative evaluation of the vector competence of four South American populations of the *Rhipicephalus sanguineus* group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine monocytic ehrlichiosis. *PLoS One.* 2015;10:e0139386. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0139386>
4. **Cicuttin G, Tarragona EL, De Salvo MN, Mangold A, Nava S.** Infection with *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in two lineages of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) from Argentina. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015;6:724-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.06.006>
5. **Demma L, Traeger M, Nicholson W, Paddock C, Blau D, Eremeeva M, et al.** Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. *N Eng J Med.* 2005;353:587-94. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa050043>
6. **Szabó MPJ, Mangold AJ, João CF, Bechara GH, Guglielme AA.** Biological and DNA evidence of two

- dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. *Vet Parasitol.* 2005;130:131-40.
7. **Moraes-Filho J, Marcili A, Nieri-Bastos FA, Richtzenhain LJ, Labruna MB.** Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Trop.* 2011;117:51-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.09.006>
 8. **Nava S, Mastropaolo M, Venzal JM, Mangold AJ, Guglielmo AA.** Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. *Vet Parasitol.* 2012;190:547-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.06.032>
 9. **Venzal JM, Estrada-Peña A, Mangold AJ, González-Acuña D, Guglielmo AA.** The *Ornithodoros (Alectorobius) talaje* species group (Acari: Ixodida: Argasidae): Description of *Ornithodoros (Alectorobius) rioplatensis* n. sp. from southern South America. *J Med Entomol.* 2008;45:832-40. <http://dx.doi.org/10.1093/jmedent/45.5.832>
 10. **Beati L, Nava S, Burkman EJ, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Guglielmo AA, et al.** *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: Phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evol Biol.* 2013;13:267. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-13-267>
 11. **Nava S, Beati L, Labruna MB, Cáceres AG, Mangold AJ, Guglielmo AA.** Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptum*. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5:252-76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.11.004>
 12. **Trout RT, Steelman CD, Szalanski AL.** Population genetics of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) collected from Arkansas. *J Med Entomol.* 2010;47:152-61. <http://dx.doi.org/10.1093/jmedent/47.2.152>
 13. **Beati L, Patel J, Lucas-Williams H, Adakal H, Kanduma EG, Tembo-Mwase E, et al.** Phylogeography and demographic history of *Amblyomma variegatum* (Fabricius) (Acari: Ixodidae), the tropical bont tick. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012;12:514-25. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2011.0859>
 14. **Radulović Ž, Milutinović M, Tomanović S, Mulenga A.** Exon variability of gene encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Ixodes ricinus* ticks. *Parasite.* 2010;17:363-8.
 15. **Marrelli MT, Souza LF, Marques RC, Labruna MB, Matioli SR, Tonon AP, et al.** Taxonomic and phylogenetic relationships between neotropical species of ticks from genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) inferred from second internal transcribed spacer sequences of rDNA. *J Med Entomol.* 2007;44:222-8. <http://dx.doi.org/10.1093/jmedent/44.2.222>
 16. **Latrofa MS, Dantas-Torres F, Annoscia G, Cantacessi C, Otranto D.** Comparative analyses of mitochondrial and nuclear genetic markers for the molecular identification of *Rhipicephalus* spp. *Infect Genet Evol.* 2013;20:422-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.09.027>
 17. **Lv J, Wu S, Zhang Y, Chen Y, Feng C, Yuan X, et al.** Assessment of four DNA fragments (COI, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). *Parasit Vectors.* 2014;7:93. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-93>
 18. **Black WC, Piesman J.** Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:10034-8.
 19. **Crampton A, McKay I, Barker SC.** Phylogeny of ticks (Ixodida) inferred from nuclear ribosomal DNA. *Int J Parasitol.* 1996;26:511-7.
 20. **Mangold AJ, Barges MD, Mas-Coma S.** Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res.* 1998;84:478-84.
 21. **Nava S, Guglielmo AA, Mangold AJ.** An overview of systematics and evolution of ticks. *Front Biosci.* 2009;14:2857-77. <http://dx.doi.org/10.2741/3418>
 22. **Leo SST, Pybus MJ, Sperling FA.** Deep mitochondrial DNA lineage divergences within Alberta populations of *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae) do not indicate distinct species. *J Med Entomol.* 2010;47:565-74. <http://dx.doi.org/10.1093/jmedent/47.4.565>
 23. **Anstead CA, Krakowetz CN, Mann AS, Sim KA, Chilton NB.** An assessment of genetic differences among ixodid ticks in a locus within the nuclear large subunit ribosomal RNA gene. *Mol Cell Probes.* 2011;25:243-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2011.06.002>
 24. **Beati L, Keirans JE.** Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *J Parasitol.* 2001;87:32-48. [http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0032:AOTSRA\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0032:AOTSRA]2.0.CO;2)
 25. **Fang Q, Keirans J, Mixson T.** The use of the nuclear protein-encoding gene, RNA polymerase II, for tick molecular systematics. *Exp Appl Acarol.* 2002;28:69-75.
 26. **Chitimia L, Lin R-Q, Cosoroaba I, Wu X-Y, Song H-Q, Yuan Z-G, et al.** Genetic characterization of ticks from southwestern Romania by sequences of mitochondrial COX1 and nad5 genes. *Exp Appl Acarol.* 2010;52:305-11. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-010-9365-9>
 27. **Ratnasingham S, Hebert PD.** Bold: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Mol Ecol Notes.* 2007;7:355-64. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
 28. **Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR.** Biological identification through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B.* 2003;270:313-21. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
 29. **Posada D.** jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol.* 2008;25:1253-6. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msn083>
 30. **Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S.** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28:2731-9. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>

31. **Xia X.** DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Mol Biol Evol.* 2013;30:1720-8. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst064>
32. **Librado P, Rozas J.** DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 2009; 25:1451-2. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
33. **Hidalgo M, Orejuela L, Fuya P, Carrillo P, Hernández J, Parra E, et al.** Rocky mountain spotted fever, Colombia. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1058-60. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1307.060537>
34. **Cortés-Vecino JA, Betancourt JA, Argüelles J, Pulido LA.** Distribución de garrapatas *Rhipicephalus microplus* en bovinos y fincas del altiplano cundiboyacense. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecu.* 2010;11:73-84.
35. **Crosbie PR, Boyce WM, Rodwell TC.** DNA sequence variation in *Dermacentor hunteri* and estimated phylogenies of *Dermacentor* spp. (Acari: Ixodidae) in the New World. *J Med Entomol.* 1998;35:277-88. <http://dx.doi.org/10.1093/jmedent/35.3.277>
36. **Cruickshank RH.** Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Sys Applied Acarol.* 2002;7:3-14.
37. **Navajas M, Gutiérrez J, Lagnel J, Boursot P.** Mitochondrial cytochrome oxidase I in Tetranychid mites: A comparison between molecular phylogeny and changes of morphological and life history traits. *Bull Entomol Res.* 1996;86:407-17.

COMUNICACIÓN BREVE

Presencia de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) y su infección natural con el virus del dengue en alturas no registradas para Colombia

Freddy Ruiz-López¹, Ana González-Mazo¹, Andrés Vélez-Mira¹, Giovan F. Gómez¹,
Luisa Zuleta^{1,2}, Sandra Uribe^{1,2}, Iván Darío Vélez-Bernal¹

¹ Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, PECET, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Grupo de Investigación en Sistemática Molecular, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia

Introducción. *Aedes aegypti* es el principal vector de fiebre amarilla urbana, dengue, chikungunya y zika. Se ha demostrado que la distribución biogeográfica de esta especie se ha expandido debido al calentamiento global y a factores socioeconómicos y culturales. Los cambios en los patrones de la distribución altitudinal de este vector y su infección con el virus son prioridades de la investigación encaminada a desarrollar estrategias de vigilancia entomológica y virológica en salud pública.

Objetivo. Evaluar la presencia de *A. aegypti* y su infección natural por el virus del dengue en alturas superiores a los 1.800 msnm en dos municipios periféricos del Valle de Aburrá, Antioquia, Colombia.

Materiales y métodos. Se instalaron 21 ovitrampas en los municipios de Bello y San Pedro de los Milagros, en un rango altitudinal de 1.882 a 2.659 msnm. Los adultos que emergieron de las ovitrampas se evaluaron con reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para la detección del virus del dengue.

Resultados. Se recolectaron 367 adultos de *A. aegypti*, siete de los cuales se encontraron a una altitud de 2.302 msnm en Tierradentro, Bello. Se detectaron 12 especímenes de *A. aegypti* positivos para dengue serotipo 2 en el barrio París de Bello, a 1.984 msnm.

Conclusión. Por primera vez se registró *A. aegypti* a 2.302 msnm, la mayor altitud registrada para este vector en Colombia. De igual forma, se encontró infección con el virus del dengue a 1.984 msnm. Estos hallazgos son significativos, ya que determinan regiones de Colombia con riesgo potencial de transmisión autóctona de dengue y otros arbovirus por *A. aegypti*.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, altitud, ubicaciones geográficas, dengue, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.3301>

Presence of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) and its natural infection with dengue virus at unrecorded heights in Colombia

Introduction: *Aedes aegypti* is the main vector of urban yellow fever, dengue, chikungunya and Zika viruses. The biogeographical distribution of this species has expanded due to global warming, and socioeconomic and cultural factors. The changes in the altitudinal distribution patterns of this vector and its natural infection are priority fields of research to develop entomological, virological and public health surveillance strategies.

Objective: To evaluate the presence of *A. aegypti* and its natural infection with dengue virus in altitudes above 1.800 meters above sea level in two peripheral municipalities of the Valle de Aburrá, Antioquia, Colombia.

Materials and methods: Twenty-one ovitraps were set in the municipalities of Bello and San Pedro de los Milagros, at altitudes ranging from 1.882 to 2.659 masl. Emerged adults caught in the ovitraps were tested by RT-PCR for dengue virus detection.

Results: We collected 367 *A. aegypti* adults, seven of which were found as high as 2.302 masl in Tierradentro, Bello. We detected serotype 2 dengue infection in 12 *A. aegypti* specimens collected in the neighbourhood of París, in Bello, at 1.984 masl.

Contribución de los autores:

Freddy Ruiz-López: identificación del material entomológico

Ana González-Mazo, Andrés Vélez-Mira, Luisa Zuleta, Freddy Ruiz-López: salida de campo y revisión de las ovitrampas

Luisa Zuleta: procesamiento del material entomológico

Giovan F. Gómez y Sandra Uribe: recolección, determinación taxonómica y determinación de infección por el virus del dengue

Iván Darío Vélez: diseño de la investigación, financiación y elaboración del manuscrito

Todos los autores participaron en el diseño de la investigación y en la escritura del manuscrito.

Conclusion: We recorded *A. aegypti* at 2.302 masl, so far the highest altitudinal record in Colombia for this vector. Furthermore, mosquitoes collected at 1.984 masl were positive for dengue virus. These findings are significant as they identify regions in Colombia at risk of potential autochthonous transmission of dengue and other arboviruses by *A. aegypti*.

Key words: *Aedes aegypti*, altitude, geographic locations, dengue, Colombia.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.3301>

Aedes (Stegomyia) aegypti es conocido como el principal vector de fiebre amarilla urbana (1), dengue (2), chikungunya (3) y zika (4). Es originario de África y se cree que la forma ancestral era un mosquito zoofílico que se criaba en los huecos de los árboles (5,6). Poblaciones ancestrales, como la subespecie *A. aegypti formosus*, todavía se encuentran en África (7). Según Petersen (8) y Tabachnich (6), las poblaciones que habitaban en el bosque se concentraron en el norte de África durante un largo periodo de sequía ocurrido en el Sahara hace 4.000 millones de años aproximadamente. Es probable que estas condiciones extremas favorecieran su adaptación a las condiciones domésticas y dieran lugar a su reproducción en criaderos artificiales, en particular, en recipientes para el almacenamiento de agua (6,8). Con el inicio del comercio mundial hace cientos de años, esta especie se desplazó a través de las zonas tropicales y subtropicales hasta llegar al Nuevo Mundo en los barcos del comercio de esclavos entre los siglos XV y XVIII (6). Después de su establecimiento en las zonas costeras de las regiones tropicales y templadas de las Américas, se dispersó hacia el interior del continente (9).

Debido al calentamiento global y a múltiples factores socioeconómicos regionales y locales, los patrones de distribución de *A. aegypti* han cambiado, con nuevos registros altitudinales y una extensa distribución en todos los continentes, incluidos Norteamérica, Europa y Asia (10,11). En la ciudad de Puebla (México), esta especie pasó de 1.630 msnm en 1987 (12) a 2.133 msnm en el 2011 (13). En Venezuela se encuentra por debajo de los 2.000 msnm (14). En Colombia, se pensaba que la especie no habitaba por encima de los 1.585 msnm antes del trabajo de Suárez y Nelson en 1981 (15); sin embargo, estos autores lo registraron en 22 municipios por encima de los 1.600 msnm y a 2.200

msnm en Málaga (Santander), siendo este último el registro altitudinal más alto para Suramérica hasta ahora. Según el Grupo de Entomología de la Dirección de Redes en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud de Colombia, *A. aegypti* se encuentra en 718 municipios distribuidos en todos los departamentos del territorio nacional a altitudes que no sobrepasan los 2.200 msnm.

El conocimiento sobre los cambios en los patrones de distribución de *A. aegypti* y la comprensión de la forma en que sobrevive en límites superiores de altura, constituye una prioridad a nivel mundial y un reto para entender la biología y la dinámica de este vector en esas condiciones ambientales.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la presencia de *A. aegypti* en límites de distribución altitudinal no reportados para Colombia, en particular por encima de los 1.800 msnm, en un transecto altitudinal entre los municipios de Bello y San Pedro de los Milagros, Antioquia, así como determinar el estatus de la infección natural por el virus del dengue.

Materiales y métodos

Debido a la situación actual en torno a los arbovirus (dengue, chikungunya y zika) en Colombia, y con base en los estudios adelantados por el Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, PECET de la Universidad de Antioquia sobre el virus del dengue en el municipio de Bello, se utilizó una metodología rápida de muestreo para evaluar la presencia de *A. aegypti* en alturas superiores a los 1.800 msnm en la periferia del Valle de Aburra.

Asimismo, se evaluó la infección por el virus del dengue en la mayoría de los mosquitos recolectados. Se colocaron 21 ovitrampas dentro y en los alrededores de las viviendas (corredores exteriores) en un rango altitudinal entre los 1.882 y los 2.659 msnm (cuadro 1). Las ovitrampas se revisaron a los ocho días y los huevos recolectados se transportaron al insectario del PECET, donde posteriormente fueron inundados y criados hasta alcanzar el estado adulto bajo condiciones controladas de humedad (70 %) y temperatura (26 °C).

Correspondencia:

John Freddy Ruiz-López, PECET, Universidad de Antioquia, Calle 62 N° 52-59, laboratorio 632, Medellín, Colombia
Teléfono: (574) 219 6502, fax: (574) 219 6511
fredyruiz9@gmail.com

Recibido: 01/04/16; aceptado: 26/04/16

Cuadro 1. Ubicación de las ovitrampas

Ovitrapa	Municipio	Localidad	Altura (msnm)	Coordenada
T1	Bello	Jalisco	2.237	N 6.31422° W 75.59703°
T2	Bello	San Félix	2.390	N 6.33059° W 75.59734°
T3	Bello	San Félix	2.512	N 6.34089° W 75.60789°
T4	Bello	La Unión	2.584	N 6.43070° W 75.59208°
T5	Bello	El Tambo	2.556	N 6.43069° W 75.59208°
T6	San Pedro de los Milagros	Casco urbano	2.489	N 6.45888° W 75.55675°
T7	San Pedro de los Milagros	Cerezales	2.659	N 6.41673° W 75.56425°
T8	San Pedro de los Milagros	Cerezales	2.592	N 6.41784° W 75.55998°
T9	Bello	Tierradentro*	2.302	N 6.37931° W 75.59347°
T10	Bello	Altos de Niquía	2.252	N 6.37934° W 75.59348°
T11	Bello	París	1.968	N 6.18877° W 75.37169°
T12	Bello	París	1.943	N 6.18880° W 75.35124°
T13	Bello	París**	1.984	N 6.18904° W 75.37278°
T14	Bello	París	1.957	N 6.18104° W 75.35290°
T15	Bello	Nueva Jerusalén	1.977	N 6.19241° W 75.35224°
T16	Bello	París	1.907	N 6.18849° W 75.35038°
T17	Bello	París	1.883	N 6.18930° W 75.35031°
T18	Bello	París	1.891	N 6.18883° W 75.35033°
T19	Bello	París	1.882	N 6.18822° W 75.35023°
T20	Bello	París	1.882	N 6.18645° W 75.35053°
T21	Bello	Nueva Jerusalén	1.977	N 6.19241° W 75.35024°

* Trampa ubicada a la mayor altura donde se recolectó *Aedes aegypti*

** *Aedes aegypti* positivos para el virus del dengue serotipo 2

Después de que los adultos emergieron, su identidad taxonómica se verificó usando las claves para mosquitos de importancia médica de la *Walter Reed Biosystematics Unit* (WRBU, http://www.wrbu.org/command_aors_MQkeys.html). Los especímenes obtenidos de trampas entre los 1.882 y los 1.984 msnm se usaron para formar grupos de tres a seis individuos, los cuales se procesaron para la detección viral usando la metodología de Kuno (16). Los demás mosquitos se montaron en alfileres entomológicos siguiendo los protocolos del Museo de Historia Natural de Londres (17).

Resultados

En las 11 ovitrampas instaladas en Bello entre los 1.882 y los 1.984 msnm, se recolectaron 360 adultos de *A. aegypti*. De los adultos obtenidos, se seleccionaron 40 individuos representativos de todas las trampas para formar grupos y hacer la detección viral. En dos grupos (12 individuos) de la trampa T13, ubicada a 1.984 msnm, se detectó la presencia del virus del dengue serotipo 2 (cuadro 1). Este serotipo se ha detectado y aislado previamente mediante métodos serológicos y moleculares en pacientes que asistían a consulta en la Clínica de Fiebre del barrio París (no se presentan los datos).

En las diez ovitrampas instaladas entre los 2.237 y 2.659 msnm, se observó ovipostura de *A. aegypti* en dos de ellas: la ovitrapa número T9

y la T10, ubicadas en Bello a 2.302 msnm (vereda Tierradentro, zona rural) y en Altos de Niquía, zona semiurbana, a 2.252 msnm, respectivamente. Después de la inundación de los huevos, en la ovitrapa 9 se observaron siete larvas, las cuales se criaron hasta la fase adulta y se obtuvieron cuatro hembras y tres machos, todos identificados como *A. aegypti* (figura 1). En la ovitrapa 10 los huevos no fueron viables y no se observó eclosión.

Discusión

Desde que Suárez, *et al.*, incrementaron el rango de distribución de *A. aegypti* en Colombia de 1.600 a 2.200 msnm en 1981 (15), no se conocían estudios que evaluaran la distribución altitudinal de este importante vector en el país. En México, Lozano-Fuentes, *et al.* (13), reportaron *A. aegypti* a una altura máxima de 2.130 msnm, y encontraron altas densidades por debajo de los 1.700 msnm, en tanto que su presencia no fue tan frecuente entre los 1.700 y los 2.130 msnm, incluida la ciudad de Puebla, la cual se encuentra a 2.100 msnm. En Venezuela Navarro, *et al.* (14), realizaron un estudio de los géneros y especies de mosquitos registrados por encima de los 2.000 msnm y conservados en museos y colecciones, con el fin de conocer las de mayor distribución altitudinal, y no encontraron *A. aegypti* en ninguno de los 9.607 registros de 432 localidades revisados. Según estos autores (14), solo se conocen registros de

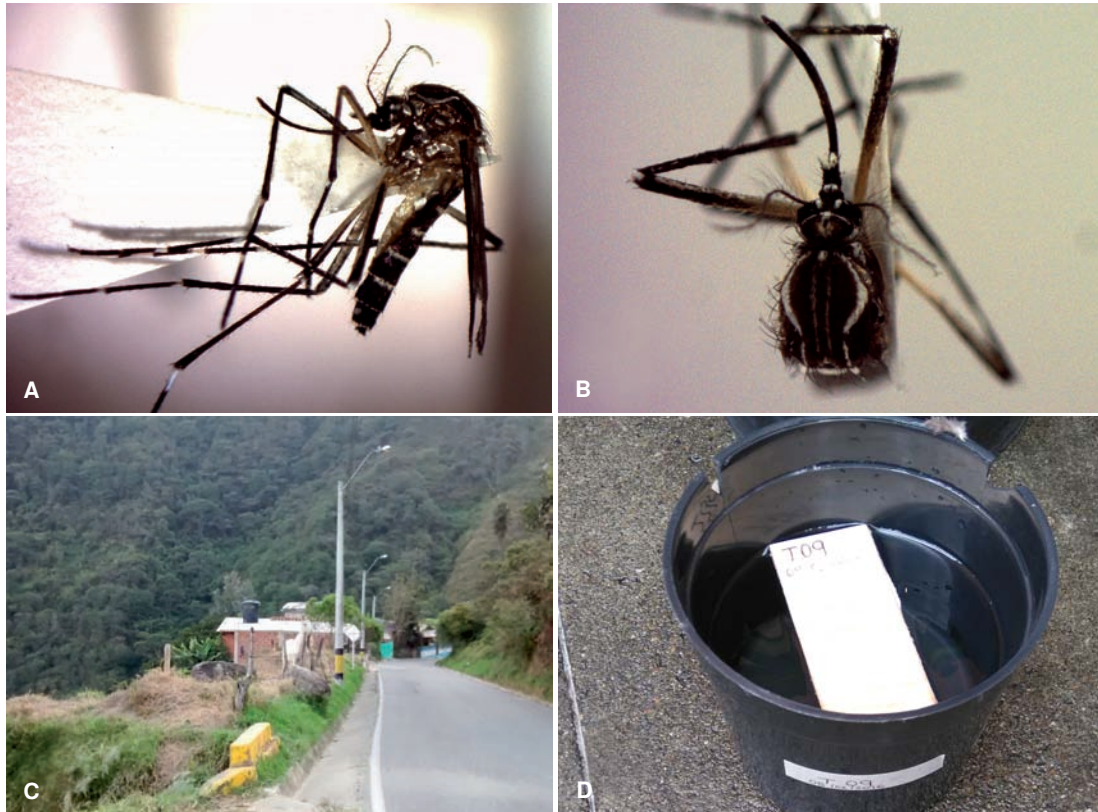


Figura 1. *Aedes aegypti* adulto y sus caracteres diagnósticos (líneas blancas en forma de lira en el tórax), obtenido de la ovitrampa T9 a 2.302 msnm, en la vereda Tierradentro, municipio de Bello, Antioquia. **A.** Vista lateral. **B.** Vista dorsal del tórax. **C.** Vivienda donde fue ubicada la ovitrampa. **D.** Ovitrapa: recipiente con agua y una tablilla de balsa en su interior.

A. aegypti en Venezuela por debajo de los 2.000 msnm, lo que podría ser una barrera altitudinal para la transmisión del dengue y otros arbovirus transmitidos por este vector.

En Colombia, De la Hoz, *et al.* (18), reportaron casos de dengue asociados a la presencia de *A. aegypti* de altura en Cáqueza, Cundinamarca, a 1.746 msnm. Según Padilla, *et al.* (19), entre 1999 y 2010, en el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública, Sivigila, se registraron 628.016 casos de dengue, de los cuales 2.801 casos se presentaron en 53 municipios ubicados por encima de los 1.800 msnm (19). También en el estado de Guerrero (México), Herrera-Basto confirmó la transmisión autóctona de dengue a 1.700 msnm (20), lo cual generó la alerta sobre la distribución del vector en zonas de mayor altitud. Recientemente, en marzo de 2016, el director departamental de salud de la Paz, Bolivia (SEDES), confirmó la presencia de *A. aegypti* a 2.600 msnm en las ciudades de Cochabamba y Tarija; sin embargo, no se ha evaluado la transmisión de dengue en estas altitudes (no se publican los datos).

Es de anotar que este es un estudio piloto que actualmente se lleva a cabo en Bello y San Pedro de los Milagros en el marco de la respuesta a la transmisión del dengue, de tanta importancia para el país, y al incremento en la transmisión de otros arbovirus como el del chikungunya y del zika, cuyo vector es también *A. aegypti*. En este sentido, los autores consideran que en el futuro se deben realizar estudios entomológicos, con estimativos de las densidades y periodos más largos de vigilancia entomológica, para descartar que la presencia de *A. aegypti* en las zonas más altas, donde el número de huevos fue bajo, no haya sido una infestación accidental, ya que las ovitrampas se colocaron durante ocho días únicamente.

La presencia de *A. aegypti* en nuevas altitudes y áreas rurales puede estar relacionada con los asentamientos humanos en las laderas de la montaña y a los lados de las nuevas vías de acceso intermunicipales y departamentales, lo cual no significa desestimar el papel del calentamiento global y su impacto en todos los ecosistemas, incluido el incremento en el rango de distribución

de insectos vectores (21,22). Infortunadamente, el cambio climático y su relación con la transmisión de arbovirus en Colombia se han estudiado poco (23-25).

Aunque las densidades de *A. aegypti* no son tan altas por encima de los 2.200 msnm (11,13,15), su presencia en áreas rurales por encima de dicha altitud llama a contemplar la ampliación del rango altitudinal de intervención en las campañas de control vectorial. Para ello sería importante considerar, además de las densidades del vector, la presencia de dengue y de los serotipos virales que circulan simultáneamente en los pacientes y el vector.

Los resultados del presente estudio podrían considerarse como una alerta sobre la presencia del vector en límites superiores a los conocidos y deberían evaluarse en términos del riesgo potencial de transmisión autóctona de arbovirus transmitidos por este mosquito en áreas que se consideraban a salvo del riesgo de transmisión debido a que su altitud y temperatura actúan como barreras.

Sería pertinente realizar actividades de vigilancia entomológica en zonas de altura en el Valle de Aburra, particularmente en el municipio de Bello, dado el desplazamiento y el asentamiento de comunidades hacia las comunas y veredas ubicadas en las laderas y partes altas de la montaña. Estos hallazgos constituyen un llamado de atención en términos de los cambios en los patrones de distribución de este vector en Colombia y en relación con la situación actual y futura de la vigilancia y el control vectorial.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Financiación

Esta investigación fue financiada por el Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, PECET, de la Universidad de Antioquia, el Proyecto "Eliminar el dengue, un desafío para Colombia" y la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

Agradecimientos

A Evencio Mosquera por el trabajo en el insectario y con las oviposturas del límite superior de altura. A todo el equipo de entomología de campo y de insectario del proyecto "Eliminar el dengue, un desafío para Colombia" (Jovany Barajas, Sandra Ángel, Sandra Gómez, Sebastián Durán, Luz Adriana Muñoz, Sebastián Pérez). A Johan

Acevedo y David Gallo, del Grupo de Investigación en Sistemática Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, por su colaboración en el procesamiento de material para los estudios biológicos y moleculares.

Referencias

1. **Monath TP.** Yellow fever. The arboviruses: Epidemiology and ecology. In: Monath TP, editor. Boca Ratón (FL): CRC Press; 1989. p. 139-231.
2. **Simmons CP, Farrar JJ, Chau NV, Wills B.** Dengue. *N Engl J Med.* 2012;366:1423-32. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra1110265>
3. **Pialoux G, Gauzere BA, Jaureguiberry S, Strobel M.** Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet Infect Dis.* 2007;5:319-27. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(07\)70107-x](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(07)70107-x)
4. **Marchette NJ, García R, Rudnick A.** Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg.* 1969;18:411-5.
5. **Mattingly PF.** Genetical aspects of the *Aedes aegypti* problem I. Taxonomy and bionomics. *Ann Trop Med Parasit.* 1957;51:392-408.
6. **Tabachnick WJ, Munstermann LE, Powell JR.** Genetic distinctness of sympatric forms of *Aedes aegypti* in East Africa. *Evolution.* 1979;33:287-95. <http://dx.doi.org/10.2307/2407619>
7. **Brown JE, Evans BR, Zheng W, Obas V, Barrera-Martínez L, Egizi A, et al.** Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. *Evolution.* 2014;68:514-25. <http://dx.doi.org/10.1111/evo.12281>
8. **Petersen JL.** Behavior differences in two subspecies of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in East Africa (Dissertation). Notre Dame, IN: University of Notre Dame; 1977.
9. **Lounibos LP.** Invasions by insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol.* 2002;47:233-66. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145206>
10. **Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne QN, Shearer MF, Barker MC, et al.** The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife.* 2015;4:e08347. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.08347>
11. **Dhimal M, Gautam I, Joshi HD, O'Hara RB, Ahrens B, Kuch U.** Risk factors for the presence of chikungunya and dengue vectors (*Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*), their altitudinal distribution and climatic determinants of their abundance in Central Nepal. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9:e0003545. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003545>
12. **Ibáñez-Bernal S.** Nuevo registro altitudinal de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) en México. *Folia Entomol Mex.* 1987;72:163-164.
13. **Lozano-Fuentes S, Hayden MH, Welsh-Rodríguez C, Ochoa-Martínez C, Tapia-Santos B, Kobylinski CK, et al.** The dengue virus mosquito vector *Aedes aegypti* at high elevation in México. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87:902-9. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0244>

14. **Navarro JC, Ventura FD, Zorrilla A, Liria J.** Registros de mayor altitud para mosquitos (Diptera: Culicidae) en Venezuela. *Rev Biol Trop.* 2010;58:245-54. <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v58i1.5206>
15. **Suárez FM, Nelson JM.** Registro de altitud del *Aedes aegypti* en Colombia. *Biomédica.* 1981;1:225. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v1i4.1809>
16. **Kuno G.** Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. *J Virol Methods.* 1998;72:27-41. [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-0934\(98\)00003-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-0934(98)00003-2)
17. **Ruiz-López F.** Molecular systematics of the Oswaldoi complex (*Anopheles*; *Nyssorhynchus*) in South America. Dissertation. London: University of Kent and The Natural History Museum; 2010.
18. **Rodríguez H, De la Hoz F.** Dengue and dengue and vector behaviour in Cáqueza, Colombia, 2004. *Rev Salud Pública.* 2005;7:1-15. <http://dx.doi.org/10.1590/s0124-00642005000100001>
19. **Padilla JC, Rojas DP, Sáenz-Gómez R.** Dengue en Colombia: epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia. Bogotá: Guías de Impresión, Ltda.; 2012. p. 249.
20. **Herrera-Basto E, Prevots DR, Zárate ML, Silva JL, Sepúlveda-Amor J.** First reported outbreak of classical dengue fever at 1,700 meters above sea level in Guerrero State, México, June 1988. *Am J Trop Med Hyg.* 1992;46:649-53.
21. **Hales S, Wet N, Maindonald J, Woodward A.** Potential effect of population and climate changes on global distribution of dengue fever: An empirical model. *Lancet.* 2002;360:830-4. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09964-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09964-6)
22. **Khormi HM, Kumar L.** Climate change and the potential global distribution of *Aedes aegypti*: Spatial modelling using GIS and CLIMEX. *Geospat Health.* 2014;8:405-15. <http://dx.doi.org/10.4081/gh.2014.29>
23. **Cassab A, Morales V, Máttar S.** Factores climáticos y casos de dengue en Montería, Colombia. 2003-2008. *Rev Salud Pública.* 2011;13:115-28. <http://dx.doi.org/10.1590/s0124-00642011000100010>
24. **Rúa-Uribe G, Calle D, Rojo R, Henao E, Sanabria W, Suárez C.** Influencia del evento climático El Niño sobre la dinámica de transmisión de dengue en Medellín, Antioquia-Colombia. *Iatreia.* 2012;25:314-22.
25. **Rúa-Uribe GL, Suárez-Acosta C, Chauca J, Ventosilla P, Almanza R.** Modelado del efecto de la variabilidad climática local sobre la transmisión de dengue en Medellín (Colombia) mediante análisis de series temporales. *Biomédica.* 2013; 142-52. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.1444>

TOPIC REVIEW

Molecular biomarkers to assess health risks due to environmental contaminants exposure

Irais Poblete-Naredo, Arnulfo Albores

Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN
Ciudad de México, México

Biomarkers, or bioindicators, are metric tools that, when compared with reference values, allow specialists to perform risk assessments and provide objective information to decision makers to design effective strategies to solve health or environmental problems by efficiently using the resources assigned.

Health risk assessment is a multidisciplinary exercise, and molecular biology is a discipline that greatly contributes to these evaluations because the genome, transcriptome, proteome and metabolome could be affected by xenobiotics causing measurable changes that might be useful biomarkers. Such changes may greatly depend on individual genetic background; therefore, the polymorphic distribution of exposed populations becomes an essential feature for adequate data interpretation.

The aim of this paper is to offer an up-to-date review of the role of different molecular biomarkers in health risk assessments.

Key words: Biological markers, risk assessment, environmental pollutants, molecular biology, molecular epidemiology.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2998>

Biomarcadores moleculares para evaluar el riesgo para la salud debido a la exposición a contaminantes ambientales

Los biomarcadores, o bioindicadores, son herramientas métricas que, al compararse con los valores de referencia, permiten evaluar los riesgos y generar información objetiva que ayude a las autoridades a planificar estrategias efectivas, solucionar problemas de salud o ambientales y utilizar los recursos asignados de manera eficiente.

La evaluación de riesgos en salud es un ejercicio multidisciplinario y la biología molecular contribuye enormemente a estos estudios, dado que el genoma, el transcriptoma, el proteoma y el metaboloma pueden verse afectados por xenobióticos, lo que causa cambios cuya medición resulta útil en la adopción de decisiones. Dichos cambios pueden variar por la carga genética de cada individuo y su distribución polimorfa en las poblaciones expuestas se convierte en un factor esencial para una adecuada interpretación de resultados.

Por lo tanto, el objetivo del presente artículo fue hacer una revisión de los diferentes biomarcadores moleculares aplicables a la evaluación de riesgos para la salud provenientes de los contaminantes ambientales.

Palabras clave: marcadores biológicos, medición del riesgo, contaminantes ambientales, biología molecular, epidemiología molecular.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2998>

Corresponding author:

Arnulfo Albores, Avenida Instituto Politécnico Nacional 2508,
Colonia San Pedro Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero,
CP 07369, Ciudad de México, México
Teléfono: (01555) 747 3800, extensión 5476
aalbores@cinvestav.mx

Received: 23/07/15; accepted: 21/12/15

Indicators or biomarkers

Indicators or markers are widely used metric tools that assess the degree of agreement or accomplishment of qualitative or quantitative data with respect to a given reference value. Specialists and the general public routinely apply them in practically

Author's contributions:

Irais Poblete-Naredo: design and drafting of the manuscript
Arnulfo Albores: design and drafting of the manuscript and critical revision
Both authors contributed equally to this paper.

all fields, such as economics, development, politics, academics and health. Indicators provide precise and specialized information to the general population and/or professionals to acquire an accurate perception of specific issues on the status of society or on personal performances. Changes in specific indicators can be used to estimate the status of a system and assess its evolution, progress, improvement or risk; then, indicators provide the basis to implement political changes or for informed decisions towards the efficient achievement of particular goals.

In Biology and Health Sciences, the US National Academy of Sciences defined biomarkers as “cellular or biochemical components or processes altered by a xenobiotic; those changes can be measured in the entire system or in a biological sample” (1). Thus, according to biochemistry or physiology, reference values of certain metabolic activities or physiological functions are used to assess the health status of an individual. Based on biomarker data, the extent of changes caused by internal or external factors can be assessed and used to design strategies to solve such situations.

The environment and health issues

The need to know the incidence of disease and its etiology, particularly due to environmental occupational exposures, started with Bernardino Ramazzini (1633-1714), an Italian physician from Padova, who successfully associated occupational environmental exposures with specific pathologies. In his book “De morbis artificum diatriba” (1700), he associated 54 work activities with illnesses. The book was the first attempt to systematically classify diseases according to the chemicals present in the work environment and the pathologies developed (2). Presently, biomarkers are used as specialized parameters to assess particular conditions in a cell up to a population. Biomarkers are useful to make informed decisions at all levels –they are necessary to implement policies aimed at solving challenges or preventing situations efficiently. However, biomarkers should be reliable and opportunely available to decision makers.

Biomarkers characteristics

Biomarkers are classified as biomarkers of exposure, effect or susceptibility (3) (figure 1). Each one is useful to assess the health status of an individual, a population or even an ecosystem. A biomarker can be used alone; however, sometimes biomarkers of different types need to be analyzed

jointly because some of them may not be highly specific and may require correlation with other parameters for adequate interpretations.

To be considered reliable, a good biomarker should:

- a) Respond to a biologically active contaminant,
- b) have a dose-effect response correlated with the contaminant levels,
- c) have a response that persists even if the exposure to a pollutant ceases because the compound may not remain indefinitely in the environment,
- d) preferably be non-invasive in the case of humans and should be easily measurable, and
- e) be specific so that an effect can be attributed to a chemical, thus contributing to the certainty of an assessment, and sensitive because the biomarker response should be related to the amount of toxicant capable of eliciting an effect.

These parameters indicate the biological and environmental relevance of pollutant concentrations (4) (figure 2).

Blood is the preferred tissue to analyze biomarkers; its collection is of low invasiveness, and it is a readily available tissue that contains different cell types (erythrocytes and lymphocytes) and fluids (plasma). One of its characteristics is that it distributes nutrients, collects metabolic products that carry information among organs, or serves as vehicle for their excretion. However, blood has its own features, cells belong to different lineages, and metabolites come from different organs. When blood or blood cells are used as surrogates for other tissues, toxicity and risk assessment results are obtained faster than with solid tissues, and the physiological changes in organs or fluids may be reflected by changes in the blood. In other words, changes in blood measurements should be closely correlated with the effects in the parent organ.

Adequate biomarkers are necessary to develop a successful biological monitoring program, and the following steps should be taken:

- a) Select a biomarker that fits with almost all criteria of reliability;
- b) delimit the size of the biological sample to be studied in terms of the sensitivity and specificity of the biomarker;
- c) consider all confounding factors that may alter results, as well as co-exposure to other chemical agents, and

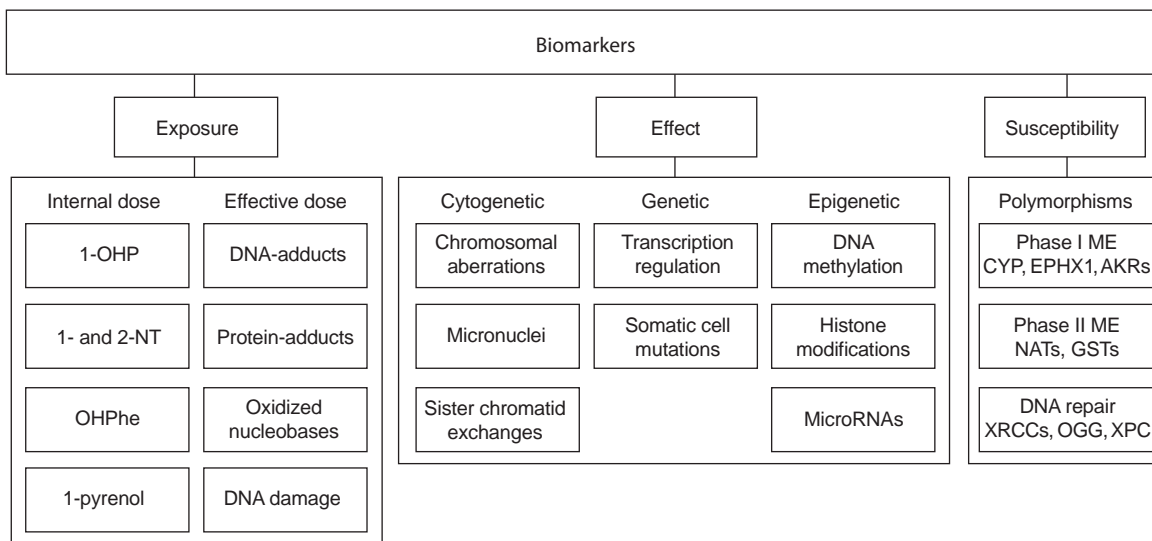


Figure 1. Classification of biomarkers

1-OHP: 1-hydroxypyrene; AKRs: aldo-keto reductases; CYP: cytochrome P450 enzymes; EPHX1: epoxide hydrolase 1; GSTs: glutathione S-transferases; ME: metabolizing enzyme; NATs: *N*-acetyltransferases; NT: naphthol; OGG: oxoguanine DNA glycosylase; OHPhe: hydroxyphenanthrenes; XPC: *Xeroderma pigmentosum* - C; XRCCs: X-ray cross-complementing

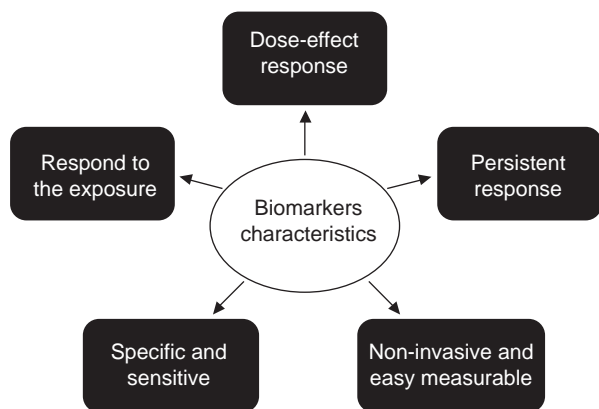


Figure 2. Requisites that a biological response should comply to be considered as a biomarker for health assessment

d) select the appropriate tissue for analysis.

The results will reflect the total burden of chemical agents that enter into an individual through all body routes.

Biomarkers of exposure

A biomarker of exposure refers to the quantitation of a parent compound or its metabolites in a tissue or body fluid, or the reaction product(s) of any of those with a biological molecule (4). According to this definition, biomarkers of exposure can be classified into:

1) Markers of internal dose, which indicate the concentration of a given pollutant in an organism, and

2) markers of effective dose, which indicate the extent of the interaction of a pollutant with a target molecule (figure 3).

A brief summary of the methods used to study several types of common biomarkers, surrogate tissues for analysis and environmental factors that modify their levels is shown in table 1.

Biomarkers of internal dose

Because direct determinations of environmental pollutants do not necessarily reflect the biologically available concentrations in an organism, the evaluation of internal doses becomes necessary to assess the current exposure status in terms of the quantity of the parent compound or its metabolites present in the body fluids or tissues of exposed individuals or populations (4). Some metabolic products from the biotransformation of a xenobiotic are useful biomarkers of internal dose. The environmental or occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) can be monitored by the quantitation of metabolic intermediates of frequent and abundant chemicals in the mixture, such as 1-hydroxypyrene (1-OHP), the main pyrene metabolite (90%), with an average half-life of approximately 18-20 hours after pyrene inhalation (5). Urinary 1-OHP is routinely used as a biomarker in workers occupationally exposed to PAHs (6-8), tobacco smokers (9,10) and the general population exposed to airborne pollution (11-13). Urinary 1-OHP is readily measured by high performance

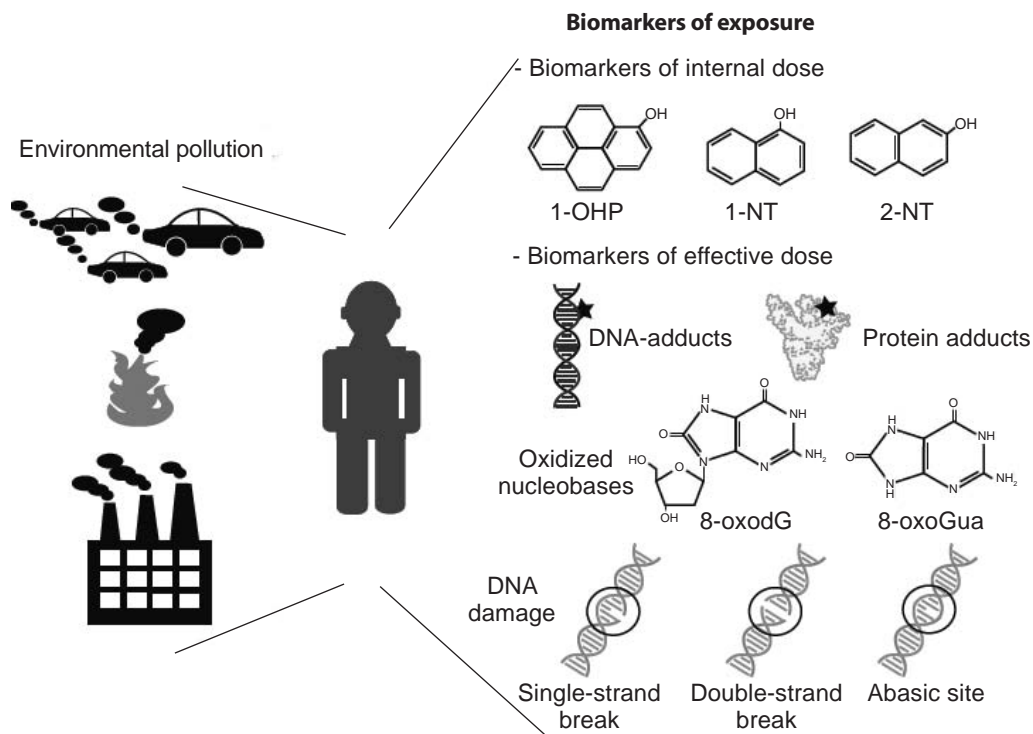


Figure 3. Biomarkers of exposure. The biomarkers of exposure are classified as markers of internal dose and markers of effective dose. 1-OHP: 1-hydroxypyrene; 8-oxodG: 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine; 8-oxoGua: 8-oxo-7,8-dihydroguanine; NT: naphthol

Table 1. Biomarkers of exposure. Environmental compounds that modify the listed biomarkers of exposure, the main methods for their identification and the biological samples used for analysis

	Biomarkers of exposure		
	Environmental compounds	Methods for identification	Types of samples
Biomarkers of internal dose			
1-OHP	PAHs	HPLC-FD	Urine
1- and 2-NT	Tobacco smoking	GC/MS	
OHPh	Airborne pollution		
1-pyrenol			
Biomarkers of effective dose			
DNA-adducts	PAHs	MS	White blood cells
	Metals	Immunoassay	Lung tissue
	Tobacco smoking	Immunohistochemistry	
	Traffic pollution	³² P-postlabeling	
Protein adducts	Air pollution	Immunoassays	Serum albumin
	Heterocyclic amines	HPLC-FP	Hemoglobin
	PAHs tobacco smoke	GC/MS	
Oxidized nucleobases (8-oxoGua, 8-oxodG)	Environmental pollution	Immunoassay	Urine
	Metals (Cd, As, Co, Cr, V)	Immunohistochemistry	White blood cells
	PAHs	MS	Tissue (lung, nasal epithelia)
	PM	Chromatography	Urine
		³² P-postlabeling	
DNA damage	Air pollution	FPG-based methods	Peripheral lymphocytes
	PAHs	Comet assay	Leukocytes
	PM	(Endonuclease III, FPG, AlkA)	Epithelial cells
		DNA repair test	Sperm
		<i>In vitro</i> comet repair assay	

1-OH: 1-hydroxypyrene; 8-oxodG: 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine; 8-oxoGua: 8-oxo-7,8-dihydroguanine; FPG: formamidopyrimidine DNA N-glycosylase; GC/MS: gas chromatography coupled to mass spectrometry; NT: naphthol; OHPh: hydroxyphenanthrenes; PAHs: polycyclic aromatic hydrocarbons; HPLC-FP: high performance liquid chromatography with fluorescence detection; PM: particulate matter

liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FD), and/or gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS); its quantitation has shown a good correlation with PAH human exposure at both high and low environmental levels (5).

Other examples of internal dose biomarkers for environmental contaminants are 1- and 2-naphthol (NT), naphthalene metabolites that have been proposed as PAH biomarkers of air or inhalation exposure (14-16); phenanthrene hydroxylated metabolites (OHPhe), which are considered good biomarkers for occupational PAH exposure (10), and 1-pyrenol, another pyrene metabolite, which is less frequently used because its concentration does not necessarily correlate with the levels of exposure to carcinogenic PAHs (17).

Biomarkers of effective dose

Biomarkers of effective dose indicate the interaction of a chemical with a biological target, such as DNA and proteins, or its damaging effect to a biological molecule. Considering that there may be substantial inter-individual variations in the metabolism of the compounds, the determination of the effective dose is required for the evaluation of the health effects of pollutants in organisms (4). The classical biomarkers of effect determined by the exposure to chemical pollutants are DNA and protein adducts; the levels of DNA oxidized nucleobases and DNA damage.

DNA adducts. A DNA adduct is the product of covalent binding of a small electrophilic chemical compound to DNA (18). The nature of the electrophilic moiety of the DNA adduct can be a parent compound or a product of its metabolism. Although DNA adducts are targets of multiple DNA repair enzymes, some modifications may persist and produce several undesirable effects, such as nucleotide substitutions, leading to DNA mutations and synthesis of altered protein products (19). Many environmental air pollutants (20), tobacco smoke (20-22) and PAHs from traffic exhaust (23,24) or from occupational exposure (21) have shown a positive correlation with DNA adduct formation in exposed populations. For further information, see reference (25).

DNA adducts have been assessed and quantified in almost all human tissues, but the preferred samples of study are white blood cells due to their availability, and lung tissue because the lung is the point of entry for most carcinogenic environmental contaminants (26). DNA adducts are evaluated

by three main methodological approaches, all characterized by their sensitivity, specificity, cost and instrumentation (19). Mass spectrometry (MS) is the most specific methodology and is able to identify DNA adducts according to their molecular weight. This is a high-throughput platform that allows the identification of several adducts in a sample. However, DNA adduct determination by MS requires complex instrumentation and is expensive. Immunoassays and immunohistochemistry are techniques that use antisera to identify specific DNA adducts in DNA samples or directly in the studied tissues. These are low-cost and high-throughput assays with the limitation that the adduct species to identify are restricted by the availability of specific antisera; therefore, the discovery of new adducts using these methodologies is not possible. ³²P-postlabeling includes DNA digestion and radioactive labeling, and then normal and modified DNA molecules are separated by chromatographic techniques. Despite the fact that this methodology is unable to elucidate the structure of DNA adducts, only the DNA adduct profile of the sample, it is the approach of choice in several studies on DNA damage caused by environmental pollution at very low exposure levels (27,28). According to Poirier *et al.* (19), approximately 40 different DNA adducts have been identified in human samples using the aforementioned techniques.

Protein adducts. Protein adducts are the product of a covalent interaction between a reactive chemical compound and a protein. The most common protein adducts evaluated are those formed with serum albumin [particularly with cysteine at position 34 (Cys³⁴)] and hemoglobin; these proteins are found in very large quantities in blood that react with electrophilic compounds via their reactive carboxyl, amino and/or sulfhydryl groups (29). The study of protein adducts as surrogate markers of effective dose offers the advantages that proteins often have longer half-lives than other markers (parent compound or its metabolites), they are much more abundant than DNA adducts, and they are not subjected to repair (29). The methodological approaches employed for protein adducts research are based on the number of samples, time, and available methodologies. For large-scale studies, immunoassays are recommended, but chromatographic-based techniques, such as HPLC-FP or GC-MS, are also suitable.

The protein adducts assessed in environmental, smoking-related or occupational exposure to PAHs are those formed with benzo[a]pyrene (BaP) or the

carcinogenic metabolite of BaP (r-7,t-8-dihydroxy-t-9,t-10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene), BPDE. BaP and BPDE form adducts with serum albumin and hemoglobin. BaP protein adducts are well correlated with smoking, but the adduct levels showed only a marginal association or even no association at all with environmental PAH exposure (30). Moreover, BaP adducts have been found at higher levels in people living in rural or suburban areas than in subjects from urban residences, possibly due to the heat generation by organic combustion in the former regions (28,30). Interestingly, no association of protein and DNA adducts has been observed in studies that evaluate the exposure to rural and urban air pollution, which was attributed to differences in half-life, kinetics and methodological approaches for both markers (28).

Oxidized nucleobases. The production of reactive oxygen species (ROS) in aerobic organisms is a natural and ubiquitous process associated with cell metabolism (31). Different enzymatic pathways are dedicated to maintenance of the correct balance between pro-oxidative and anti-oxidative status, but some exogenous stimuli may shift this equilibrium and induce a pro-oxidant condition that can damage cell integrity. As is well known, ROS are able to modify the DNA nucleobases and generate mutations when those are not repaired by the corresponding mechanisms (25). Although a wide number of oxidative modifications of DNA have been described, the oxidation of guanine generates 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) and its deoxynucleoside, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG), which are the most commonly measured products of oxidative DNA damage (31). Modified guanine products originate from direct oxidation of guanine in double-stranded DNA or by the modification of dGTP to 8-oxo-dGTP in the general pool of nucleotides in the cell, which is then incorporated in the DNA during duplication or repair (32). The main repair mechanism of guanine-oxidized lesions is mediated by the enzyme oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) via the excision of 8-oxoGua from the DNA (31), with the final product released in the urine. However, other minor repair systems have been described (32). If the corresponding repair system fails in the removal of 8-oxoGTP, it results in mutagenesis due to the production of GC→TA transversions during DNA replication (33).

The level of guanine-oxidized products is mainly determined in leukocyte DNA and in urine, even though it has also been detected in different

tissues, such as nasal epithelia. Despite the fact 8-oxoGua is the major product of DNA repair, the determination of 8-oxodG is preferred because there are many standardized and validated methods for 8-oxodG determination by chromatographic methods and by commercial ELISA kits (32). Moreover, the 8-oxoGua product is less stable than its deoxynucleoside counterpart, which makes its extraction, separation and detection difficult (32).

In general terms, the levels of 8-oxodG in a given organ or tissue reflect the oxidative state in that particular sample, whereas the levels of 8-oxodG in urine is a measure of the oxidative damage in the whole organism (32). The detection and analysis of 8-oxodG is accomplished by chromatographic approaches, mainly HPLC with electrochemical (EC) detection (HPLC-EC), GC-MS and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS-MS); immunoassays and immunohistochemistry; ³²P-postlabeling, and the formation of strand breaks by the removal of 8-oxodG with the use of formamidopyrimidine DNA *N*-glycosylase (FPG) (31,32).

Many environmental pollutants have the ability to induce ROS production, such as particulate matter (PM), traffic-related contaminants, wood smoke and heavy metals, among others (25,32,33). Overall, there is strong evidence that there is an association between environmental air pollution and the urinary excretion of 8-oxodG or 8-oxoGua, biomarkers that are widely used to assess endogenous oxidative DNA damage (25).

DNA damage: comet assay. The comet assay or the single cell gel electrophoresis assay is an easy, fast and sensitive method to evaluate DNA transient damage at the level of single- and double-stranded breaks, abasic sites, and DNA replication and repair intermediates. DNA is isolated from the rest of the cell components with a high saline solution with detergents in a gelatin-covered slice. The obtained DNA is incubated in an alkaline media to unwind DNA with strand breaks and then it is subjected to electrophoresis. The broken DNA portions will migrate towards the anode resembling a "comet tail" and are visualized with a fluorescent DNA-binding dye (34,35). In general terms, the more DNA damage the longer the DNA tail. Modifications of the basic comet assay include the use of lesion-specific enzymes for the identification of modified nucleobases to increase the specificity and sensitivity of the method (34). Usually, the endonuclease III enzyme is selected to detect oxidized pyrimidines,

FPG for 8-oxoGua identification (oxidized purines) and AlkA for alkylated bases (35). Other variants of the traditional comet assay are the DNA repair test and the *in vitro* comet repair assay. The former measures the DNA repair kinetics and the degree of repair after a genotoxic cellular stimulus and the latter, the capacity of cell extracts to repair damaged DNA (35).

The comet assay is considered a highly sensitive assay, and its results correlate well with other cytogenetic tests, such as micronucleus (MN), sister chromatid exchange (SCE) and chromosomal aberration (CA) analysis (34). The preferred biological material for the comet assay comes from isolated peripheral lymphocytes or leukocytes, but other type of cells have been used satisfactorily, such as epithelial cells obtained from the mouth, nose and tear ducts, exfoliated bladder cells, and sperm, all of them appropriate surrogate tissues for those directly affected by chemicals (36). Moreover, in the case of air contamination, the tissue of choice is the nasal epithelia because the nose is the point of entry of the air pollutants, and these cells have shown great sensitivity in sensing environmental xenobiotics (34).

The application of the comet assay in human biomonitoring for environmental and occupational exposure to genotoxic agents has been extensively reviewed (34,36). Briefly, the majority of the studies reveal a good correlation between exposure to environmental pollution and DNA damage, as well as associations with the results obtained from other biomarkers of exposure (36). For example, occupational exposure to carcinogenic PAHs reduced the ability of cells to repair damaged DNA (37), and the environmental exposure to PM10 from the emissions of an oil refinery increased DNA damage in lymphocytes obtained from exposed subjects (38). Moreover, in buccal epithelial cells from women chronically exposed to biomass smoke, there was a positive correlation between PM10 and PM2.5 indoor levels and DNA damage (39). Tobacco smoke effects on DNA integrity are, in contrast, a controversial issue due to the increased, synergistic, discrepant or null effects observed in several studies. While in some studies there was a strong association of DNA damage with tobacco smoking, in others there was only an effect in conjunction with other genotoxic agents, and in others, the effect was greater in control groups compared with exposure groups (with co-exposure with other chemicals) or there was no association (34,40).

Biomarkers of effect

The presence of chemical contaminants or adverse agents in the environment will induce physiological and biochemical changes in a living being, and such changes are used as biomarkers of effect. These alterations must be a response to a chemical exposure and are manifested as the regulation, overexpression or inhibition of a specific behavioral, biochemical, anatomical, physiological or molecular function (27). Biomarkers of effect assess the levels of genetic damage in DNA and chromosomes, alteration of enzymatic activity, gene transcription, and/or gene mutation as well as epigenetic modifications, among others. In terms of this review, the molecular biomarkers of effect will be divided into three categories: cytogenetic, genetic and epigenetic biomarkers, which are summarized in figure 4 and table 2.

Cytogenetic biomarkers

The evaluation of cytogenetic biomarkers constitutes the first-choice tool in the assessment of human exposure to different agents, as contact with environmental pollutants is a common area of study (41). The cytogenetic assays that have been widely and extensively used involve the determination of CAs and MN, but other approaches have been used successfully, such as the determination of SCEs. Nevertheless, cytogenetic biomarkers are unspecific to the type of agent of exposure, and there are many confounding factors, such as age, cigarette smoking, gender, and irradiation exposure, that should be considered to reach correct conclusions (42).

Chromosomal aberrations. The alteration of the normal arrangement of chromosomes by deletions, duplications or reorganizations of the genome that can be visualized microscopically is defined as a chromosomal aberration (CA) (25,43). Double-stranded breaks of DNA (DSB) are the main source for CAs and are naturally produced during DNA synthesis by the accumulation of single stranded breaks through excision DNA repair, oxidative DNA modifications, and other processes or by external stimuli, such as UV and ionizing radiation, mutagens, antibiotics or nucleases (43). DSBs are generally repaired by three different mechanisms in eukaryotes: Homologous recombination repair (HRR), single-strand annealing and non-homologous DNA end joining. If DSBs in DNA are left unrepaired, the chromosome remains broken and leads to cell lethality. On the other hand, if the DNA repair mechanisms fail in the correct reestablishment of

the genetic information, it may generate rearrangements, mutations and cell transformation (43).

The microscopic evaluation of structural CAs relies on staining chromosomes using different techniques. Human lymphocytes are cultured (metaphase or interphase), and chromosomes are stained mainly by three different techniques: solid staining, chromosome banding and fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Solid staining, which consists of labeling the chromosomes with only one color, is a very limited method that only allows for the identification of dicentric and acentric products of asymmetrical exchanges, underestimating the genetic damage of the cell (43). Moreover, as asymmetric exchanges are lethal to cells, the cytogenetic assessment can only be performed during a short period of time due to the instability of the aberrations (44). The chromosome banding technique consists of different chromosomal banding stains, such as Giemsa staining (G-banding), reverse Giemsa (R-banding) staining, centromeric (heterochromatin) (C-banding) or multi-colored banding stain with hybridization labels for specific regions of the chromosome (mBANDs).

Chromosome banding identifies all types of structural arrangements, including intrachromosomal exchanges (that cannot be identified by FISH), but this methodology is time consuming and demands a skillful analyzer (41,44), which is a disadvantage in large-scale studies. In contrast, FISH is the most powerful technique and uses chromosome-specific probes, allowing for the detection of complex genetic configurations involving several breaks in two or more chromosomes in addition to symmetric and asymmetric rearrangements (43). Single and multicolored FISH protocols increase the number of chromosomes “painted,” and the number of aberrations identified is increased as well as the precision of the analysis (43). The greater specificity and speed of this approach allows the evaluation of larger quantities of cells, which increases the sensitivity of this method for the analysis of low frequency aberrations due to low-concentration exposures (44). One disadvantage of this method is that, to gain specificity, it requires augmenting the number of labeled chromosomes (with different colors or intensities), making the study costly and the analysis complex (41).

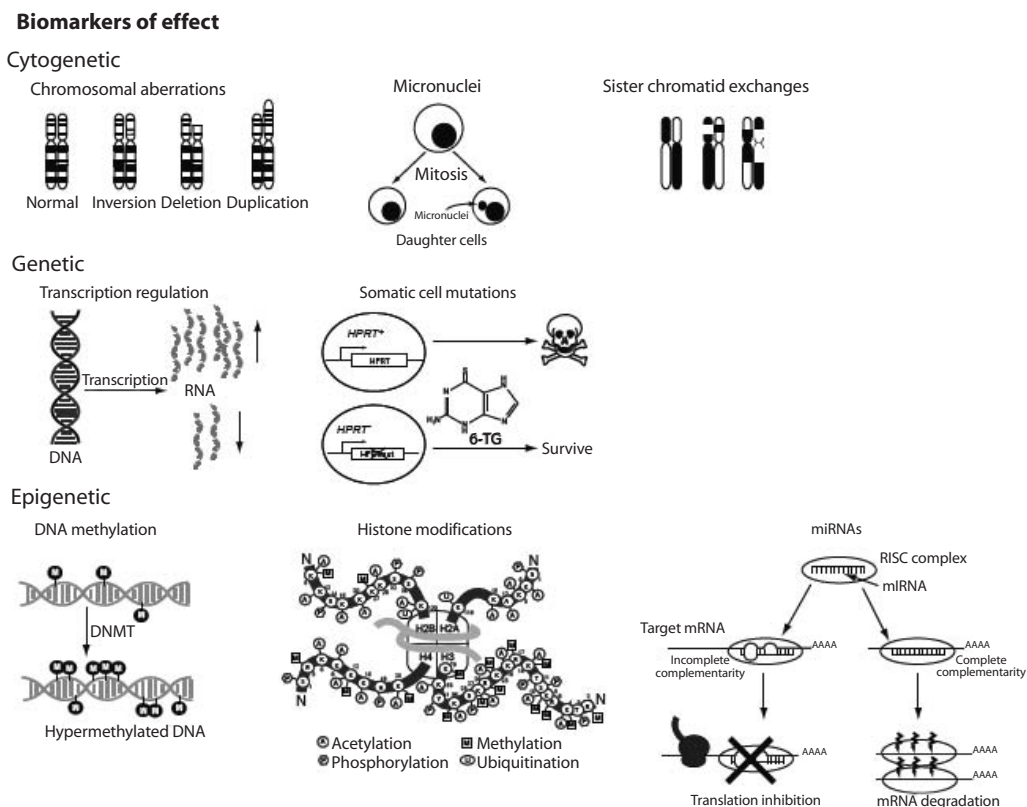


Figure 4. Biomarkers of effect. The molecular biomarkers of effect are divided in three main groups: Cytogenetic, genetic and epigenetic. 6-TG: 6-thioguanine; DNMT: DNA methyltransferase

Table 2. Biomarkers of effect. Environmental compounds that modify the listed biomarkers of effect, the main methods for their identification and biological samples for their study

	Biomarkers of effect		
	Environmental compounds	Methods for identification	Types of samples
Cytogenetic Chromosomal aberrations	Traffic pollution Air pollution Metals	Solid-staining Chromosome banding FISH	Lymphocytes
Micronuclei	Traffic pollution Air pollution Metals (As, Cd, Hg)	May-Grünwald Giemsa Papanicolaou's stain Feulgen stain Acridine orange stain Cytokinesis-block MN assay	Lymphocytes Exfoliated epithelial cells
Sister chromatid exchanges	Traffic pollution Metals (Cd, Cr, Al, As, Pb, Zn)	BrdUrd incorporation	Lymphocytes
Genetic Transcription regulation	PAHs Airborne particles: DE, DEPs, UFP, PM Tobacco smoking	Gene specific RT-PCR Northern Blot Genome wide microarrays	Leukocytes PMCs, lymphocytes Macrophages Airway epithelium Cell lines
Somatic cell mutations (HPRT)	Airborne pollution Tobacco smoke	Autoradiographic assay Clonal assay	T lymphocytes
Epigenetic DNA methylation	Metals (Ni, Cd, Pb, As) Ambient air pollution: PM, black carbon, sulfates, DEP PAHs, BaP	Gene specific MSP, COBRA DNA sequencing Genome wide HPCE, HPLC-MS MeDIP Microarrays	Fluids: Urine, plasma, sputum Lymphocytes Buccal cells Saliva Tissue
Histone modifications	Metals (Ni, Co, As, Cr) DEP PM10 BaP CSC	Gene specific ChIP Genome wide MS, HPLC, HPCE Western Blot ELISA ChIP-on-chip	Cell lines PMC Leukocytes Respiratory epithelia
MicroRNAs	Metals (As, Cd, Al, Pb) PM DE and DEP Cigarette smoke Asbestos Carbon black Ozone BaP	Real time PCR miRNA microarrays Sequencing	Cell lines Primary cell cultures Peripheral blood leukocytes Tissue: Epithelial cells brain, liver Body fluids: Serum, plasma, urine and sputum

BaP: benzo[a]pyrene; BrdUrd: 5'-bromodeoxyuridine; ChIP: chromatin immunoprecipitation; COBRA: combined bisulfite conversion restriction analysis; CSC: cigarette smoke condensate; DE: diesel exhaust; DEP: diesel exhaust particles; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; FISH: fluorescence *in situ* hybridization; HPCE: high performance capillary electrophoresis; HPLC: high performance liquid chromatography; HPRT: hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; MeDIP: methylated DNA immunoprecipitation; MS: mass spectrometry; MSP: methylation specific PCR; PAHs: polycyclic aromatic hydrocarbons; PM: particulate matter; PMC: peripheral mononuclear cells; RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction; UFP: ultrafine carbon particles

The association of environmental pollution with cytogenetic damage in exposed populations has been discussed in several reports and review papers (25,27), which have noted CAs are good biomarkers of effect and good predictors of cancer risks (41,44) The most suitable cell type for CA assessment in humans is the peripheral lymphocyte. This cell type offers many advantages: 1) It easily grows

in vitro; 2) a high number of metaphase cells are attainable; 3) it provides a whole perspective of the systemic exposure to a chemical; 4) it is a cell type with a relatively long life, and 5) it is an abundant tissue that does not require invasive methods to be obtained (44). In occupational or environmental exposure assessments, the most popular technique for CA characterization is FISH (41).

Micronuclei. Micronuclei (MN) are cytoplasmic chromosomes or chromosomal fragments that have been excluded from the nucleus of both daughter cells after cell division. Eventually, the omitted fragments or the whole chromosomes are enveloped by a nuclear membrane that resembles a small nucleus that can be observed by light microscopy (45). Two main mechanisms of MN induction have been defined: Chromosome breakage and disruption of the cell spindle during mitosis (44,45).

Different methodologies are available for MN assessment. Routine staining with May-Grünwald Giemsa or Papanicolaou's stain is suitable for identification of MNs, but DNA-specific stains such as Feulgen or acridine orange are more specific (45). These staining methods are routine procedures that can be performed and afforded by almost all laboratories but are laborious, and scoring may be tedious. The automation of MN scoring by flow cytometry and image analysis offers to increase the efficiency of the evaluation process (41). Recently, the most widespread technique for MN assays has been the cytokinesis-block MN assay (CBMN). CBMN evaluates chromosome abnormalities in dividing cultured cells (binucleated) after cell division has been blocked with cytochalasin-B, a cytokinesis inhibitor. Using this method, other parameters of DNA misrepair, telomere end fusions, DNA elimination or amplification can be measured along with the evaluation of cytostatic effects and cytotoxicity in the same assay (46).

CBMN can be combined with other tools such as *in situ* hybridization or immunostaining to provide more information about the origin of the MN and its content. The identification of a centromeric structure with antibodies against kinetochore proteins would indicate either the presence of one or more chromosomes in the MN or its origin by disruption of the spindle or other components during mitosis. Likewise, the detection of consensus repetitive centromeric sequences with pancentromeric probes allows the identification of whole or partial chromosomes in the MN. Moreover, the use of DNA probes directed against specific sequences provides clues about the specific chromosome contained in a MN (44,46).

Micronuclei assays can be performed in almost any cell, but the majority of surrogates come from the hematopoietic lineage (lymphocytes and erythrocytes) and bone marrow. From those, lymphocytes are the most widely used because

micronucleated erythrocytes are only obtained from splenectomized subjects; on the other hand, the use of bone marrow requires a very invasive method. Recently, some studies evaluated MN in exfoliated epithelial cells obtained from buccal, nasal, urothelial, vaginal or cervical mucosa (41,44,46). These surrogates are easy to collect and, as they are readily in contact with the genotoxic compounds, they are the most vulnerable cells for MN appearance (45).

Many agents and stimuli produce MN, such as pollutants, chemical drugs, radiation, infections, nutritional state and inflammation or even aging (45). The validation of the MN assay as a biomarker for cancer risk assessment remains to be established (44), but some preliminary data has found that MN frequency in lymphocytes is a good predictor for carcinogenesis (47). Despite its lower predictability of cancer, the MN assay was recently substituted for CA determination in studies of exposure to genotoxicants. MN analysis has been widely applied in environmental monitoring, and it is the second most preferred method (only after ³²P-postlabeling) to evaluate exposure to traffic pollution (25), as the assessment of PAHs is a popular issue (41). Moreover, Demetriou, *et al.*, suggested that there is some evidence of an association between MN and exposure to air pollutants (25).

Sister chromatid exchanges. The process whereby two sister chromatids break and rejoin during DNA replication, interchanging genetic material at homologous regions, is called sister chromatid exchanges (SCE) (44,48). This is a natural process in mammalian cells that is associated with DNA replication when the two chromatids are tightly joined by the centromere, and the mechanism underlying its formation involves a single-stranded break of DNA. During DNA synthesis, a replication fork is formed between the two parental and the nascent strands. When a gap is encountered in one of them, the replication fork is broken by a DNA repair mechanism, and a 3' single-stranded break forms. The replication fork is restored likely by HRR with the exchange of specific DNA regions between both chromatids (48).

SCE is microscopically analyzed using the thymidine analog 5-bromodeoxyuridine (BrdUrd). BrdUrd is added to the cell culture and incorporated during the first two rounds of DNA replication. During the first replication, each original DNA strand is duplicated with a daughter strand containing BrdUrd. During the second round, the original

DNA strand will be again duplicated with a BrdUrd-containing strand, but the other strand will be double labeled. Therefore, both sister chromatids can be visualized and distinguished with a staining procedure, such as fluorescence plus Giemsa staining, acridine orange followed by Giemsa staining, or with the use of anti-BrdUrd-labeling counter-stained with DAPI or propidium iodide (48-50). Exchanges are recognized by the interchange of physical regions from one chromatid to the other. The ease of analysis has made this assay popular for the assessment of the genotoxic potential of chemicals with the consequent generation of large SCE databases (44).

SCEs are evaluated in any cell that can be maintained in culture for two duplication cycles in the presence of BrdUrd (44), and by far, human peripheral blood lymphocytes are the cell type most widely used for this purpose. Although SCE assays have been extensively used for the determination of the genotoxicity of multiple compounds, some evidence suggests that it is not a reliable biomarker of cancer risk; nevertheless, it can be used as a valuable tool for the assessment of cytogenetic damage in exposed individuals, as well as a biomarker of exposure (44). The effect of ambient pollutants, such as exposure to traffic exhaust, has been assessed and reviewed previously (51).

Genetic biomarkers

Transcriptional regulation. The gene expression induction by diverse stimuli reflects the biological response of the cell to the stimulus. In the case of exposure to environmental pollutants, the transcriptional profile of a given cell or organism indicates the defense mechanisms activated, the minimal dose at which the effect is observed, and the time window of gene induction or repression, as well as the signaling pathways involved in the process. Therefore, the knowledge of the repertoire of genes transcribed under a given circumstance aid in the dissection of the mode of action of toxicants.

The available methodologies to assess gene expression profiles include high-throughput platforms, such as cDNA microarrays, and gene-specific methods, i.e., RT-PCR or Northern blots. Microarray analysis is, by far, the preferred methodology, and this procedure includes total RNA extraction and cDNA synthesis for microarray hybridization. Subsequently, the validation of the results is performed by real-time RT-PCR of specific genes of interest.

The transcript profile can be evaluated in multiple types of samples, with availability depending on the model of study. In the case of animal models, the transcriptome can be determined from any type of tissue or fluid, while in human studies, the use of surrogate tissues, such as peripheral blood lymphocytes (PBL) (52) or leukocytes (53), is preferred. Accordingly, Siravastava, *et al.*, noted that PBLs (54) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (55) are appropriate models to study the effect of diesel exhaust particles (DEP) in animal airways due to the similarities in gene expression patterns in comparison to lung tissue. However, human B lymphocytes (56), alveolar macrophages (57), and airway epithelium (58) have also been used in several reports. Another alternative is the use of cell lines, which serve as models of lung, liver, endothelium, epithelium, lymphocytes, etc.

The evaluation of the transcript levels of some xenobiotic-metabolizing enzymes is a valuable tool for the assessment of exposure to specific environmental pollutants. These biomarkers comprise phase I and II enzymes, such as members of the cytochrome P450 (CYP450) superfamily and conjugating enzymes. Phase I metabolism consists of a series of oxidative reactions that biotransform the parent compound into bioactive or detoxified metabolites. The transcriptional regulation of *CYP1A1* is a typical biomarker of exposure to PAHs that has been widely used in environmental biomonitoring (15). The induction of *CYP1A1* is initiated by the ligand binding to the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and its translocation into the nucleus. There, AhR forms a heterodimer with the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) and binds to xenobiotic response elements (XRE) located in the promoter region of target genes, including *CYP1A1*, *CYP1A2* and *CYP1B1*, promoting gene transcription (59).

CYP1A1 induction by exposure to PAHs, 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) has been used for the assessment of exposure to these compounds in several vertebrate models (60-62) and cell lines (61,63,64). Moreover, *CYP1A1* transcript upregulation has been described in various experimental models exposed to airborne PM (65), DEPs (54,55,66) and cigarette smoking (67-69). Alternatively, the *CYP1B1* transcription regulation is also postulated as a sensitive biomarker of ambient pollution (15) because increased mRNA levels have been documented in the presence of PAH mixtures

(63,64), BaP (61,63,70), TCDD (61,71), PM (72), DEPs (54,55,73,74) and tobacco smoking (58,68,69) as well.

Other phase I enzymes mostly reported to be upregulated at the transcriptional level by environmental toxicants are *CYP1A2* (55,75) and various aldo-keto reductases (AKR). AKRs are a family of soluble NAD(P)H oxidoreductases that catalyze the metabolisms of a wide range of compounds, such as PAHs, aldehydes and drugs. AKRs have been associated with exposure to tobacco smoke (52,58,68), quinones derived from diesel exhaust (DE) (76), BaP and TCDD (61,70).

On the other hand, phase II metabolism involves conjugation reactions to increase chemical hydrophilicity for ease of excretion and elimination of possible reactive metabolites. The phase II metabolizing enzymes comprise mainly transferases, including UDP-glucuronosyltransferases (UGT), sulfotransferases (SULT), *N*-acetyltransferases (NAT), and glutathione *S*-transferases (GST), among others (77). At the transcriptional level, the most inducible phase II genes by environmental pollutants are the *UGTs* (72,78) and *GSTs* (54,55,72,74). Other phase II enzymes, such as the NAD(P)H: Quinone oxidoreductase-1 (*NQO1*) and heme oxygenase-1 (*HO-1*) genes, are also upregulated by a wide range of airborne contaminants (55,56,58,61,69,72,74,79).

A master transcriptional regulator for the expression of antioxidant and phase II detoxifying genes is nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). Nrf2 is a transcription factor that recognizes specific DNA elements known as antioxidant response elements (ARE) located in the enhancer region of target genes, such as *GST* subunits *A*₁ and *A*₂, *NQO1*, *HO-1*, *UGTs* and others (80). As expected and associated with the upregulation of phase II enzyme transcription by atmospheric pollutants; also, Nrf2 is also robustly induced by these contaminants. Nrf2 transcriptional activity and expression is increased in the presence of airborne particulate matter (79), BaP and TCDD (61), and cigarette smoke (67). Moreover, it has been suggested that the mechanisms of Nrf2 activation by BaP in HepG2 cells depends on the metabolic transformation of the parent compound and subsequent ROS generation (unpublished data).

Additionally, the exposure to DE or ultrafine carbon particles (UFP) in experimental chambers has provided useful information about transcriptional activation in human volunteers. DE is a model

to study the effects of airborne particles, and the UFP are suggested as main causative agent of the adverse effects of airborne pollutants. Peripheral blood leukocytes are the human tissue of study due to their availability, their inflammatory response activation following PM exposure and their role as cell messengers from the site of entry of the pollutants to the rest of the organs (81,82). Human exposure to DE induced the activation of oxidative stress (82,83), inflammation (83), and the proteasome and coagulation cell pathways (82), as well as UFP-activated pathways associated with inflammation, growth factors, Nrf2-mediated oxidative stress and xenobiotic metabolism (81).

Somatic cell mutations. A somatic cell mutation is any change in the genomic DNA caused by internal factors, such as natural errors produced during replication or endogenous agents, or by the action of environmental mutagens (84). The index of mutations can be estimated via the study of reporter genes, and the most frequently used is the *HPRT* gene.

HPRT is an X-linked gene that encodes hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT), an enzyme involved in the phosphoribosylation of guanine and hypoxanthine as well as purine analogues, such as 6-thioguanine (TG), 6-mercaptopurine and 8-azaguanine, which require this metabolic step to exert their cytotoxic effects (85). Two different methods have been developed for the assessment of *in vivo HPRT* mutations, an auto-radiographic and a clonal assay.

The first method has time and cost advantages, but it is unable to detect the origin of the mutational phenotype of the cells. The cell model of study is T lymphocytes, which are cryopreserved, followed by stimulation for cell division with phytohemagglutinin (PHA) for ³H-thymidine incorporation in selection media containing TG. Only mutant cells (*HPRT*⁻) are able to incorporate ³H-thymidine and TG, while normal cells (*HPRT*⁺) are sensitive to TG and do not synthesize DNA. After the isolation of cellular nuclei, they are fixed and autoradiographed, and variant frequencies are scored (86).

On the other hand, the clonal assay allows the isolation, clonal expansion and characterization of the mutant cells. Isolated T lymphocytes are activated with PHA and seeded in microplates containing *HPRT*-deficient feeder cells (B-lymphoblastoid cells) in media supplemented with T cell growth factor in the presence or absence of TG. The cell density to be seeded in each plate depends on TG

supplementation; TG-containing wells receive a high cell density for the growth of rare *HPRT* cells (10^5 cells/well), but wells without TG will receive approximately one cell/well. Cells are incubated for 10-14 days and the colonies are characterized by either microscopy, ^3H -thymidine incorporation or cell expansion (86). Furthermore, TG-resistant cells may be assayed for HPRT enzymatic activity, expression of surface markers and for genomic DNA changes.

Accordingly, variant frequencies (VF, autoradiographic method) and mutant frequencies (MF, cloning assay) have been determined in different populations, and it has been determined that both parameters increase with the age of the individuals (86,87). Several exposure situations also increase the parameters of VF and MF in the *HPRT* gene, such as accidental irradiation, radiotherapy and chemotherapy (84). Smoking significantly increases VF and MF in active smokers compared with former or never smokers, and an association was found between cotinine levels and the number of smoked cigarettes in this VF (87,88); however, this association has not always been found (85). For instance, *in utero* exposure to cigarette smoke was not associated with an increased MF in newborns (89). However, the study of the *in utero* exposure to environmental pollutants in a highly polluted Polish city showed an increased level of DNA adducts in the fetus in correlation with an augmented MF, an association that was not found in the mothers (90). Similarly, the occupational exposure to DE did not show an increased MF in the *HPRT* gene in bus mechanic maintenance workers, but there was a correlation between MF and adduct levels in the most heavily exposed individuals (91). The exposure to moderate and low environmental pollution, as well as the occupational exposure to PAHs, however, did not reflect a statistical association with *HPRT* MF (92). Consequently, *HPRT* mutation frequency is not considered a sensitive biomarker of exposure to genotoxicants, but it can be valuable in chemoprevention programs for individuals with a known exposure risk (85).

Epigenetic biomarkers. Epigenetics is the study of hereditary gene expression modifications that do not involve a DNA sequence change (93). Three main mechanisms of epigenetic control in mammalian cells have been described: 1) DNA methylation, 2) histone modifications, and 3) microRNA (miRNAs). It is well established that many environmental factors are able to modify the epigenome of an organism as an adaptive response. These

epigenomic modifications are persistent and, in some cases, impact future generations. Therefore, the epigenomic “imprinting” of an organism reflects its previous exposure to a given contaminant and its response capacity to environmental stressors (94).

There are some challenges for epigenetic investigations that studies need to overcome to draw confident conclusions. The main limitation in the study of environmental epigenetics is that modifications in the epigenome may be negligible but cumulative, and their manifestation could be evident only after a considerable period of time (95,96). However, the number of publications in environmental epigenetics is constantly growing but lags far behind in comparison with cancer epigenetics, for instance (97). The second challenge is the accessibility of the appropriate target tissue or even the cell type. It is well known that genomic DNA is practically identical in any cell type of an organism, but the epigenomic profile of each cell may be unique and constantly changing (97,98). Therefore, the precise selection of a target or a surrogate tissue, its availability, and even the separation and classification of specific cell types may be crucial for the success of the study.

DNA methylation. DNA methylation consists of the addition of a methyl group to the fifth carbon of a cytosine residue present in regions enriched with the dinucleotide CpG, known as “CpG islands”. This process is catalyzed by DNA methyltransferases (DNMT), enzymes that are either constitutively active (DNMT1) or inducible (DNMT3A and 3B). Some CpG islands are located in the promoter region of protein-coding genes, and their hypermethylation is generally associated with gene transcription suppression. Nevertheless, most of the CpG dinucleotides (90%) are located in repetitive transposable elements that are generally heavily methylated (99). DNA methylation is associated with natural processes, such as DNA imprinting, chromosome stability and X-chromosome inactivation, but in aberrant situations, it is associated with cancer and the silencing of tumor suppressor genes (100).

The evaluation of DNA methylation is possible from many different biological samples, such as urine, plasma, sputum, lymphocytes, buccal cells, saliva, and tissues (96), and some technological advances have been developed for the analysis of DNA methylation from very small amounts of a sample. Nevertheless, there is some debate about the usefulness of surrogate tissues, such as peripheral

blood, in the study of epigenetic modifications in target tissues (98). Several approaches are available for the study of gene-specific or genome-wide analysis of DNA methylation status. In the first type of procedures, the most popular method consists of the conversion of unmethylated cytosines to uracils using sodium bisulfite, leaving the methylated residues without any change. This technique is followed by different approaches to identify the specific methylated DNA region. PCR amplification with specific primers directed to the methylated DNA sequence, called methylation-specific PCR (MSP); combined bisulfite conversion restriction analysis (COBRA) that identifies restriction enzyme sites that have been preserved or lost after bisulfite conversion, and DNA sequencing by the Sanger method or pyrosequencing are some methodologies used for the identification of specific DNA-methylated regions (96,101).

Some methods for the identification of global DNA methylation content are high performance capillary electrophoresis (HPCE) and HPLC-MS after DNA digestion to single oligonucleotides (96,101). The evaluation of methylation levels of transposable highly repetitive sequences in DNA is another method to estimate genome-wide methylation levels. The multiple repetition elements Alu and LINE-1 (long interspersed nuclear element-1) are two well-characterized elements that normally are heavily methylated, and any decrease in their methylation degree indicates a change in the whole-genome methylation status (99). Likewise, different genome-wide methylation platforms are based on microarrays and combine different technologies, such as immunoprecipitation of 5-methylcytosine with specific antibodies (methylated DNA immunoprecipitation or MeDIP), methylation-sensitive restriction enzymes and PCR amplification, bisulfite treatment coupled with hybridization to microarrays, and sequencing, among others.

The modification of the DNA methylation profile in individuals exposed to environmental contaminants is the most studied epigenetic modification due to the relative stability of methylation, to the multiple technical approaches that are available for its study (98) and to the feasibility to preserve DNA samples in comparison to chromatin and RNA (97). Metals such as nickel, cadmium, lead and arsenic are recognized for their capacity to alter the methylation profile of DNA (102). Ambient air pollution is associated with the hypermethylation of the forkhead box transcription factor 3 (*FOXP3*)

and is involved in asthma pathogenesis (103,104); specifically, the exposure to particulate matter (PM 2.5), black carbon and sulfates produces global DNA hypomethylation (assessed by methylation levels of ALU and/or LINE1) (105,106) as well as aberrant methylation levels in the promoter of the inducible nitric oxide synthase (*iNOS*) (107-109). In mouse models acutely exposed to inhaled DEP or particulate air pollution, hypermethylation of different CpGs in the interferon gamma (IFN- γ) promoter and hypomethylation at one CpG island in the interleukin (*IL*)-4 promoter (110), as well as persistent hypermethylation of sperm DNA (111), were found, respectively.

The exposure to PAHs is also related to an increase in global methylation levels of DNA, to the hypermethylation of cytokine *IL-6* and to *p53* hypomethylation in coke-oven workers (112). In neonates, PAH exposure induces the hypermethylation of 5'-CpG islands of acyl-CoA synthetase long-chain family member 3 (*ACSL3*) (113) and IFN- γ (114) in white blood cells extracted from the umbilical cord. In firefighters, the level of dual specificity phosphatase 22 (*DUSP22*) promoter methylation decreases in relation to the years of service, an effect that is reproduced with BaP at low doses (115).

Histone modifications. The post-translational modification of the amino-terminal tail domains of histones is another important mechanism of epigenetic regulation. Histones are globular proteins that fold, organize and compact DNA in structural units called nucleosomes that form chromatin. The nucleosome is a histone octamer consisting of one H3-H4 tetramer and two H2A-H2B dimers, and the histone H1 acts as a linker (116).

Several mechanisms regulate histone function, and these proteins are highly dynamic actors in gene regulation. Histone modifications comprise methylation, acetylation, phosphorylation, ubiquitination, sumoylation, citrullination and ADP-ribosylation (95); enzymes such as histone acetyltransferases (HAT), deacetylases (HDAC), methyltransferases, and demethylases are involved in these processes. The methylation, acetylation and phosphorylation status of specific amino-terminal tail domains of histones defines chromatin structure and gene expression. In general terms, histone hyperacetylation is associated with loosely packed chromatin or euchromatin and gene transcription. On the other hand, hypoacetylated and hypermethylated histones generate condensed

chromatin or heterochromatin and are associated with methylated DNA and transcriptional silencing (101,116). Nevertheless, the “histone code hypothesis” indicates that specific histone modification patterns, present at specific residues, determine the overall activation or repression of gene transcription (116).

Several histone modifications have been analyzed in cell lines (117-119) and peripheral mononuclear cells (120), blood leukocytes (121) and respiratory epithelia (122) from different human populations. The methodologies applied for these studies include genome-wide and gene-specific approaches. The most accurate method for the identification of histone modifications is MS, but the combination of other methods such as HPLC, HPCE or Western blotting can also be applied to identify histone modifications globally (101). Recently, ELISA kits have been developed and are being used for the analysis of specific histone modifications (120,121). The most popular current method for the study of single gene-associated histone modifications is chromatin immunoprecipitation (ChIP) (117-119,122) that uses specific antibodies against histone chemical markers and a primer-specific PCR for a candidate gene. For the genome-wide study of histone modifications, ChIP-on-chip is a platform that allows the detection of patterns of histone modifications and combines the use of antibodies against histone modifications with a DNA array (101).

There is strong evidence that environmental factors lead to histone modification changes and, therefore, to gene transcription modulation. The most studied environmental stressors that modify histone patterns in different models are metals such as nickel, cobalt, arsenic and chromium. For instance, nickel is associated with many histone modifications in H2, H3 and H4 by methylation, acetylation, phosphorylation and ubiquitination, whereas arsenic is related to methylation modifications in H3 and acetylation in H4, and, finally, chromium and cobalt are associated with H3 methylation at different lysine residues. In a Chinese population occupationally exposed to nickel, elevated levels of H3K4me3 (histone 3, lysine 4 trimethylation) and reduced H3K9me2 (histone 3, lysine 9 dimethylation) were found in blood mononuclear cells (120). Moreover, in peripheral blood leukocytes from steel workers exposed to PM enriched in metal particles, two histone modifications associated with open actively transcribed chromatin, H3K4me2 (histone 3, lysine 4 dimethylation) and H3K9ac (histone 3, lysine 9

acetylation), were increased and correlated with the years of service (121). With respect to some environmental pollutants, DE particulate matter caused an overregulation of the pro-inflammatory mediator cyclooxygenase-2 (COX-2) via the hyperacetylation of histone H4 and recruitment of p300 HAT to the COX2 promoter and degradation of HDAC1 in a human bronchial epithelial cell line (BEAS-2B) (117). In addition, in A549 cells, PM10 exposure increased the levels of the pro-inflammatory cytokine IL-8 via an increase in H4 acetylation of the *IL-8* promoter region (118). Additionally, BaP and cigarette smoke condensate (CSC) exposures were associated with an increase in the transcriptionally active H3K4me3 and H3K9ac chromatin indicators in HeLa cells and normal human respiratory epithelia, respectively (119,122).

MicroRNAs. MicroRNAs (miRNAs) are short non-protein coding single-stranded RNAs that interfere with the translation of complementary mRNAs or induce their degradation (95). miRNAs are transcribed by RNA polymerase II as primary miRNAs (pri-miRNAs) containing a 5'-capping and a 3'-polyadenylation tail. In the nucleus, the pri-miRNA is processed by RNase III Drosha/DGCR8 into a precursor miRNA (pre-miRNA), which is then exported to the cytoplasm by exporting 5/RAN-GTP. The RNase III Dicer complex processes the pre-miRNA into a mature single-stranded miRNA of approximately 20 nucleotides in length, which is incorporated into the RISC (RNA-induced silencing complex). Mature miRNAs regulate mRNAs expression by two different mechanisms according to its complete or incomplete complementarity to the target mRNA. The complete complementarity leads to the degradation of the target mRNA; on the other hand, incomplete complementarity leads to translation inhibition (100).

The evaluation of miRNA levels as a molecular biomarker has many advantages:

- 1) miRNAs are considered less complex compared to proteins;
- 2) they do not accumulate modifications after their processing;
- 3) different molecular tools are available for their isolation, and
- 4) they can be easily and sensitively detected by PCR-based technologies.

Nevertheless, there are still some challenges to overcome before miRNAs can be used as good biomarkers of exposure. For instance, the technical

procedure should be standardized in terms of sample storage, collection and transportation, as well as miRNA extraction, detection, normalization, reproducibility, validation and analysis (123,124). The identification of miRNA targets is another limitation that has to be overcome to elucidate the biological function of specific miRNAs (124). According to their mechanisms of action, each miRNA may present incomplete complementarity with several target mRNAs and therefore regulate the expression of numerous transcripts and *vice versa*, as one mRNA can be modulated by many miRNAs. The available tools for the identification of potential miRNA targets comprise computational and experimental approaches (124).

The most widely used technique for miRNA detection is the miRNA microarray for genome-wide screening and real-time PCR for gene-specific approaches, but sequencing is also being used, albeit less frequently. miRNAs have been assessed in cell lines (125), human primary cell cultures (126-128), human peripheral blood leukocytes (129), tissues (122,130,131) and different body fluids (123,132,133). The latter surrogate samples have been widely used in oncology studies due to miRNA localization in microparticles and exosomes that confer high stability (123). Accordingly, serum, plasma, urine, amniotic fluid, and sputum, among others, can be used for miRNA analysis.

Some studies have highlighted the sensitivity of miRNAs to respond against environmental insults and their usefulness as powerful biomarkers of exposure and for biomonitoring and prevention. miRNA expression has been linked to exposure to environmental stressors, and altered miRNA levels have been associated with exposure to ambient particulate matter (127), DE and DEP (126,127), metals (129,133), cigarette smoke (122,125,134), asbestos (128), carbon black nanoparticles (131), ozone (132) and others.

Metals such as arsenic, cadmium, aluminum and lead alter miRNA expression (124,129). For instance, exposure to residual oil fly ash (ROFA), a fine particle product from oil combustion containing transition metals such as Ni, V and Fe, elicited cardiac dysfunction and altered miRNA expression levels in hypertensive rats (130). The study performed by Bollati, *et al.* (2010), in peripheral blood leukocytes from a population of steel workers exposed to metal-rich particulate matter also identified overexpression of two miRNAs related to oxidative stress and inflammation regulation

(miR-222 and miR-21) in exposed individuals. Furthermore, the expression of miR-222 was directly correlated with exposure to lead, and miR-146a expression was inversely correlated with lead and cadmium (129). Other upregulated miRNAs in workers exposed to metal-rich PM were miR-421, miR-146a, miR-29a and let-7g (133).

DE particles, likewise, were associated with the modification in expression levels of 197 out of 313 miRNAs identified in human airway epithelial cells, some of which are associated with the inflammatory response and tumorigenic processes (126). Human microRNA-375 is one of the miRNAs upregulated following exposure to DEP and ambient PM and possibly regulates the expression of the AhR receptor (127). Furthermore, BaP exposure upregulated the expression of miR-320 and miR-494 and was associated with cell cycle progression and tumorigenesis in murine bronchial epithelial cells (135); however, the *in vivo* BaP exposure does not significantly modify hepatic miRNA expression regardless of marked changes in mRNA transcription in mice (136). Other environmental pollutants, such as hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX), caused modulation of several miRNAs associated with cancer and tumor suppression in mouse brain and liver (137).

Susceptibility biomarkers

It is well documented that the development of adverse health effects by exposure to different environmental factors is determined by the susceptibility of each individual. These susceptibility factors are cataloged as genetic predisposition, age, gender and ethnicity (138). The balance between exposure time and dose with susceptibility factors determines individual biological response and the risk for disease development.

In terms of the influence of chemical pollutants on human health, the participation of genes encoding metabolic or detoxification enzymes plays a key role in the genetic susceptibility to xenobiotics; however, genes associated with DNA damage repair likewise predispose individuals to a susceptibility phenotype against toxicological insults. The biomarkers of susceptibility most frequently used are the genetic polymorphisms located in metabolic genes associated with phase I and II metabolizing enzymes.

Genetic polymorphisms

Genetic polymorphisms are natural occurring variations in DNA sequence with a frequency equal to or higher than 1% in the general population

(139). A polymorphism may be located in coding or non-coding sequence, and they might be “silent” or “functional” if the polymorphism impacts the activity, stability and/or expression levels of a protein. Some of the effects of a polymorphism in the expression of a gene are: 1) Amino acid substitution, 2) duplication, 3) deletion, 4) protein variants, 5) modulation of the expression levels, and 6) modification of RNA splicing and stability (139).

Single nucleotide polymorphisms (SNP) are a case in point and consist of the substitution of a single base pair, resulting in variants of the same gene or alternative alleles (140). SNPs are the most frequent type of polymorphisms in humans, accounting for approximately 90% of them (140). SNP identification is possible from different human samples, and venous blood is the tissue sample of choice; however, specific blood cell populations are used, for example leukocytes (141,142), lymphocytes (143-145) and the mononuclear fraction (146), and tissues such as placenta (20), or even buccal cells (147,148) are also appropriate for genotyping. Several methods have been developed for their identification, with DNA sequencing being the gold standard (149). The most common method for SNP analysis uses restriction endonucleases in cases where the polymorphism creates or destroys a specific nucleotide recognition sequence for a restriction enzyme (restriction fragment length polymorphism or RFLP). Other useful methods are real-time PCR using TaqMan probes (13,148,150), and primer extension-based methods (145,151,152) (table 3).

SNPs are the polymorphisms most widely studied in terms of genetic susceptibility to environmental pollutants (table 4). The study of genetic polymorphisms present in enzymes associated with the biotransformation of toxicants has provided relevant susceptibility biomarkers in toxicology (153). The cytochrome P450 enzymes are the primary

proteins involved in phase I metabolism, and some members of this family are highly polymorphic. For instance, CYP2B6 is one the most polymorphic CYP members, with 102 allelic variants identified so far (15). Because CYPs are the first enzymatic barrier that responds to a xenobiotic exposure in the organisms, the study of genetic variations that may impact CYP expression levels, function and efficiency is crucial for the identification of individuals with altered enzymatic activity that may be predisposed to adverse health effects in the presence of environmental stressors.

Phase I enzymes. CYP1A1 polymorphisms are the most studied variants in terms of human genetic susceptibility (15). The variant CYP1A1*2A (T3801C) in the 3' non-coding region, which generates an *Msp1* restriction site, has been linked to a variety of outcomes related to exposure to different types of environmental pollutants. The presence of this polymorphism is associated with an increased urinary 1-OHP concentration related to air pollution (12), PAH exposure (10) and light tobacco consumption (154). Individuals carrying the CYP1A1*2A allele are predisposed to higher DNA adduct levels and an increased percent of aberrant cells when exposed to environmental tobacco smoke (ETS) (144). Likewise, in an Asian population, the presence of the *Msp1* polymorphism correlated with reduced birth weight following high PM10 exposure (155), oral cancer risk associated with tobacco smoking and chronic obstructive pulmonary disease (156).

Additionally, the variant CYP1A1*2B or 2C (A2455G), which has an amino acid substitution of Ile462 to Val in exon 7, has been associated with higher 1-OHP (9,12,13), 2-NT (9), DNA damage (13) and PAH-DNA adducts (157) in high PAH or tobacco smoking populations, as well as reduced birth weight in pregnant women exposed to high PM10 levels (155). The interaction of smoking or

Table 3. Susceptibility biomarkers. Environmental compounds associated with genetic polymorphisms, techniques used for polymorphism analysis and surrogate tissues for analysis

Susceptibility biomarkers			
	Environmental compounds	Methods for identification	Types of samples
Polymorphisms	PAH	DNA sequencing	Venous blood
	Tobacco smoke	RFLP	Lymphocytes
	High PM exposure	Real time PCR-TaqMan	Leukocytes
		DNA microarrays	Placenta
		Primer extension-base technologies	Buccal cells

PAH: polycyclic aromatic hydrocarbons; PCR: polymerase chain reaction; PM: particulate matter; RFLP: restriction fragment length polymorphism

Table 4. Selected polymorphisms and associated health risk

Polymorphism	Associated health damage
Phase I enzymes <i>CYP1A1*2A</i> (T3801C, MspI)	Increased PAH metabolites, PAH-DNA adducts and percent of aberrant cells Reduced birth weight Chronic obstructive pulmonary disease Oral cancer risk
<i>CYP1A1*2B</i> (A2455G, I462V)	Increased PAH metabolites, PAH-DNA adducts and DNA damage Reduced birth weight Cervical and lung cancer risk
<i>CYP2E1</i> (RsaI)	Increased PAH metabolites and DNA adduct levels
<i>EPHX1</i> (T8668C, Y113H)	Increased PAH metabolites (HH homozygotes)
<i>EPHX1</i> (A15543G, H139R)	Increased DNA adduct levels (HH homozygotes, WT)
<i>AKR1C3*2</i> (Gln5His)	Lung cancer risk
Phase II enzymes	
<i>NAT2</i> rapid acetylators	Increased oxidative DNA damage Lung and breast cancer risk
<i>NAT2</i> slow acetylators	Increased PAH metabolites and DNA adduct levels Bladder, urothelial and breast cancer risk
<i>GSTM1</i> null	Increased PAH metabolites, DNA adduct and higher oxidative DNA damage Preterm delivery Lung cancer risk
<i>GSTT1</i> null	Acute leukemia Coronary artery disease Lung cancer risk
<i>GSTP1</i> (C3517T, A114V)	Increased PAH metabolites
DNA repair genes	
<i>XRCC1</i> R339Q	Malignant mesothelioma (asbestos exposure)
<i>ERCC1</i> N118N	
<i>XRCC3</i> T241M	
<i>OGG1</i> S326C	Higher oxidative DNA damage Lung cancer risk
<i>XPB23</i> K751Q	Higher levels of DNA breaks
<i>XPC</i> (PAT +)	Higher DNA adduct levels

AKR: aldo-keto reductase; *EPHX*: epoxide hydrolase; *ERCC*: excision repair cross-complementing; *GST*: glutathione S-transferase; *NAT*: N-acetyltransferase; *OGG1*: 8-oxo-guanine-DNA glycosylase/AP lyase; PAH: polycyclic aromatic hydrocarbons; *XPC* (PAT+): *Xeroderma pigmentosum-C* *polyAT* insertion of 83 bp in intron 9; *XPB23*: exon 23 variant of the *Xeroderma pigmentosum-D*; *XRCC*: X-Ray cross-complementing

ETS with the *CYP1A1* (Ile462Val) polymorphisms and their association with adverse health effects is controversial. Because, while cervical cancer development has shown a significant association (142), others like lung cancer (150) and asthma development in children (158) did not. Both variants, *CYP1A1*2A* and *CYP1A1*2B*, have been associated with a higher enzymatic induction and/or enhanced catalytic activity and are correlated with an increased risk of several types of cancer; therefore, these polymorphisms are useful susceptibility biomarkers for PAH exposure and carcinogenesis (15).

In addition, other family members of the CYP450s have been reported as polymorphic and have shown interactions with environmental pollutants. Among them, *CYP2E1*, a cytochrome associated with the metabolism of alcohol, acetone, benzene,

toluene, styrene and nitrosamines, has at least 34 variants (159). The *CYP2E1* *RsaI* polymorphism is associated with increased urinary levels of 1- and 2-NTs (14,160), and 1-OHP (14), as well as with higher DNA adduct levels in human lung tissue (161) from PAH-exposed individuals. Nevertheless, some studies did not find a correlation of this polymorphism with increased PAH metabolic products (9,16,162).

Other phase I polymorphic enzymes relevant to environmental toxicant metabolism are epoxide hydrolase 1 (*EPHX1*) and *AKRs*. *EPHX1*, which encodes a protein that catalyzes the addition of water to epoxides for their detoxification, presents two polymorphic variants, T8668C (Y113H) and A15543G (H139R). The former polymorphism has been associated with high OHP urinary levels, whereas the latter was associated with low

OHPhe levels in German workers exposed to PAH in homozygous carriers (143). Accordingly, the lower levels of PAH metabolites observed in the homozygous 139RR mutant can be correlated with the higher DNA adducts levels observed in lymphocytes from EPHX1 139HH (WT) individuals (163).

From the AKR family, the variant *AKR1C3**2 (Gln5His) has been associated with increased lung cancer susceptibility in a Chinese population exposed to PAH-rich smoky coals (164); nevertheless, there was an inverse correlation between this polymorphism and bladder cancer risk in Caucasians (165) and no relation with mRNA levels of different AKRs (*AKR1A1*, *AKR1C1-AKR1C3*) in smokers (52).

Phase II enzymes. NATs (NAT1 and NAT2), the key enzymes in the conjugation of arylamine compounds, display a high inter-individual variability in their capability to acetylate certain drugs, leading to the classification of individuals as fast, slow and intermediate “metabolizers” (77,166). Thirty-six *NAT2* polymorphic variants have been described in humans (166). *NAT2**4, the wild-type allele, is the fast acetylation variant, although variants such as *NAT2**12 and *NAT2**13 are also associated with the rapid acetylator phenotype in some populations. Several alleles are associated with the slow acetylator phenotype, and the most common ones are *NAT2**5, *NAT2**6, *NAT2**7 and *NAT2**14, which contain one or more of the G191A, T341C, A434C and G590A polymorphisms (166). The slow acetylator genotype has been associated with a higher risk of bladder cancer by exposure to arylamine pollutants from tobacco smoke, occupational exposure to benzidine-based dyes, or by alcohol intake; higher risk of urothelial cancer of the renal pelvis in dinitrotoluene-exposed workers; and an increased risk of breast cancer in postmenopausal smoking women and in non-smoker women exposed to ETS for long periods (148,153,166). Likewise, the *NAT2* slow genotype has been associated with higher DNA adduct levels (21) and higher urinary PAH metabolites (167) in occupational and non-occupational PAH-exposed populations. On the other hand, the *NAT2* fast acetylator genotype was associated with higher 8-OHdG levels by tobacco smoking and PAH exposure (16) and predisposed carriers to lung cancer (168) and breast cancer in the case of long-time heavy smoker women (148). *NAT1* allelic variants have also been described (26 alleles in humans), but their functional effects have been

less studied; nevertheless, the variant *NAT1**10 (associated with a fast acetylation phenotype) was related to an increased risk of bladder cancer in smokers (166).

Different classes of GST polymorphisms are associated with increased levels of health risks according to the modification of several biomarkers of exposure and effect to environmental pollutants. From them, the *GSTM* polymorphism *GSTM1**0, which results in a deleted allele of high prevalence between populations, is associated with higher levels of urinary 1-OHP (8,13), 1- and 2-NT (14,160), 8-OHdG (169-171) and DNA adduct levels (17,20,167,172,173). Moreover, it is considered a risk factor for preterm delivery in association with exposure to PM10 (174). Conversely, the *GSTT* null mutant is neither associated with increased urinary 1-OHP levels (12,13) nor higher urinary 8-OHdG (169) or DNA adduct concentrations (163), but it has been linked to a higher predisposition for acute leukemia in Chinese children living in proximity to industrial plants (151) and coronary artery disease in smokers (141). As for the *GSTP* polymorphisms, the A2627G genotype (I105V) is related to an increase (162) or decrease in the urinary 1-OHP levels (12) in occupational exposed workers. Notwithstanding, the genotype *GSTP1* C5317T (A114V) was related to higher urinary 1-OHP and OHPhe in German workers with high PAH exposures (143).

DNA repair gene polymorphisms. Polymorphisms present in DNA repair genes are also considered variability factors that predispose individuals to health outcomes in high-risk situations of toxicological exposure. High asbestos pollution, for instance, is associated with malignant mesothelioma, and the individuals who carry the variants 399Q of *XRCC1*, N118N of *ERCC1* and 241T of *XRCC3* are at increased risk for disease development (145,152). Other DNA repair gene polymorphic variants reported as susceptibility factors are: 8-oxo-guanine-DNA glycosylase/AP lyase (*hOGG1*) 326C, that correlates with higher oxidative DNA damage in bus drivers exposed to PAHs and volatile compounds (146) and with increased risk for lung cancer by indoor PAH exposure (164); exon 23 variant of the *Xeroderma pigmentosum-D* (*XPB*) A35931C Lys751Gln, that induces higher levels of DNA strand breaks in the aforementioned population (146), and *Xeroderma pigmentosum-C* (*XPC*) *polyAT* insertion of 83 bp in intron 9 (*PAT+*), that associates with higher anti-BPDE-DNA adducts under low (172) and high levels of PAH exposure (173).

Gene-gene interactions. Finally, multiple gene-gene interactions with environmental pollutants have been observed in individuals carrying more than one polymorphism, leading to an extremely complex scenario of genetic susceptibility. Genetic interactions are observed with the *CYP1A1*2A* (*MspI*) polymorphism and a variety of phase II enzymes. The interaction of the *CYP1A1*2* polymorphism with the *GSTM1* null, *GSTP1* (Ile/Val) and the *EPHX* "slow" variants results in higher DNA adduct levels (24,163). The combination of the *GSTM1* null with the *NAT2* slow acetylator genotype correlates with higher urinary PAH metabolites (167) as well as increased CAs (175) in individuals exposed to rich PAH environments. Likewise, an increased risk for lung and breast cancer has been found in individuals carrying the *GSTM1* null, *GSTT1* null and the *NAT2* rapid acetylator genotypes (176,177).

Conclusion

In the present review, we summarized the main and extensively used molecular biomarkers applied to environmental monitoring for human risk assessment. Some of them are highly associated with the exposure condition, while others are not statistically significant or display contradictory results. Despite the presence of some discrepancies, there is cumulative evidence that environmental pollution indeed affects several molecular markers, including all three biomarker types: exposure, effect and susceptibility (table 1).

The usefulness of biomarkers is of great importance for studies on risk evaluation and impact to health because they provide a platform to offer solutions leading to the amelioration of contamination and the adverse effects that pollutants produce. Equally important is to bear in mind that the response will depend on an individual's genetic background, thus the study of polymorphisms in human populations will also become useful for accurate interpretations. However, some of the issues remain to be discussed in depth, such as the selection of the most appropriate surrogate tissues for the study to produce reliable results with the least invasive methods for sample collection.

As peripheral blood is the surrogate of choice for most analyses, the acquisition of precise and correct results is still debatable, as blood is neither the first contact organ with xenobiotics nor the location of pollutant metabolism. Therefore, the exploration of new surrogate types of cells or tissues should consider the collection methods. The study

design should also take into account the size of the sample required, its susceptibility to cancer and the interaction of the surrogate with the xenobiotic or its metabolites.

Therefore, with the development of new technologies and the discovery of novel biomarkers, risk assessment evaluation of pollutant exposure should comprise a set of biomarkers that includes diverse aspects of the individual's toxicological response to integrate the data to dissect the mechanisms of action of xenobiotics and target organs and to predict adverse health effects.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Funding

This work was supported by a grant from the *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACyT), México, reference number 162391.

References

1. **Gil F, Pla A.** Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *J Appl Toxicol.* 2001;21:245-55. <http://dx.doi.org/10.1002/jat.769>
2. **Ramazzini B.** Las enfermedades de los trabajadores: "De morbis artificum diatriba". Obra completa, Bernardino Ramazzini. Tomo II. México: Miguel Ángel Porrúa; 2012. p. 373.
3. **Owen R, Galloway TS, Hagger JA, Jones MB, Depledge MH.** Biomarkers and environmental risk assessment: Guiding principles from the human health field. *Mar Pollut Bull.* 2008;56:613-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.01.022>
4. **Timbrell JA.** Biomarkers in toxicology. *Toxicology.* 1998;129: 1-12. [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X\(98\)00058-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X(98)00058-4)
5. **Castano-Vinyals G, D'Errico A, Malats N, Kogevinas M.** Biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental air pollution. *Occup Environ Med.* 2004;61:e12. <http://dx.doi.org/10.1136/oem.2003.008375>
6. **Castorena-Torres F, Mendoza-Cantu A, de León MB, Cisneros B, Zapata-Pérez O, López-Carrillo L, et al.** CYP1A2 phenotype and genotype in a population from the Carboniferous Region of Coahuila, México. *Toxicol Lett.* 2005;156:331-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.12.005>
7. **do Vale Bosso RM, Amorim LM, Andrade SJ, Rossini A, de Marchi MR, de León AP, et al.** Effects of genetic polymorphisms CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1 on urinary 1-hydroxypyrene levels in sugarcane workers. *Sci Total Environ.* 2006;370:382-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.07.025>
8. **Zare M, Shahtaheri SJ, Mehdipur P, Abedinejad M, Zare S.** The influence of CYP1A1 and GSTM1 polymorphism on the concentration of urinary 1-hydroxypyrene in cPAHs exposed Iranian anode plant workers. *Mol Cell Toxicol.* 2013;9:303-9. <http://dx.doi.org/10.1007/S13273-013-0038-8>

9. **Lee CY, Lee JY, Kang JW, Kim H.** Effects of genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, and GSTT1 on the urinary levels of 1-hydroxypyrene and 2-naphthol in aircraft maintenance workers. *Toxicol Lett.* 2001;123:115-24. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00374-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00374-5)
10. **Chuang CY, Chang CC.** Urinary 1-hydroxypyrene level relative to vehicle exhaust exposure mediated by metabolic enzyme polymorphisms. *J Occup Health.* 2007;49:140-51. <http://dx.doi.org/10.1539/joh.49.140>
11. **Ruchirawat M, Navasumrit P, Settachan D, Tuntaviroon J, Buthbumrung N, Sharma S.** Measurement of genotoxic air pollutant exposures in street vendors and school children in and near Bangkok. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;206:207-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2004.11.025>
12. **Petchpoung K, Kaojarern S, Yoovathaworn K, Sura T, Sirivarasai J.** The influence of metabolic gene polymorphisms on urinary 1-hydroxypyrene concentration in Thai bus drivers. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2011;31:160-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2010.10.006>
13. **Sánchez-Guerra M, Pelallo-Martínez N, Díaz-Barriga F, Rothenberg SJ, Hernández-Cadena L, Faugeron S, et al.** Environmental polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and DNA damage in Mexican children. *Mutat Res.* 2012;742:66-71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.12.006>
14. **Nan HM, Kim H, Lim HS, Choi JK, Kawamoto T, Kang JW, et al.** Effects of occupation, lifestyle and genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1 and GSTT1 on urinary 1-hydroxypyrene and 2-naphthol concentrations. *Carcinogenesis.* 2001;22:787-93. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/22.5.787>
15. **Yi B, Yang JY, Yang M.** Past and future applications of CYP450-genetic polymorphisms for biomonitoring of environmental toxicants. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2007;25:353-77. <http://dx.doi.org/10.1080/10590500701704037>
16. **Kim YD, Lee CH, Nan HM, Kang JW, Kim H.** Effects of genetic polymorphisms in metabolic enzymes on the relationships between 8-hydroxydeoxyguanosine levels in human leukocytes and urinary 1-hydroxypyrene and 2-naphthol concentrations. *J Occup Health.* 2003;45:160-7. <http://dx.doi.org/10.1539/joh.45.160>
17. **Viezzler C, Norppa H, Clonfero E, Gabbani G, Mastrangelo G, Hirvonen A, et al.** Influence of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and EPHX gene polymorphisms on DNA adduct level and HPRT mutant frequency in coke-oven workers. *Mutat Res.* 1999;431:259-69. [http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00169-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00169-4)
18. **Sturla SJ.** DNA adduct profiles: Chemical approaches to addressing the biological impact of DNA damage from small molecules. *Curr Opin Chem Biol.* 2007;11:293-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.05.021>
19. **Poirier MC.** Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:630-7. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1410>
20. **Topinka J, Binkova B, Mrackova G, Stavkova Z, Peterka V, Benes I, et al.** Influence of GSTM1 and NAT2 genotypes on placental DNA adducts in an environmentally exposed population. *Environ Mol Mutagen.* 1997;30:184-95. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1997\)30:2<184::AID-EM11>3.0.CO;2-9](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1997)30:2<184::AID-EM11>3.0.CO;2-9)
21. **Binkova B, Topinka J, Mrackova G, Gajdosova D, Vidova P, Stavkova Z, et al.** Coke oven workers study: The effect of exposure and GSTM1 and NAT2 genotypes on DNA adduct levels in white blood cells and lymphocytes as determined by 32P-postlabelling. *Mutat Res.* 1998;416:67-84. [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718\(98\)00061-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00061-8)
22. **Piipari R, Savela K, Nurminen T, Hukkanen J, Raunio H, Hakkola J, et al.** Expression of CYP1A1, CYP1B1 and CYP3A, and polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct formation in bronchoalveolar macrophages of smokers and non-smokers. *Int J Cancer.* 2000;86:610-6. [http://dx.doi.org/10.1002/\(Sici\)1097-0215\(20000601\)86:5<610::Aid-ljc2>3.0.Co;2-M](http://dx.doi.org/10.1002/(Sici)1097-0215(20000601)86:5<610::Aid-ljc2>3.0.Co;2-M)
23. **Binkova B, Chvatalova I, Lnenickova Z, Milcova A, Tulupova E, Farmer PB, et al.** PAH-DNA adducts in environmentally exposed population in relation to metabolic and DNA repair gene polymorphisms. *Mutat Res.* 2007;620:49-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.02.022>
24. **Topinka J, Sevastyanova O, Binkova B, Chvatalova I, Milcova A, Lnenickova Z, et al.** Biomarkers of air pollution exposure - a study of policemen in Prague. *Mutat Res.* 2007;624:9-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.02.032>
25. **Demetriou CA, Raaschou-Nielsen O, Loft S, Moller P, Vermeulen R, Palli D, et al.** Biomarkers of ambient air pollution and lung cancer: A systematic review. *Occup Environ Med.* 2012;69:619-27. <http://dx.doi.org/10.1136/oemed-2011-100566>
26. **Povey AC.** DNA adducts: Endogenous and induced. *Toxicol Pathol.* 2000;28:405-14. <http://dx.doi.org/10.1177/019262330002800308>
27. **Mussali-Galante P, Tovar-Sánchez E, Valverde M, Rojas-Del Castillo E.** Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: From molecules to ecosystems. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental.* 2013;29:117-40.
28. **Nielsen PS, Okkels H, Sigsgaard T, Kyrtopoulos S, Autrup H.** Exposure to urban and rural air pollution: DNA and protein adducts and effect of glutathione-S-transferase genotype on adduct levels. *Int Arch Occup Environ Health.* 1996;68:170-6. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00381627>
29. **Meyer MJ, Bechtold WE.** Protein adduct biomarkers: State of the art. *Environ Health Perspect.* 1996;104(Suppl.5): 879-82.
30. **Scherer G, Frank S, Riedel K, Meger-Kossien I, Renner T.** Biomonitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of nonoccupationally exposed persons. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9:373-80.
31. **Pilger A, Rudiger HW.** 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int Arch Occup Environ Health.* 2006;80:1-15. <http://dx.doi.org/10.1007/s00420-006-0106-7>
32. **Loft S, Danielsen P, Lohr M, Jantzen K, Hemmingsen JG, Roursgaard M, et al.** Urinary excretion of 8-oxo-7,8-dihydroguanine as biomarker of oxidative damage to DNA. *Arch Biochem Biophys.* 2012;518:142-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2011.12.026>

33. **Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C.** 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2009;27:120-39. <http://dx.doi.org/10.1080/10590500902885684>
34. **Faust F, Kassie F, Knasmuller S, Boedecker RH, Mann M, Mersch-Sundermann V.** The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res.* 2004;566:209-29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.09.007>
35. **Dusinska M, Collins AR.** The comet assay in human biomonitoring: Gene-environment interactions. *Mutagenesis.* 2008;23:191-205. <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/gen007>
36. **Valverde M, Rojas E.** Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutat Res.* 2009;681:93-109. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.11.001>
37. **Cebulska-Wasilewska A, Wiechec A, Panek A, Binkova B, Sram RJ, Farmer PB.** Influence of environmental exposure to PAHs on the susceptibility of lymphocytes to DNA-damage induction and on their repair capacity. *Mutat Res.* 2005;588:73-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.08.013>
38. **Coronas MV, Pereira TS, Rocha JA, Lemos AT, Fachel JM, Salvadori DM, et al.** Genetic biomonitoring of an urban population exposed to mutagenic airborne pollutants. *Environ Int.* 2009;35:1023-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2009.05.001>
39. **Mondal NK, Bhattacharya P, Ray MR.** Assessment of DNA damage by comet assay and fast halo assay in buccal epithelial cells of Indian women chronically exposed to biomass smoke. *Int J Hyg Environ Health.* 2011;214:311-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.04.003>
40. **Piperakis SM, Petrakou E, Tsilimigaki S.** Effects of air pollution and smoking on DNA damage of human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen.* 2000;36:243-9. [http://dx.doi.org/10.1002/1098-2280\(2000\)36:3<243::AID-EM8>3.0.CO;2-9](http://dx.doi.org/10.1002/1098-2280(2000)36:3<243::AID-EM8>3.0.CO;2-9)
41. **Bonassi S, Ugolini D, Kirsch-Volders M, Stromberg U, Vermeulen R, Tucker JD.** Human population studies with cytogenetic biomarkers: Review of the literature and future perspectives. *Environ Mol Mutagen.* 2005;45:258-70. <http://dx.doi.org/10.1002/Em.20115>
42. **Motykwicz G.** Application of biomarkers in heavily polluted industrialized areas of countries of central and Eastern Europe. *Toxicology.* 1995;101:117-23. [http://dx.doi.org/10.1016/0300-483X\(95\)03025-B](http://dx.doi.org/10.1016/0300-483X(95)03025-B)
43. **Obe G, Pfeiffer P, Savage JR, Johannes C, Goedecke W, Jeppesen P, et al.** Chromosomal aberrations: Formation, identification and distribution. *Mutat Res.* 2002;504:17-36. [http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00076-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00076-3)
44. **Tucker JD, Preston RJ.** Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat Res.* 1996;365:147-59. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-1110\(96\)90018-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-1110(96)90018-4)
45. **Samanta S, Dey P.** Micronucleus and its applications. *Diagn Cytopathol.* 2012;40:84-90. <http://dx.doi.org/10.1002/dc.21592>
46. **Fenech M.** Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols.* 2007;2:1084-104. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.77>
47. **Bonassi S, El-Zein R, Bolognesi C, Fenech M.** Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: Evidence from human studies. *Mutagenesis.* 2011;26:93-100. <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/geq075>
48. **Wilson DM 3rd, Thompson LH.** Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutat Res.* 2007;616:11-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.11.017>
49. **Simpson LJ, Sale JE.** Sister chromatid exchange assay. *Subcell Biochem.* 2006;40:399-403. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-4896-8_34
50. **Stults DM, Killen MW, Pierce AJ.** The sister chromatid exchange (SCE) assay. *Methods Mol Biol.* 2014;1105:439-55. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-739-6_32
51. **DeMarini DM.** Genotoxicity biomarkers associated with exposure to traffic and near-road atmospheres: A review. *Mutagenesis.* 2013;28:485-505. <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/get042>
52. **Barrón-Vivanco BS, Rothenberg SJ, Medina-Díaz IM, Robledo-Marengo L, Rojas-García AE, Hernández-Cadena L, et al.** AKRs expression in peripheral blood lymphocytes from smokers: The role of body mass index. *Hum Exp Toxicol.* 2013;32:418-26. <http://dx.doi.org/10.1177/0960327112455071>
53. **Lampe JW, Stepaniants SB, Mao M, Radich JP, Dai HY, Linsley PS, et al.** Signatures of environmental exposures using peripheral leukocyte gene expression: Tobacco smoke. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13:445-53.
54. **Srivastava A, Yadav S, Sharma A, Dwivedi UN, Flora SJ, Parmar D.** Similarities in diesel exhaust particles induced alterations in expression of cytochrome P-450 and glutathione S-transferases in rat lymphocytes and lungs. *Xenobiotica.* 2012;42:624-32. <http://dx.doi.org/10.3109/00498254.2011.650732>
55. **Srivastava A, Sharma A, Yadav S, Flora SJ, Dwivedi UN, Parmar D.** Gene expression profiling of candidate genes in peripheral blood mononuclear cells for predicting toxicity of diesel exhaust particles. *Free Radic Biol Med.* 2014;67:188-94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.10.820>
56. **Wan J, Díaz-Sánchez D.** Phase II enzymes induction blocks the enhanced IgE production in B cells by diesel exhaust particles. *J Immunol.* 2006;177:3477-83. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.177.5.3477>
57. **Woodruff PG, Koth LL, Yang YH, Rodríguez MW, Favoreto S, Dolganov GM, et al.** A distinctive alveolar macrophage activation state induced by cigarette smoking. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:1383-92. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200505-686OC>
58. **Harvey BG, Heguy A, Leopold PL, Carolan BJ, Ferris B, Crystal RG.** Modification of gene expression of the small airway epithelium in response to cigarette smoking. *J Mol Med (Berl).* 2007;85:39-53. <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-006-0103-z>
59. **Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y.** Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch Biochem Biophys.* 2007;464:207-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2007.03.038>
60. **van Ede KI, Gaisch KP, van den Berg M, van Duursen MB.** Differential relative effect potencies of some dioxin-like compounds in human peripheral blood lymphocytes and murine splenic cells. *Toxicol Lett.* 2014;226:43-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.01.026>

61. **Vondracek J, Krcmar P, Prochazkova J, Trilecova L, Gavelova M, Skalova L, et al.** The role of aryl hydrocarbon receptor in regulation of enzymes involved in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a model of rat liver progenitor cells. *Chem Biol Interact.* 2009;180:226-37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2009.03.011>
62. **García-Tavera JL, Valdés-Lozano D, Poblete-Naredo I, Albores-Medina A, Zapata-Pérez O.** Bile benzo[a]pyrene concentration and hepatic CYP1A induction in hypoxic adult tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere.* 2013;92:16-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.034>
63. **Castorena-Torres F, Bermúdez-de León M, Cisneros B, Zapata-Pérez O, Salinas JE, Albores A.** Changes in gene expression induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in the human cell lines HepG2 and A549. *Toxicol In Vitro.* 2008;22:411-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2007.10.009>
64. **Topinka J, Marvanova S, Vondracek J, Sevastyanova O, Novakova Z, Krcmar P, et al.** DNA adducts formation and induction of apoptosis in rat liver epithelial 'stem-like' cells exposed to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res.* 2008;638:122-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.09.004>
65. **Aung HH, Lame MW, Gohil K, He G, Denison MS, Rutledge JC, et al.** Comparative gene responses to collected ambient particles *in vitro*: Endothelial responses. *Physiol Genomics.* 2011;43:917-29. <http://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00051.2011>
66. **Totlandsdal AI, Cassee FR, Schwarze P, Refsnes M, Lag M.** Diesel exhaust particles induce CYP1A1 and pro-inflammatory responses via differential pathways in human bronchial epithelial cells. *Part Fibre Toxicol.* 2010;7:41. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-8977-7-41>
67. **Gebel S, Gerstmayer B, Bosio A, Haussmann HJ, van Miert E, Muller T.** Gene expression profiling in respiratory tissues from rats exposed to mainstream cigarette smoke. *Carcinogenesis.* 2004;25:169-78. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgg193>
68. **Nagaraj NS, Beckers S, Mensah JK, Waigel S, Vigneswaran N, Zacharias W.** Cigarette smoke condensate induces cytochromes P450 and aldo-keto reductases in oral cancer cells. *Toxicol Lett.* 2006;165:182-94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.03.008>
69. **Maunder H, Patwardhan S, Phillips J, Clack A, Richter A.** Human bronchial epithelial cell transcriptome: Gene expression changes following acute exposure to whole cigarette smoke *in vitro*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;292:L1248-56. <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00290.2006>
70. **Mahadevan B, Keshava C, Musafia-Jeknic T, Pecaj A, Weston A, Baird WM.** Altered gene expression patterns in MCF-7 cells induced by the urban dust particulate complex mixture standard reference material 1649a. *Cancer Res.* 2005;65:1251-8. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2357>
71. **Jacob A, Hartz AM, Potin S, Coumoul X, Yousif S, Scherrmann JM, et al.** Aryl hydrocarbon receptor-dependent upregulation of Cyp1b1 by TCDD and diesel exhaust particles in rat brain microvessels. *Fluids Barriers CNS.* 2011;8:23. <http://dx.doi.org/10.1186/2045-8118-8-23>
72. **Riechelmann H, Deutschle T, Grabow A, Heinzow B, Butte W, Reiter R.** Differential response of Mono Mac 6, BEAS-2B, and Jurkat cells to indoor dust. *Environ Health Perspect.* 2007;115:1325-32. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.9874>
73. **Verheyen GR, Nuijten JM, van Hummelen P, Schoeters GR.** Microarray analysis of the effect of diesel exhaust particles on *in vitro* cultured macrophages. *Toxicol In Vitro.* 2004;18: 377-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2003.10.007>
74. **Koike E, Hirano S, Furuyama A, Kobayashi T.** cDNA microarray analysis of rat alveolar epithelial cells following exposure to organic extract of diesel exhaust particles. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004;201:178-85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2004.05.006>
75. **Nordskog BK, Blixt AD, Morgan WT, Fields WR, Hellmann GM.** Matrix-degrading and pro-inflammatory changes in human vascular endothelial cells exposed to cigarette smoke condensate. *Cardiovasc Toxicol.* 2003;3:101-17. <http://dx.doi.org/10.1385/CT:3:2:101>
76. **Matsunaga T, Morikawa Y, Haga M, Endo S, Soda M, Yamamura K, et al.** Exposure to 9,10-phenanthrenequinone accelerates malignant progression of lung cancer cells through up-regulation of aldo-keto reductase 1B10. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;278:180-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2014.04.024>
77. **Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E.** Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2010;154:103-16.
78. **Ueng TH, Hung CC, Kuo ML, Chan PK, Hu SH, Yang PC, et al.** Induction of fibroblast growth factor-9 and interleukin-1alpha gene expression by motorcycle exhaust particulate extracts and benzo(a)pyrene in human lung adenocarcinoma cells. *Toxicol Sci.* 2005;87:483-96. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfi251>
79. **Zhang H, Liu H, Davies KJ, Sioutas C, Finch CE, Morgan TE, et al.** Nrf2-regulated phase II enzymes are induced by chronic ambient nanoparticle exposure in young mice with age-related impairments. *Free Radic Biol Med.* 2012;52:2038-46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.042>
80. **Singh S, Vrishni S, Singh BK, Rahman I, Kakkar P.** Nrf2-ARE stress response mechanism: A control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. *Free Radic Res.* 2010;44:1267-88. <http://dx.doi.org/10.3109/10715762.2010.507670>
81. **Huang YC, Schmitt M, Yang Z, Que LG, Stewart JC, Frampton MW, et al.** Gene expression profile in circulating mononuclear cells after exposure to ultrafine carbon particles. *Inhal Toxicol.* 2010;22:835-46. <http://dx.doi.org/10.3109/08958378.2010.486419>
82. **Pettit AP, Brooks A, Laumbach R, Fiedler N, Wang Q, Strickland PO, et al.** Alteration of peripheral blood monocyte gene expression in humans following diesel exhaust inhalation. *Inhal Toxicol.* 2012;24:172-81. <http://dx.doi.org/10.3109/08958378.2012.654856>
83. **Peretz A, Peck EC, Bammler TK, Beyer RP, Sullivan JH, Trenga CA, et al.** Diesel exhaust inhalation and assessment of peripheral blood mononuclear cell gene transcription effects: An exploratory study of healthy human volunteers. *Inhal Toxicol.* 2007;19:1107-19. <http://dx.doi.org/10.1080/08958370701665384>

84. **Albertini RJ, Hayes RB.** Somatic cell mutations in cancer epidemiology. *IARC Sci Publ.* 1997;142:159-84.
85. **Albertini RJ.** HPRT mutations in humans: Biomarkers for mechanistic studies. *Mutat Res.* 2001;489:1-16. [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742\(01\)00064-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742(01)00064-3)
86. **Albertini RJ.** Somatic gene mutations *in vivo* as indicated by the 6-thioguanine-resistant T-lymphocytes in human blood. *Mutat Res.* 1985;150:411-22. [http://dx.doi.org/10.1016/0027-5107\(85\)90138-1](http://dx.doi.org/10.1016/0027-5107(85)90138-1)
87. **Curry J, Karnaoukhova L, Guenette GC, Glickman BW.** Influence of sex, smoking and age on human hpert mutation frequencies and spectra. *Genetics.* 1999;152:1065-77.
88. **Ammenheuser MM, Hastings DA, Whorton EB Jr., Ward JB Jr.** Frequencies of hpert mutant lymphocytes in smokers, non-smokers, and former smokers. *Environ Mol Mutagen.* 1997;30:131-8. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1997\)30:2<131::AID-EM5>3.0.CO;2-Q](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1997)30:2<131::AID-EM5>3.0.CO;2-Q)
89. **Finette BA, Poseno T, Vacek PM, Albertini RJ.** The effects of maternal cigarette smoke exposure on somatic mutant frequencies at the HPRT locus in healthy newborns. *Mutat Res.* 1997;377:115-23. [http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00069-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00069-9)
90. **Perera F, Hemminki K, Jedrychowski W, Whyatt R, Campbell U, Hsu Y, et al.** In utero DNA damage from environmental pollution is associated with somatic gene mutation in newborns. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11:1134-7.
91. **Hou SM, Lambert B, Hemminki K.** Relationship between HPRT mutant frequency, aromatic DNA adducts and genotypes for GSTM1 and NAT2 in bus maintenance workers. *Carcinogenesis.* 1995;16:1913-7. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/16.8.1913>
92. **Zanesi N, Mognato M, Pizzato M, Viezzer C, Ferri G, Celotti L.** Determination of HPRT mutant frequency and molecular analysis of T-lymphocyte mutants derived from coke-oven workers. *Mutat Res.* 1998;412:177-86. [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718\(97\)00190-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(97)00190-3)
93. **Wolffe AP, Matzke MA.** Epigenetics: Regulation through repression. *Science.* 1999;286:481-6. <http://dx.doi.org/10.1126/science.286.5439.481>
94. **Mirbahai L, Chipman JK.** Epigenetic memory of environmental organisms: A reflection of lifetime stressor exposures. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2014;764-765:10-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.10.003>
95. **Baccarelli A, Bollati V.** Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr.* 2009;21:243-51. <http://dx.doi.org/10.1097/Mop.0b013e32832925cc>
96. **Nogueira da Costa A, Herceg Z.** Detection of cancer-specific epigenomic changes in biofluids: Powerful tools in biomarker discovery and application. *Mol Oncol.* 2012;6:704-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2012.07.005>
97. **Burris HH, Baccarelli AA.** Environmental epigenetics: From novelty to scientific discipline. *J Appl Toxicol.* 2014;34:113-6. <http://dx.doi.org/10.1002/jat.2904>
98. **Bakulski KM, Fallin MD.** Epigenetic epidemiology: Promises for public health research. *Environ Mol Mutagen.* 2014;55:171-83. <http://dx.doi.org/10.1002/Em.21850>
99. **Yang AS, Estecio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JP.** A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:e38. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gnh032>
100. **Chuang JC, Jones PA.** Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res.* 2007;61:24R-29R. <http://dx.doi.org/10.1203/pdr.0b013e3180457684>
101. **Esteller M.** Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 2007;8:286-98. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2005>
102. **Hou L, Zhang X, Wang D, Baccarelli A.** Environmental chemical exposures and human epigenetics. *Int J Epidemiol.* 2012;41:79-105. <http://dx.doi.org/10.1093/ije/dyr154>
103. **Nadeau K, McDonald-Hyman C, Noth EM, Pratt B, Hammond SK, Balmes J, et al.** Ambient air pollution impairs regulatory T-cell function in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126:845-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2010.08.008>
104. **Brunst KJ, Leung YK, Ryan PH, Khurana Hershey GK, Levin L, Ji H, et al.** Forkhead box protein 3 (FOXP3) hypermethylation is associated with diesel exhaust exposure and risk for childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131:592-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2012.10.042>
105. **Baccarelli A, Wright RO, Bollati V, Tarantini L, Litonjua AA, Suh HH, et al.** Rapid DNA methylation changes after exposure to traffic particles. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179:572-8. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200807-1097OC>
106. **Madrigano J, Baccarelli A, Mittleman MA, Wright RO, Sparrow D, Vokonas PS, et al.** Prolonged exposure to particulate pollution, genes associated with glutathione pathways, and DNA methylation in a cohort of older men. *Environ Health Perspect.* 2011;119:977-82. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1002773>
107. **Tarantini L, Bonzini M, Apostoli P, Pegoraro V, Bollati V, Marinelli B, et al.** Effects of particulate matter on genomic DNA methylation content and iNOS promoter methylation. *Environ Health Perspect.* 2009;117:217-22. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.11898>
108. **Breton CV, Salam MT, Wang X, Byun HM, Siegmund KD, Gilliland FD.** Particulate matter, DNA methylation in nitric oxide synthase, and childhood respiratory disease. *Environ Health Perspect.* 2012;120:1320-6. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1104439>
109. **Salam MT, Byun HM, Lurmann F, Breton CV, Wang X, Eckel SP, et al.** Genetic and epigenetic variations in inducible nitric oxide synthase promoter, particulate pollution, and exhaled nitric oxide levels in children. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129:232-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2011.09.037>
110. **Liu J, Ballaney M, Al-Alem U, Quan C, Jin X, Perera F, et al.** Combined inhaled diesel exhaust particles and allergen exposure alter methylation of T helper genes and IgE production *in vivo*. *Toxicol Sci.* 2008;102:76-81. <http://dx.doi.org/10.1093/Toxsci/Kfm290>
111. **Yauk C, Polyzos A, Rowan-Carroll A, Somers CM, Godschalk RW, Van Schooten FJ, et al.** Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation

- in mice exposed to particulate air pollution in an urban/industrial location. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:605-10. <http://dx.doi.org/10.1073/Pnas.0705896105>
112. **Pavanello S, Bollati V, Pesatori AC, Kapka L, Bolognesi C, Bertazzi PA, et al.** Global and gene-specific promoter methylation changes are related to anti-B[a]PDE-DNA adduct levels and influence micronuclei levels in polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed individuals. *Int J Cancer*. 2009;125:1692-7. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.24492>
 113. **Perera F, Tang WY, Herbstman J, Tang D, Levin L, Miller R, et al.** Relation of DNA methylation of 5'-CpG island of ACSL3 to transplacental exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and childhood asthma. *PLoS One*. 2009;4:e4488. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004488>
 114. **Tang WY, Levin L, Talaska G, Cheung YY, Herbstman J, Tang D, et al.** Maternal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and 5'-CpG methylation of interferon-gamma in cord white blood cells. *Environ Health Perspect*. 2012;120:1195-200. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1103744>
 115. **Ouyang B, Baxter CS, Lam HM, Yeramaneni S, Levin L, Haynes E, et al.** Hypomethylation of dual specificity phosphatase 22 promoter correlates with duration of service in firefighters and is inducible by low-dose benzo[a]pyrene. *J Occup Environ Med*. 2012;54:774-80. <http://dx.doi.org/10.1097/JOM.0b013e31825296bc>
 116. **Jenuwein T, Allis CD.** Translating the histone code. *Science*. 2001;293:1074-80. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1063127>
 117. **Cao D, Bromberg PA, Samet JM.** COX-2 expression induced by diesel particles involves chromatin modification and degradation of HDAC1. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;37:232-9. <http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2006-0449OC>
 118. **Gilmour PS, Rahman I, Donaldson K, MacNee W.** Histone acetylation regulates epithelial IL-8 release mediated by oxidative stress from environmental particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;284:L533-40. <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00277.2002>
 119. **Teneng I, Montoya-Durango DE, Quertermous JL, Lacy ME, Ramos KS.** Reactivation of L1 retrotransposon by benzo(a)pyrene involves complex genetic and epigenetic regulation. *Epigenetics*. 2011;6:355-67. <http://dx.doi.org/10.4161/epi.6.3.14282>
 120. **Arita A, Niu J, Qu Q, Zhao N, Ruan Y, Nadas A, et al.** Global levels of histone modifications in peripheral blood mononuclear cells of subjects with exposure to nickel. *Environ Health Perspect*. 2012;120:198-203. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1104140>
 121. **Cantone L, Nordio F, Hou L, Apostoli P, Bonzini M, Tarantini L, et al.** Inhalable metal-rich air particles and histone H3K4 dimethylation and H3K9 acetylation in a cross-sectional study of steel workers. *Environ Health Perspect*. 2011;119:964-9. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1002955>
 122. **Xi S, Yang M, Tao Y, Xu H, Shan J, Inchauste S, et al.** Cigarette smoke induces C/EBP-beta-mediated activation of miR-31 in normal human respiratory epithelia and lung cancer cells. *PLoS One*. 2010;5:e13764. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0013764>
 123. **Wittmann J, Jack HM.** Serum microRNAs as powerful cancer biomarkers. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1806:200-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.07.002>
 124. **Hou L, Wang D, Baccarelli A.** Environmental chemicals and microRNAs. *Mutat Res*. 2011;714:105-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.05.004>
 125. **Xi S, Xu H, Shan J, Tao Y, Hong JA, Inchauste S, et al.** Cigarette smoke mediates epigenetic repression of miR-487b during pulmonary carcinogenesis. *J Clin Invest*. 2013;123:1241-61. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI61271>
 126. **Jardim MJ, Fry RC, Jaspers I, Dailey L, Díaz-Sánchez D.** Disruption of microRNA expression in human airway cells by diesel exhaust particles is linked to tumorigenesis-associated pathways. *Environ Health Perspect*. 2009;117:1745-51. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.0900756>
 127. **Bleck B, Grunig G, Chiu A, Liu M, Gordon T, Kazeros A, et al.** MicroRNA-375 regulation of thymic stromal lymphopoietin by diesel exhaust particles and ambient particulate matter in human bronchial epithelial cells. *J Immunol*. 2013;190:3757-63. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1201165>
 128. **Nymark P, Guled M, Borze I, Faisal A, Lahti L, Salmenkivi K, et al.** Integrative analysis of microRNA, mRNA and aCGH data reveals asbestos- and histology-related changes in lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011;50:585-97. <http://dx.doi.org/10.1002/gcc.20880>
 129. **Bollati V, Marinelli B, Apostoli P, Bonzini M, Nordio F, Hoxha M, et al.** Exposure to metal-rich particulate matter modifies the expression of candidate microRNAs in peripheral blood leukocytes. *Environ Health Perspect*. 2010;118:763-8. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.0901300>
 130. **Farraj AK, Hazari MS, Haykal-Coates N, Lamb C, Winsett DW, Ge Y, et al.** ST depression, arrhythmia, vagal dominance, and reduced cardiac micro-RNA in particulate-exposed rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44:185-96. <http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2009-0456OC>
 131. **Bourdon JA, Saber AT, Halappanavar S, Jackson PA, Wu D, Hougaard KS, et al.** Carbon black nanoparticle intratracheal installation results in large and sustained changes in the expression of miR-135b in mouse lung. *Environ Mol Mutagen*. 2012;53:462-8. <http://dx.doi.org/10.1002/em.21706>
 132. **Fry RC, Rager JE, Bauer R, Sebastian E, Peden DB, Jaspers I, et al.** Air toxics and epigenetic effects: Ozone altered microRNAs in the sputum of human subjects. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;306:L1129-37. <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00348.2013>
 133. **Motta V, Angelici L, Nordio F, Bollati V, Fossati S, Frascati F, et al.** Integrative analysis of miRNA and inflammatory gene expression after acute particulate matter exposure. *Toxicol Sci*. 2013;132:307-16. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kft013>
 134. **Zhao Y, Xu Y, Li Y, Xu W, Luo F, Wang B, et al.** NF-kappaB-mediated inflammation leading to EMT via miR-200c is involved in cell transformation induced by cigarette smoke extract. *Toxicol Sci*. 2013;135:265-76. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kft150>
 135. **Duan H, Jiang Y, Zhang H, Wu Y.** MiR-320 and miR-494 affect cell cycles of primary murine bronchial epithelial cells exposed to benzo[a]pyrene. *Toxicol In Vitro*. 2010;24:928-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2009.11.013>

136. **Yauk CL, Jackson K, Malowany M, Williams A.** Lack of change in microRNA expression in adult mouse liver following treatment with benzo(a)pyrene despite robust mRNA transcriptional response. *Mutat Res.* 2011;722:131-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.02.012>
137. **Zhang B, Pan X.** RDX induces aberrant expression of microRNAs in mouse brain and liver. *Environ Health Perspect.* 2009;117:231-40. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.11841>
138. **Perera FP.** Environment and cancer: Who are susceptible? *Science.* 1997;278:1068-73. <http://dx.doi.org/10.1126/science.278.5340.1068>
139. **Norppa H.** Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol Lett.* 2004;149:309-34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.12.042>
140. **Brookes AJ.** The essence of SNPs. *Gene.* 1999;234:177-86. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00219-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00219-X)
141. **Manfredi S, Federici C, Picano E, Botto N, Rizza A, Andreassi MG.** GSTM1, GSTT1 and CYP1A1 detoxification gene polymorphisms and susceptibility to smoking-related coronary artery disease: A case-only study. *Mutat Res.* 2007;621:106-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.02.014>
142. **Roszak A, Lianeri M, Sowinska A, Jagodzinski PP.** CYP1A1 Ile462Val polymorphism as a risk factor in cervical cancer development in the Polish population. *Mol Diagn Ther.* 2014;18 445-50. <http://dx.doi.org/10.1007/s40291-014-0095-2>
143. **Rihs HP, Pesch B, Kappler M, Rabstein S, Rossbach B, Angerer J, et al.** Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in German industries: Association between exogenous exposure and urinary metabolites and its modulation by enzyme polymorphisms. *Toxicol Lett.* 2005;157:241-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.02.012>
144. **Georgiadis P, Topinka J, Vlachodimitropoulos D, Stoikidou M, Gioka M, Stephanou G, et al.** Interactions between CYP1A1 polymorphisms and exposure to environmental tobacco smoke in the modulation of lymphocyte bulky DNA adducts and chromosomal aberrations. *Carcinogenesis.* 2005;26:93-101. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgh294>
145. **Betti M, Ferrante D, Padoan M, Guarrera S, Giordano M, Aspesi A, et al.** XRCC1 and ERCC1 variants modify malignant mesothelioma risk: A case-control study. *Mutat Res.* 2011;708:11-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.01.001>
146. **Bagryantseva Y, Novotna B, Rossner P Jr, Chvatalova I, Milcova A, Svecova V, et al.** Oxidative damage to biological macromolecules in Prague bus drivers and garagemen: Impact of air pollution and genetic polymorphisms. *Toxicol Lett.* 2010;199:60-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.08.007>
147. **Lan Q, He X.** Molecular epidemiological studies on the relationship between indoor coal burning and lung cancer in Xuan Wei, China. *Toxicology.* 2004;198:301-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2004.02.006>
148. **Conlon MS, Johnson KC, Bewick MA, Lafrenie RM, Donner A.** Smoking (active and passive), N-acetyltransferase 2, and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol.* 2010;34:142-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2010.02.001>
149. **Kelada SN, Eaton DL, Wang SS, Rothman NR, Khoury MJ.** The role of genetic polymorphisms in environmental health. *Environ Health Perspect.* 2003;111:1055-64. http://dx.doi.org/sc271_5_1835
150. **Yang XR, Wacholder S, Xu Z, Dean M, Clark V, Gold B, et al.** CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms in relation to lung cancer risk in Chinese women. *Cancer Lett.* 2004;214:197-204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2004.06.040>
151. **Yang Y, Tian Y, Jin X, Yan C, Jiang F, Zhang Y, et al.** A case-only study of interactions between metabolic enzyme polymorphisms and industrial pollution in childhood acute leukemia. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2009;28:161-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2009.03.004>
152. **Dianzani I, Gibello L, Biava A, Giordano M, Bertolotti M, Betti M, et al.** Polymorphisms in DNA repair genes as risk factors for asbestos-related malignant mesothelioma in a general population study. *Mutat Res.* 2006;599:124-34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.02.005>
153. **Thier R, Bruning T, Roos PH, Rihs HP, Golka K, Ko Y, et al.** Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: The role of selected CYP, NAT and GST genes. *Int J Hyg Environ Health.* 2003;206:149-71. <http://dx.doi.org/10.1078/1438-4639-00209>
154. **Merlo F, Andreassen A, Weston A, Pan CF, Haugen A, Valerio F, et al.** Urinary excretion of 1-hydroxypyrene as a marker for exposure to urban air levels of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998;7:147-55.
155. **Suh YJ, Kim BM, Park BH, Park H, Kim YJ, Kim H, et al.** Cytochrome P450A1 polymorphisms along with PM(10) exposure contribute to the risk of birth weight reduction. *Reprod Toxicol.* 2007;24:281-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.07.001>
156. **Yu KT, Ge C, Xu XF, Zou JC, Zou X, Zhen S.** CYP1A1 polymorphism interactions with smoking status in oral cancer risk: Evidence from epidemiological studies. *Tumour Biol.* 2014;35:1183-91. <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-014-2422-y>
157. **Mooney LA, Bell DA, Santella RM, Van Bennekum AM, Ottman R, Paik M, et al.** Contribution of genetic and nutritional factors to DNA damage in heavy smokers. *Carcinogenesis.* 1997;18:503-9. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/18.3.503>
158. **Muñoz B, Magana JJ, Romero-Toledo I, Juárez-Pérez E, López-Moya A, Leyva-García N, et al.** The relationship among IL-13, GSTP1, and CYP1A1 polymorphisms and environmental tobacco smoke in a population of children with asthma in Northern México. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2012;33:226-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2011.12.007>
159. **Cao L, Lin J, He B, Wang H, Rao J, Liu Y, et al.** A regulatory variant in CYP2E1 affects the risk of lung squamous cell carcinoma. *Tumour Biol.* 2014;35:455-62. <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-013-1063-x>
160. **Yang M, Koga M, Katoh T, Kawamoto T.** A study for the proper application of urinary naphthols, new biomarkers for airborne polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1999;36:99-108. <http://dx.doi.org/10.1007/s002449900447>

161. **Kato S, Bowman ED, Harrington AM, Blomeke B, Shields PG.** Human lung carcinogen-DNA adduct levels mediated by genetic polymorphisms *in vivo*. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:902-7. <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/87.12.902>
162. **Chen B, Hu Y, Jin T, Lu D, Shao M, Zheng L, et al.** The influence of metabolic gene polymorphisms on urinary 1-hydroxypyrene concentrations in Chinese coke oven workers. *Sci Total Environ.* 2007;381:38-46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.02.021>
163. **Georgiadis P, Demopoulos NA, Topinka J, Stephanou G, Stoikidou M, Bekyrou M, et al.** Impact of phase I or phase II enzyme polymorphisms on lymphocyte DNA adducts in subjects exposed to urban air pollution and environmental tobacco smoke. *Toxicol Lett.* 2004;149:269-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.12.038>
164. **Lan Q, Mumford JL, Shen M, Demarini DM, Bonner MR, He X, et al.** Oxidative damage-related genes AKR1C3 and OGG1 modulate risks for lung cancer due to exposure to PAH-rich coal combustion emissions. *Carcinogenesis.* 2004;25:2177-81. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgh240>
165. **Figueroa JD, Malats N, García-Closas M, Real FX, Silverman D, Kogevinas M, et al.** Bladder cancer risk and genetic variation in AKR1C3 and other metabolizing genes. *Carcinogenesis.* 2008;29:1955-62. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgn163>
166. **Walker K, Ginsberg G, Hattis D, Johns DO, Guyton KZ, Sonawane B.** Genetic polymorphism in N-acetyltransferase (NAT): Population distribution of NAT1 and NAT2 activity. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2009;12:440-72. <http://dx.doi.org/10.1080/10937400903158383>
167. **Costa DJ.** Influence of GSTM1 and NAT2 genotypes on the relationship between personal exposure to PAH and biomarkers of internal dose. *Biomarkers.* 1998;3:411-24. <http://dx.doi.org/10.1080/135475098231057>
168. **Cascorbi I, Brockmoller J, Mrozikiewicz PM, Bauer S, Loddenkemper R, Roots I.** Homozygous rapid arylamine N-acetyltransferase (NAT2) genotype as a susceptibility factor for lung cancer. *Cancer Res.* 1996;56:3961-6.
169. **Prasad SB, Vidyullatha P, Vani GT, Devi RP, Rani UP, Reddy PP, et al.** Association of gene polymorphism in detoxification enzymes and urinary 8-OHdG levels in traffic policemen exposed to vehicular exhaust. *Inhal Toxicol.* 2013;25:1-8. <http://dx.doi.org/10.3109/08958378.2012.745634>
170. **Hong YC, Lee KH, Yi CH, Ha EH, Christiani DC.** Genetic susceptibility of term pregnant women to oxidative damage. *Toxicol Lett.* 2002;129:255-62. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00014-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00014-0)
171. **Park EY, Hong YC, Lee KH, Im MW, Ha E, Kim YJ, et al.** Maternal exposure to environmental tobacco smoke, GSTM1/T1 polymorphisms and oxidative stress. *Reprod Toxicol.* 2008;26:197-202. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.08.010>
172. **Pavanello S, Pulliero A, Clonfero E.** Influence of GSTM1 null and low repair XPC PAT+ on anti-B[a]PDE-DNA adduct in mononuclear white blood cells of subjects low exposed to PAHs through smoking and diet. *Mutat Res.* 2008;638:195-204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.10.004>
173. **Pavanello S, Pulliero A, Siwinska E, Mielzynska D, Clonfero E.** Reduced nucleotide excision repair and GSTM1-null genotypes influence anti-B[a]PDE-DNA adduct levels in mononuclear white blood cells of highly PAH-exposed coke oven workers. *Carcinogenesis.* 2005;26:169-75. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgh303>
174. **Suh YJ, Ha EH, Park H, Kim YJ, Kim H, Hong YC.** GSTM1 polymorphism along with PM10 exposure contributes to the risk of preterm delivery. *Mutat Res.* 2008;656:62-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.07.006>
175. **Knudsen LE, Norppa H, Gamborg MO, Nielsen PS, Okkels H, Soll-Johanning H, et al.** Chromosomal aberrations in humans induced by urban air pollution: Influence of DNA repair and polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and N-acetyltransferase 2. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8:303-10.
176. **Lee KM, Park SK, Kim SU, Doll MA, Yoo KY, Ahn SH, et al.** N-acetyltransferase (NAT1, NAT2) and glutathione S-transferase (GSTM1, GSTT1) polymorphisms in breast cancer. *Cancer Lett.* 2003;196:179-86. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835\(03\)00311-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835(03)00311-2)
177. **Chen HC, Cao YF, Hu WX, Liu XF, Liu QX, Zhang J, et al.** Genetic polymorphisms of phase II metabolic enzymes and lung cancer susceptibility in a population of Central South China. *Dis Markers.* 2006;22:141-52. <http://dx.doi.org/10.1155/2006/436497>

Información e instrucciones para los autores

Biomédica es la revista científica del Instituto Nacional de Salud de Colombia. Su fin primordial es la difusión de trabajos originales que contribuyan a ampliar los conocimientos en biomedicina.

Política editorial de la revista

Biomédica acepta y se acoge a los lineamientos establecidos por el *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE) (www.icmje.org), por *Equator Network* (<http://www.equator-network.org/>) y por el *Committee on Publication Ethics* (COPE) (<http://publicationethics.org/>) para garantizar la calidad de las publicaciones científicas, su transparencia, integridad y debida salvaguarda de los principios éticos que rigen la investigación biomédica.

La política de reconocimiento de autoría de la revista *Biomédica* se ciñe a la orientación del ICMJE. Este Comité señala que

“El crédito de autoría debe basarse solamente en:

- (1) contribuciones sustanciales a la concepción y el diseño del manuscrito, o a la adquisición, análisis e interpretación de los datos;
- (2) la redacción del manuscrito o la revisión crítica de contenido intelectual importante;
- (3) la aprobación final de la versión que se publicará, y
- (4) la asunción de la responsabilidad frente a todos los aspectos del manuscrito, para garantizar que los asuntos relativos a la exactitud o integridad de cualquier parte del mismo sean apropiadamente investigados y resueltos.

Para que a alguien se le reconozca como autor, debe satisfacer las cuatro condiciones mencionadas. La adquisición de fondos, la recolección de datos o la supervisión general del grupo de investigación por sí mismos, no justifican la autoría”.

La revista *Biomédica* no acepta la inclusión o el retiro de autores después de haberse iniciado el proceso editorial de los manuscritos. En casos excepcionales en que ello se permita, es obligatorio obtener el consentimiento por escrito de los autores cuyos nombres vayan a ser eliminados del manuscrito o agregados a él. Además, se debe enviar una declaración firmada haciendo constar que todos los autores reúnen los criterios de autoría y que no existen otros autores que, reuniendo los criterios,

hayan sido omitidos, y volver a mencionar en detalle la contribución de cada persona a la investigación y al manuscrito.

Registro de ensayos clínicos

Biomédica apoya las políticas de registro de ensayos clínicos de la Organización Mundial de la Salud y del *International Committee of Medical Journal Editors*. Por consiguiente, solamente aceptará para publicación los manuscritos de investigaciones clínicas que hayan recibido un número de identificación en uno de los registros de ensayos clínicos validados por los criterios establecidos por las instituciones antes mencionadas. El número de identificación y el sitio de registro se deben incluir al final del resumen del manuscrito.

Derechos de autor

Ninguna publicación, nacional o extranjera, puede reproducir ni traducir los artículos ni sus resúmenes, sin previa autorización escrita del Comité Editorial de la revista *Biomédica*.

Declaración de privacidad

Los nombres y las direcciones de correo electrónico suministradas a la revista se utilizarán exclusivamente para los propósitos declarados y no se pondrán a disposición de ninguna otra persona o institución.

Proceso editorial

Todo material propuesto para publicación en la revista será revisado inicialmente por el Comité Editorial y enviado luego para evaluación externa a evaluadores o pares científicos. Para facilitar este paso, junto con el manuscrito, los autores deben enviar a través del sistema en línea, un archivo complementario que contenga el nombre, la afiliación y el correo electrónico de cuatro posibles evaluadores nacionales y cuatro internacionales. Los nombres de los evaluadores sugeridos no deben incluirse dentro del manuscrito.

Una vez que el autor reciba los comentarios de los evaluadores, debe proceder a contestarlos punto por punto y a incorporar las modificaciones correspondientes en el texto, en un plazo de dos semanas. Si en el transcurso de las cuatro semanas siguientes, *Biomédica* no ha recibido la respuesta de los autores, el Comité Editorial retirará el manuscrito.

Una vez aceptado el manuscrito para publicación, el Comité Editorial no aceptará modificaciones sobre su contenido y se solicitará enviar una declaración de cesión a la revista de los derechos de reproducción, la cual debe ser firmada por todos los autores. Además, los autores deben hacer revisar la calidad del inglés del manuscrito o del resumen, por parte de un experto en el idioma, y enviar la certificación a la revista en un plazo menor a dos semanas.

La revista *Biomédica* se reserva el derecho de aceptar o rechazar los manuscritos sometidos para publicación, y hará sugerencias que tiendan a mejorar su presentación y a garantizar la integridad de la publicación.

Los manuscritos originales aceptados para publicación, se mantendrán en los archivos de la revista durante mínimo un año a partir de la fecha de publicación.

Después de la edición y la corrección de estilo, los autores recibirán las galeradas del artículo, las cuales deben ser cuidadosamente revisadas y devueltas al editor en un término máximo de 48 horas.

Una vez realizada la publicación de la revista, el autor principal recibirá, libre de costo, cinco ejemplares de la revista.

La revista *Biomédica* es de acceso libre e incluye metadatos de citación para todas las referencias de los artículos publicados y las deposita en CrossRef (<http://www.crossref.org/>).

Información general sobre los manuscritos

Biomédica publica trabajos científicos, escritos en español o en inglés, en las siguientes categorías.

Artículo original: trabajo inédito derivado de una investigación biomédica que aporta información nueva sobre aspectos específicos y contribuye de manera relevante al conocimiento científico.

Comunicación breve: es el informe de resultados parciales o finales de una investigación, cuya divulgación rápida sea de gran importancia.

Nota técnica: describe en detalle una técnica de laboratorio novedosa o modificaciones de una técnica ya establecida, enfatizando las ventajas que tiene el procedimiento o la innovación desarrollados.

Ensayo: es un manuscrito filosófico, literario o científico que presenta la opinión sustentada del autor sobre un tema específico o de actualidad.

Comentario: manuscrito sobre un artículo publicado en la revista.

Reseña histórica: es un manuscrito que destaca personajes o sucesos y su contribución al desarrollo de las ciencias biomédicas o de las políticas en salud.

Revisión de tema: presenta el estado actual del conocimiento sobre un tema; puede ser de dos tipos:

- 1) solicitada directamente por el Comité Editorial a personas expertas en el tema,
- 2) presentada por profesionales interesados en un tema en particular. En este caso, se debe enviar inicialmente al Comité Editorial la propuesta en la que se indique por qué el tema escogido es pertinente para los lectores de *Biomédica*, así como una breve descripción del contenido, las referencias clave, las publicaciones de los autores sobre el tema que serán incluidas (requisito obligatorio), los datos inéditos de los autores que se incluirán en la revisión (requisito obligatorio), la probable extensión del documento y el número aproximado de ilustraciones.

En ambos casos, los autores deben estructurar la revisión de la siguiente manera:

- incluir un resumen con énfasis en el significado de los hallazgos recientes;
- una introducción al tema, señalando hitos pasados y desarrollos presentes;
- encabezamientos en el texto, con el objeto de hacer más provechosa su lectura;
- la revisión debe incluir un análisis crítico de la bibliografía y los datos propios de los autores;
- el desarrollo del tema queda a discreción del autor, pero se aconseja que incluya tablas, esquemas y figuras, que hagan ágil el texto y ofrezcan una comprensión más rápida de su contenido. En caso de usar figuras tomadas total o parcialmente de otras publicaciones, los autores deben adjuntar el permiso de la casa editorial que ostente los derechos de autor para su reproducción en *Biomédica*.

Imágenes en biomedicina: es un trabajo ilustrado con fotografías que muestran y explican de manera didáctica un concepto, una estructura, una enfermedad o un diagnóstico biomédico. Debe incluir un comentario corto que resalte la importancia del tema ilustrado.

Haga usted el diagnóstico: pretende retar la capacidad diagnóstica de los lectores, utilizando ilustraciones o fotografías de casos clínicos o de hallazgos microscópicos. Consta de dos partes, la presentación clínica y los hallazgos correspondientes, y el diagnóstico correcto; este último aparece en una página aparte y debe acompañarse de un comentario actualizado sobre la entidad que se pretende ilustrar.

Presentación de casos: son ejemplos de casos clínicos que destacan alguna particularidad o señalan un hallazgo especial de la enfermedad, con una revisión breve de las publicaciones pertinentes.

Cartas al editor: los lectores pueden solicitar aclaraciones o presentar comentarios sobre el material publicado en la revista. La decisión sobre la publicación de las cartas recibidas queda a discreción del Comité Editorial.

Comentarios bibliográficos: son escritos críticos breves sobre libros de salud o de biomedicina.

Preparación del manuscrito

Los autores deben ceñirse a las indicaciones del *International Committee of Medical Journal Editors*, que se encuentran publicadas como *Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals (Updated December 2013)* (<http://icmje.org/icmje-recommendations.pdf>).

El manuscrito debe incluir las siguientes secciones.

Hoja de presentación: esta sección debe incluir

- título (máximo 165 caracteres),
- título corto para los encabezamientos de las páginas (máximo 50 caracteres),
- título en inglés (máximo 165 caracteres),
- un párrafo con los nombres completos de los autores únicamente con el primer apellido,
- la afiliación institucional integrada por grupo, institución, ciudad y país. La afiliación institucional se relaciona con los autores con números en superíndice y en ella se deben omitir cargos y títulos académicos,
- datos de correspondencia: nombre del autor responsable, dirección completa, número telefónico y de fax, y dirección electrónica, y
- párrafo donde los autores declaren cuál fue el aporte al documento de cada uno de ellos.

Resúmenes: el trabajo debe incluir un resumen estructurado en español e inglés, con los subtítulos introducción, objetivo, materiales y métodos, resultados y conclusión. Los resúmenes no deben exceder las 250 palabras. No se permite el uso de referencias ni se recomienda la inclusión de siglas o acrónimos.

Palabras clave: se requieren de 6 a 10 palabras clave en cada idioma; consulte los Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS) del índice de la Literatura Latinoamericana y del Caribe en Ciencias de la Salud (LILACS) en <http://decs.bvs.br/E/homepagee.htm>; para verificar las de inglés, consulte los *Medical Subject Headings* (MeSH) del *Index Medicus* en <http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.htm>.

Texto: todo el manuscrito, incluso la página del título, los resúmenes, las referencias, las leyendas de figuras y cuadros, debe estar escrito en letra Arial de 12 puntos de tamaño a doble espacio y alineado a la izquierda, sin dejar espacios extras entre párrafos; se debe dejar un solo espacio después del punto y seguido o del punto y aparte.

Los cuadros se deben configurar en letra Arial de 10 puntos de tamaño a espacio sencillo.

Se debe usar letra bastardilla o cursiva para los términos científicos, sin subrayarlos.

Los números decimales en español deben separarse de los números enteros por comas, no por puntos.

Formato electrónico: el manuscrito se debe enviar en Word, preferiblemente en la versión 97-2003. Además de ser adjuntas al documento de Word, las figuras se deben enviar preferentemente como fichero complementario en formato tiff (*Tagged Image File Format*) de 300 dpi (*dots per inch*). Las gráficas elaboradas en *PowerPoint* o *Word* son de baja resolución, por lo tanto, no se deben incluir este tipo de imágenes en formato electrónico. Las ilustraciones se imprimen en una columna (75 mm) o en dos columnas (153 mm); por consiguiente, se deben enviar las ilustraciones del tamaño en que van a quedar impresas. Si las ilustraciones son en color y se remiten en formato electrónico, se deben enviar en archivos CMYK en formato tiff (*Tagged Image File Format*) de alta resolución. Si la imagen no tiene texto incluido, la resolución óptima para los archivos CMYK es de 300 dpi; si incluye texto, la resolución recomendada es de 600 dpi y, si son de blanco y negro, de 1.200 dpi. La fuente preferida para las gráficas es Helvética. Si sus archivos son de Macintosh, debe convertirlos a uno de

los formatos mencionados. Se requiere una lista completa de los archivos enviados, que incluya los programas cuyo formato se utilizó.

Agradecimientos: cuando en esta sección se nombren personas, los autores deben certificar que ellos tienen conocimiento y están de acuerdo con aparecer en los agradecimientos. Esto no es necesario cuando se nombran entidades.

Conflicto de intereses y financiación: los autores deben incluir, antes de las referencias del manuscrito, un párrafo en el que expresen si existen conflictos de intereses o si no los hay. Además, debe presentarse otro párrafo que incluya la fuente de financiación de la investigación adelantada.

Biomédica acoge las recomendaciones del ICMJE y adopta el formato de declaración de potenciales conflictos de intereses, el cual debe ser diligenciado individualmente por cada uno de los autores del manuscrito y enviado junto con la carta de remisión. El formulario electrónico está disponible en <http://www.icmje.org/conflicts-of-interest/>.

Referencias bibliográficas: es indispensable observar estrictamente las indicaciones de los requisitos uniformes para manuscritos del área biomédica. Se le asigna un número a cada referencia citada del texto, así como a los cuadros y a las figuras, en orden ascendente. Los números de las referencias se anotan entre paréntesis y no como superíndice.

Las comunicaciones personales, los datos sin publicar, los manuscritos en preparación o sometidos para publicación y los resúmenes de trabajos presentados en congresos, se deben citar entre paréntesis en el cuerpo del manuscrito y no en la sección de referencias.

La abreviatura exacta de la revista citada se debe consultar en la lista de publicaciones periódicas del *Index Medicus* (<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>); si la revista no aparece, se escribe el título completo de la revista. Solo se deben transcribir los seis primeros autores del artículo, seguidos de *et al.* Se recomienda la inclusión de referencias nacionales y latinoamericanas, para lo cual se puede consultar Lilacs, Pubindex, Latindex, Redalyc, Sibra y otras fuentes bibliográficas pertinentes.

En caso de dudas sobre la forma correcta de citar una referencia (artículo científico, libro, tesis, página de internet, etc.), se sugiere consultar la página http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html, en la cual se encuentran ejemplos de todos y cada uno de los posibles casos.

A continuación se dan algunos ejemplos para el estilo de las referencias, siguiendo las normas de Vancouver.

Revista científica: la forma adecuada de citar revistas científicas es la siguiente (observar el orden de los datos, los espacios y la puntuación):

Autores (primer apellido seguido de las iniciales del nombre) en negrilla. Título. Abreviatura de la revista. Año; volumen: página inicial-página final. <http://dx.doi.org/>

Ejemplo:

Sánchez J, Villada OA, Rojas ML, Montoya L, Díaz A, Vargas C, et al. Efecto del zinc aminoquelado y el sulfato de zinc en la incidencia de la infección respiratoria y la diarrea en niños preescolares de centros infantiles. *Biomédica*. 2014;34:79-91. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i1.1581>

Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*. 2004;294:15-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2004.08.008>

Libro o documento: la forma adecuada de citar libros o documentos es (observar el orden de los datos, los espacios y la puntuación):

Autores (primer apellido seguido de las iniciales del nombre) en negrilla. Título. Edición (en los casos que corresponda). Ciudad de publicación: editorial; año. página inicial-página final o número total de páginas.

Ejemplo:

Bernard HR. Research methods in anthropology: Qualitative and quantitative approaches. Second edition. Thousand Oaks, CA: Sage Publications; 1994. 585 p.

Capítulo de libro o documento: la forma adecuada de citar capítulos de libros o documentos es la siguiente (observar el orden de los datos, los espacios y la puntuación):

Autores (primer apellido seguido de las iniciales del nombre) en negrilla. Título del capítulo. En: autor del libro, editores. Título del libro. Edición (en los casos que corresponda). Ciudad de publicación: editorial; año. página inicial-página final.

Ejemplo:

Franco JL, Orrego JC, Montoya CJ, Patiño PJ. Síndrome de infección recurrente. En: Correa JA, Gómez JF, Posada R, editores. Fundamentos

de Pediatría. Tercera edición. Medellín: Editorial Corporación para Investigaciones Biológicas; 2007. p. 15-50.

Documentos en páginas web: la forma adecuada de citar documentos publicados en páginas web, es la siguiente (observar el orden de los datos, los espacios y la puntuación):

Autores (primer apellido seguido de las iniciales del nombre) en negrilla. Título. Fecha de consulta: día, mes, año. Disponible en: página exacta en donde abre el documento.

Ejemplo:

Ministerio de la Protección Social. Actualización integral del POS 2013. Fecha de consulta: 26 de febrero del 2014. Disponible en: <http://www.pos.gov.co/Documents/LISTADO%20MEDICAMENTOS%20ACUERDO%20008%20CRES.pdf>.

Cuadros y figuras: los cuadros se elaboran usando el formato de Word; abstenerse de preparar archivos en columnas o tabulados en el texto mismo del manuscrito.

En las preparaciones de microscopio, se deben mencionar la coloración y el aumento según el objetivo utilizado, sin incluir el valor del ocular.

Cuando se utilicen cuadros o figuras que ya hayan sido publicados, se requiere enviar la autorización de la casa editorial que ostenta los derechos de reproducción.

Remisión del manuscrito

El manuscrito debe ser remitido a través del sistema en línea disponible en el enlace de información para autores en <http://www.revistabiomedica.org/>.

Sin embargo, se debe enviar la carta impresa de remisión firmada en original por todos los autores, en la que conste que todos conocen y están de

acuerdo con su contenido, y que el manuscrito no ha sido publicado anteriormente ni se ha sometido a publicación simultánea en otra revista, a la oficina de la revista ubicada en la siguiente dirección:

Revista Biomédica
Instituto Nacional de Salud
Avenida Calle 26 N° 51-20, bloque B, oficina B-245
Bogotá, D.C., Zona 6, Colombia, S.A.

Los autores radicados en otros países pueden enviar la carta de remisión firmada y escaneada desde sus correos electrónicos personales, al correo de la revista (biomedica@ins.gov.co), informando que se entrega por este medio por encontrarse en el exterior.

Solo cuando se reciba la carta de remisión en la oficina de la revista (autores nacionales), o todos los correos (autores internacionales), se iniciará el proceso de revisión editorial del manuscrito.

Al someter un manuscrito para publicación en *Biomédica*, los autores aceptan con su firma, explícita o implícitamente, que:

- 1) Conocen las instrucciones para los autores y las han seguido detalladamente.
- 2) Todos los autores cumplen todos los criterios internacionalmente aceptados para ser considerados como tal.
- 3) No se ha excluido de la lista de autores el nombre de ningún autor que reúna los requisitos para serlo.
- 4) Todos los autores conocen la versión final del manuscrito sometido para publicación y están de acuerdo con ella.
- 5) No se ha incurrido en conducta alguna que pueda considerarse como transgresión de la integridad científica o de los principios éticos que rigen las publicaciones científicas.

BIOMÉDICA

Lista de verificación

Con el fin de comprobar que se hayan cumplido todas las instrucciones correspondientes a las normas de publicación de la revista *Biomédica*, le solicitamos que diligencie en línea la siguiente lista de verificación y la presente junto con su manuscrito.

Categoría

- | | | |
|---|--|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Artículo original | <input type="checkbox"/> Comunicación breve | <input type="checkbox"/> Nota técnica |
| <input type="checkbox"/> Revisión de tema | <input type="checkbox"/> Reseña histórica | <input type="checkbox"/> Ensayo |
| <input type="checkbox"/> Comentario | <input type="checkbox"/> Imágenes en biomedicina | |
| <input type="checkbox"/> Presentación de caso | <input type="checkbox"/> Haga usted el diagnóstico | |
| <input type="checkbox"/> Carta al editor | <input type="checkbox"/> Reseña bibliográfica | |

1- Presentación

- Texto escrito a doble espacio en fuente Arial de 12 puntos de tamaño y alineado a la izquierda
- Páginas numeradas consecutivamente en la esquina inferior derecha

2- Título

- Se incluyen los títulos en español e inglés (máximo 165 caracteres).
- Se incluye el título abreviado en español, o inglés en los casos pertinentes (máximo 50 caracteres).
- Los autores aparecen sólo con su afiliación institucional, sin mencionar cargos ni títulos académicos.
- El autor de la correspondencia suministró los datos completos: nombre, apellidos, dirección, teléfono, fax y dirección electrónica.

3- Resumen

- Se incluye el resumen estructurado en español e inglés, con una extensión máxima de 250 palabras y con los siguientes subtítulos: introducción, objetivos, materiales y métodos, resultados y conclusiones.
El resumen estructurado solo se requiere para artículos originales y comunicaciones breves.

4- Palabras clave

- Se incluyen 6 a 10 por artículo en cada idioma.
- Se usan las palabras clave en español e inglés indexadas en los Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS) (<http://decs.bvs.br/E/homepagee.html>) y *Medical Subject Headings* (MeSH) (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.htm>).

5- Estructura del artículo original, nota técnica y comunicación breve

Se incluyen los siguientes apartados:

- Introducción
- Materiales y métodos
- Resultados
- Discusión
- Agradecimientos
- Declaración de conflicto de intereses

- ___ Financiación
- ___ Referencias
- ___ Cuadros y figuras con sus respectivas leyendas

6- Figuras

- ___ Se incluye cada una en página aparte, con su respectiva leyenda.

7- Cuadros

- ___ Se adjuntan en hoja aparte, elaborados en el modelo de tablas de Word, configurados en Arial 10 a espacio sencillo.
- ___ Se ordenan secuencialmente.
- ___ Se incluye la leyenda correspondiente.

8- Referencias

- ___ Las referencias se numeran según el orden de su aparición en el texto.
- ___ Se ordenan secuencialmente y en el formato adecuado, tal y como lo indican las normas de *Biomédica* en las instrucciones para los autores.
- ___ Cuando se citan referencias en los cuadros, éstas deben seguir el orden que se venía usando en el texto.

9- Abreviaturas y siglas

- ___ Se anotan entre paréntesis después de la primera vez que aparezcan, en forma completa y en el idioma original, los términos que se abrevian. Debe evitarse el uso y la creación de siglas que no sean universalmente reconocidas.

10- Nomenclatura

- ___ Los nombres taxonómicos de género y especie están escritos en letra cursiva.
- ___ Los nombres de microorganismos se escriben completos la primera vez que se citan, incluso en el título y en el resumen; después, se usa solamente la inicial del género y el nombre completo de la especie.

11- Consideraciones generales

- ___ Se envió carta impresa firmada por todos los autores o, en caso de autores radicados en el extranjero, una carta de remisión firmada y escaneada desde sus correos electrónicos personales.
- ___ Se incluyó el formato de declaración de conflicto de interés diligenciado por cada uno de los autores.
- ___ Se obtuvo autorización del Comité de Ética para la experimentación en humanos o animales, la cual debe incluirse al final de la sección de Materiales y métodos.
- ___ Se incluyeron el sitio y el número de registro del ensayo clínico, para la intervención y experimentación en humanos.
- ___ Los autores certifican al Comité Editorial que las personas mencionadas en los agradecimientos tienen conocimiento de dicha mención y están de acuerdo con aparecer en ellos.
- ___ Todos los manuscritos incluyen una declaración sobre la fuente de financiación.
- ___ Se envían los nombres de los cuatro evaluadores nacionales y los cuatro internacionales, con sus respectivos datos (nombre, afiliación institucional y correo electrónico).

Instructions to authors

Scope and policy

Biomédica is the quarterly journal of the *Instituto Nacional de Salud of Colombia* [Colombia's National Institute of Health]. Its main purpose is to publish the results of original research that may contribute to expand knowledge in biomedicine.

Editorial policy

Biomédica accepts and subscribes the guidelines established by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) (www.icmje.org), by the Equator Network (<http://www.equator-network.org/>) and by the Committee on Publication Ethics (COPE) (<http://publicationethics.org/>) in order to guarantee the quality of scientific publications, their transparency, integrity and full compliance with the ethical principles applicable to biomedical research.

Biomédica's policy on authorship adheres to the ICMJE guidelines, which state in this regard that:

“Authorship should be based solely on the following:

- 1) Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work;
- 2) drafting the work or revising it critically for important intellectual content;
- 3) final approval of the version to be published, and
- 4) responsibility for all aspects of the manuscript to ensure that matters concerning accuracy and completeness of any of its sections have been appropriately investigated and solved.

All authors should meet these four conditions. Fund raising, data collection or general supervision of the research group do not justify authorship.”

Biomédica will not accept the inclusion or withdrawal of any author from the original list once the manuscript has started the editorial process. In exceptional, applicable cases, it will be mandatory to obtain written consent of the author(s) whose name(s) are to be removed from or added to the manuscript. Besides, written consent should be sent stating that all authors meet authorship criteria, and that there are no other authors who meet these criteria and are not mentioned. The document should also describe in detail the contribution of each participant to the research work and to the article.

Clinical trials registration

Biomédica subscribes the policies of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journals Editors (ICMJE) regarding clinical trials registration. Therefore, it will accept for publication only those manuscripts on clinical research exhibiting the identification number from one of the clinical trial registries validated according to the criteria established by WHO and the ICMJE. The identification number and place of registry should be mentioned after the Abstract.

Copyright notice

No national or foreign publication may reproduce or translate articles or abstracts from *Biomédica* without previous written authorization by the Editorial Board.

Privacy statement

The names and e-mail addresses provided to *Biomédica* will be used exclusively for the stated purposes of this journal and will not be made available for any other purpose or to any other party.

Editorial process

All manuscripts submitted for publication to *Biomédica* will be reviewed by the Editorial Board and sent for peer review to at least two experts. To facilitate this process, authors must suggest and send via the journal on-line platform the names, institutional affiliation and e-mail addresses of four national and four international reviewers whose names should not be included in the manuscript.

Once the authors receive the reviewers' comments, they must address each comment, in addition to incorporating the corresponding modifications in the text. The authors must reply to the reviewer comments within two weeks after receiving them; if *Biomédica* has not received the authors' reply during the following four weeks, the paper will be withdrawn.

Once the paper has been accepted for publication, the Editorial Board will not accept modifications in its content, and it will request a copyright transfer statement signed by all authors. Additionally, authors should certify the quality of the English language in the manuscript or in the abstract on a document signed by an expert and sent to the journal before two weeks.

The original manuscripts of articles accepted to be published will remain in the journal files for a minimum of one year after publication. Once the paper has been accepted for publication, and after editing and style correction, authors will receive the galley proofs, which must be carefully reviewed and returned to the editors within 48 hours after receipt by the authors.

Once the paper has been published, the corresponding author will receive five free copies of the journal issue.

Biomédica is an open access journal and it includes citation metadata for all references in published articles, all of which are deposited in CrossRef (<http://www.crossref.org/>).

General information on manuscripts

Biomédica will publish scientific papers written in Spanish or English, in the following categories:

Original articles: Unpublished manuscripts resulting from biomedical research which present new information about specific aspects and provides a relevant contribution to scientific knowledge.

Short communication: Report of partial or final results of research whose rapid disclosure is of great importance.

Technical note: Detailed description of a new laboratory technique or of modifications done to an established technique, emphasizing the advantages that the process has, or the importance of the innovation developed.

Essay: A philosophical, literary, or scientific manuscript that presents an author's documented opinion about a specific topic or a topic of current interest.

Commentary: A manuscript about an article published in the journal.

History: A manuscript that places emphasis on historical personalities or facts, and their contributions to the development of biomedical sciences or health policies.

Topic review: the current state of the art on a specific topic; it includes two categories:

- 1) Requested by the Editorial Board to experts on a topic.
- 2) Presented by professionals interested in a particular topic. For this option, authors must send a proposal indicating why the topic selected is relevant to the readers of *Biomédica* including a brief description, some key references,

publications by the authors on the topic that are to be cited (mandatory), unpublished data by the authors that are to be included (mandatory), the probable size of the manuscript and the approximate number of illustrations.

In both categories, authors should include the following elements:

- An abstract with emphasis on the significance of recent findings;
- a pointed introduction to the topic showing past landmarks and present developments;
- appropriate subtitles to facilitate a better understanding of the manuscript;
- the development of the topic is left to the discretion of the authors, but they are advised to include tables, graphics and figures to provide a clearer understanding of the text. In case figures are taken partially or totally from other publications, authors must attach the permission from the copyright holder for their reproduction in *Biomédica*.

Images in biomedicine: An illustrated paper with photographs demonstrating and explaining a concept, a structure, a disease or a biomedical diagnosis. It must include a short commentary emphasizing the importance of the illustrated topic.

Make your own diagnosis: The purpose of papers presented in this category is to challenge the diagnostic ability of readers, using illustrations or photographs of clinical data, or microscopic findings. It has two parts, the clinical presentation and the corresponding findings in the first part, and the correct diagnosis in the second part. The latter should appear on a separate page and with an updated comment on the disease it highlights.

Case presentation: Clinical cases with peculiar presentations or special features of diagnostic value and a brief review of the relevant literature.

Letters to the editor: Readers can request explanations or comment on articles published in the journal. The decision to publish these letters lies on the Editorial Board.

Book review: Brief critical writings on books about health and biomedicine.

Preparation of the manuscript

Please follow the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors that are published as "Recommendations for the Conduct,

Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals” (updated December 2013) (<http://icmje.org/icmje-recommendations.pdf>).

The manuscript must include the following sections:

Presentation page: This section must include the following items:

- Manuscript title (maximum 165 characters)
- Running title for page headlines (maximum 50 characters)
- Spanish title (maximum 165 characters)
- A paragraph with the authors’ full names (include only first family name)
- The institutional affiliation of each author including the name of their group, institution, city and country. The link of authors’ names and institutional affiliation should be done using numbers in superscript. Omit positions held and academic qualifications.
- Name of corresponding author, along with postal address, telephone and fax numbers and e-mail address
- A paragraph stating authors’ specific contribution to the article.

Abstracts: The manuscript must include a structured abstract (introduction, objective, materials and methods, results and conclusions) in both Spanish and English, not longer than 250 words. The use of references is not allowed in the abstract, and the inclusion of abbreviations and acronyms is not recommended.

Key words: No more than ten key words in each language are permitted. Authors are advised to verify the English keywords in the Medical Subject Headings (MeSH) of the Index Medicus available from <http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.htm>, and the Spanish keywords in *Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS)* of the Latin American and Caribbean Health Sciences index available from <http://decs.bvs.br>

Text: All manuscripts, including the presentation page, abstracts, references, tables and titles of figures and tables, should be in double space. Leave only a single space after the end of each paragraph. Use Arial font size 12 for the text and for table and figure titles, and do not justify the text (left justified). Use italic letters for species names or scientific terms; do not underline for italicization.

Electronic format: The manuscript must be received as an MS Word™ file, preferably in the 97-2003 version. Figures should come attached to the Word document and they should be sent preferably in a 300 dpi tiff format. Graphics made with Power Point™ or MS Word programs are not acceptable because of low resolution. Illustrations are printed in a single column (75 mm) or in two columns (153 mm), therefore, illustrations must be sent in one of these two print sizes. In the case of color illustrations, please use CMYK files in a high resolution tiff format. The best resolution for CMYK files is 300 dpi if the image does not include text. If the image includes text, the recommended resolution is 600 dpi; if it is black and white, the recommended resolution is 1200 dpi. The recommended font for graphics is Helvetic. If your files are Macintosh, please convert them to one of the above formats. A complete list of the files must be sent including the names of the programs in which they were formatted.

Acknowledgements: Authors should certify that persons mentioned in the Acknowledgements have been informed and they have agreed to it. This is not required in the case of institutions.

Conflicts of interest and financial support statements: Authors must place these statements before the References section in separate paragraphs.

Biomédica subscribes the ICMJE recommendations in this respect and adopts their format for the statement of potential conflicts of interest, which should be filled out individually by each author and sent along with the letter of submission. The electronic format is available from <http://www.icmje.org/conflicts-of-interest/>.

References: Strict adherence to the guidelines of the uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals is required. A number is assigned to each reference as it appears in the manuscript, the tables and figures in ascending order. The reference numbers are placed within parenthesis (not as indices or superscripts).

Personal communications, unpublished data, manuscripts in preparation or submitted for publication, and abstracts presented at congresses or other scientific meetings must not be numbered but rather referenced in the text within parenthesis.

Consult the periodical publications list of Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov/tsd7serials7lij.html>) for exact abbreviations of journal names. If the

journal is not listed, write its full title. Include only the first six authors of the article, followed by *et al.* The inclusion of national and Latin-American references is recommended. For this purpose, please consult Lilacs, Latindex, Sibra, or Colciencia's indices, and other pertinent bibliographic sources.

The following are some examples of references from different types of publications according to the Vancouver style.

Scientific journal: The adequate way of citing scientific journals is the following (Please, check the order of the data, spacing and punctuation):

Authors (only first family name followed by first name initials) in bold. Title. Journal's abbreviated name. Year;volume:initial page-last page. <http://dx.doi.org/>

Examples:

Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*. 2004;294:15-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2004.08.008>

Sánchez J, Villada OA, Rojas ML, Montoya L, Díaz A, Vargas C, et al. Efecto del zinc aminoquelado y el sulfato de zinc en la incidencia de la infección respiratoria y la diarrea en niños preescolares de centros infantiles. *Biomédica*. 2014;34:79-91. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i1.1581>

Book or document: The adequate way of citing books or documents is the following (Please, check the order of the data, spacing and punctuation):

Authors (only first family name followed by first name initials) in bold. Title. Edition (when applicable). Place of publication: Publisher; year. Initial page-last page or total number of pages.

Example:

Bernard HR. Research methods in anthropology: Qualitative and quantitative approaches. Second edition. Thousand Oaks, CA: Sage Publications; 1994. 585 p.

Book chapter or document: The adequate way of citing book chapters or documents is the following (Please, check the order of the data, spacing and punctuation):

Authors (only first family name followed by first name initials) in bold. Title of chapter. In: name of book author(s), editor(s). Title of book. Edition (when

applicable). Place of publication: Publisher; year. Initial page - last page or total number of pages.

Example:

Restrepo A, Tobón AM, Agudelo CA. Paracoccidioidomycosis. In: Hospenthal DR, Rinaldi MG, editors. *Diagnosis and treatment of human mycoses*. 1st edition. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. p. 127-331.

Documents in web sites: The adequate way of citing documents published in web sites is the following (Please, check the order of the data, spacing and punctuation):

Authors (only first family name followed by first name initials) in bold. Title. Citation date: day, month, year. Available from: exact link to open the document.

Example:

Nucci M, Colombo AL. Clinical manifestations and diagnosis of acute/subacute paracoccidioidomycosis. UpToDate. 2012. Citation date: October 15, 2012. Available from: <http://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-acute-subacute-paracoccidioidomycosis>.

Tables and figures: Tables must be formatted using the Word processing tool for this purpose. Do not include columns or tabulations within the text of the manuscript.

Regarding microscope slides, include the staining and lens increase in the objective, but do not include the value of the ocular.

In the case of tables or figures previously published, an authorization by the copyright holder should be attached for publication in *Biomédica*.

Manuscript submission

The manuscript should be submitted to *Biomédica's* on-line platform using the link "*Información para autores*", available from <http://www.revistabiomedica.org/>. However, a printed letter signed by all authors stating that they know the contents of the manuscript, that they agree to its submission for publication in *Biomédica*, and explicitly stating that the manuscript has not been published or submitted for publication to any other journal should be sent to the following address:

Revista Biomédica
Instituto Nacional de Salud
Avenida Calle 26 No. 51-20, bloque B, oficina B-245
Bogotá D.C., Zona 6, Colombia

Authors living in foreign countries may send the letter signed and scanned via e-mail to *Biomédica's* e-mail: biomedica@ins.gov.co, explaining that they do so because they are settled abroad.

Once the printed letter of submission (in the case of local authors), or the e-mails (in the case of authors abroad) have been received at *Biomédica's* office, the editorial review process will start.

The submission of a manuscript to *Biomédica* for publication implies the acceptance by the authors of the following:

- Full knowledge and strict adherence to the instructions to authors;
- compliance with the internationally accepted authorship criteria;
- inclusion of all authors that meet authorship criteria;
- total agreement with the final version of the manuscript submitted for publication, and
- no engagement in any conduct that may be considered a transgression of the scientific integrity or the ethical principles of scientific publications.

Checklist for submitted manuscripts

For the purpose of verifying that authors have complied with *Biomédica's* publication guidelines, the corresponding author should include the following checklist along with the manuscript:

Category

- | | | |
|---|--|---|
| <input type="checkbox"/> Original article | <input type="checkbox"/> Short communication | <input type="checkbox"/> Technical note |
| <input type="checkbox"/> Topic review | <input type="checkbox"/> Historical paper | <input type="checkbox"/> Essay |
| <input type="checkbox"/> Commentary | <input type="checkbox"/> Images in biomedicine | |
| <input type="checkbox"/> Case presentation | <input type="checkbox"/> Make your own diagnosis | |
| <input type="checkbox"/> Letter to the editor | <input type="checkbox"/> Book review | |

1. Presentation

- Text written in double space, in Arial font size 12 point, on one side of letter-size pages
- Pages numbered consecutively

2. Title

- Title in Spanish and English (maximum 165 characters)
- Running title in the same language used in the text of the manuscript (Spanish or English, maximum 50 characters)
- Authors' names with institutional affiliations (do not include current positions or academic titles)
- Corresponding author's information: name, postal address, phone number, fax number, e-mail address

3. Abstracts

- Structured abstract both in Spanish and English (maximum 250 words) using the following subtitles: Introduction, Objective(s), Materials and methods, Results, Conclusion(s). The inclusion of a structured abstract applies only for original articles and short communications.

4. Keywords

- 6 to 10 per manuscript in each language
- Keywords in English previously verified in the Medical Subject Headings (MeSH) of Index Medicus available from <http://www.nlm.nih.gov/mesh7meshhome.htm>, and Spanish keywords verified in *Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS)* of the Latin American and Caribbean Health Sciences index available from <http://decs.bvs.br>

5. Structure of an original article, technical note or short communication

Include the following sections:

- Introduction
- Materials and methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgements
- Conflicts of interest statement
- Financial support statement

___ References

___ Tables and figures with their corresponding titles.

6. Figures

___ Figures should go on a separate page with its corresponding title

7. Tables

___ Tables should go on a separate page, in Word format using font Arial size 10 and single space

___ Tables should be numbered consecutively in their order of appearance in the text

___ Include titles for all tables and figures.

8. References

___ References should be numbered consecutively according to the order of citation in the text.

___ *Biomedica*'s guidelines for citing references must be followed strictly.

___ If references are cited in tables or figures, please continue with the consecutive order used in the text.

10. Use of abbreviations and acronyms

___ Write the complete term in its original language with the corresponding abbreviation in parenthesis.
Avoid using abbreviations and acronyms that are not universally accepted.

11. Nomenclature

___ Names of genus and species are written in italics

___ Microorganisms scientific names should be written in full the first time they appear in the text, as well as in the title and in the abstracts; after, just use the first letter of the genus followed by a dot and the complete name of the species.

12. General considerations

___ Printed letter of submission signed by all authors. In the case of authors living abroad, the letter should be signed, scanned and sent from their personal e-mails.

___ Conflicts of interest statement in the corresponding form filled out by each author.

___ Manuscripts presenting results from research conducted on human subjects or animals include an explicit statement that ethical clearance was requested and obtained from an institutional ethics committee. This statement goes at the end of the Materials and methods section.

___ Site and registration number for clinical trials in human subjects.

___ Authors certify that the persons whose names are mentioned in the Acknowledgements section are fully aware of this and agree to their inclusion.

___ The financial support statement was included.

___ The names, institutional affiliation and e-mails of the four national and four international reviewers suggested by the authors were included in the letter of submission.