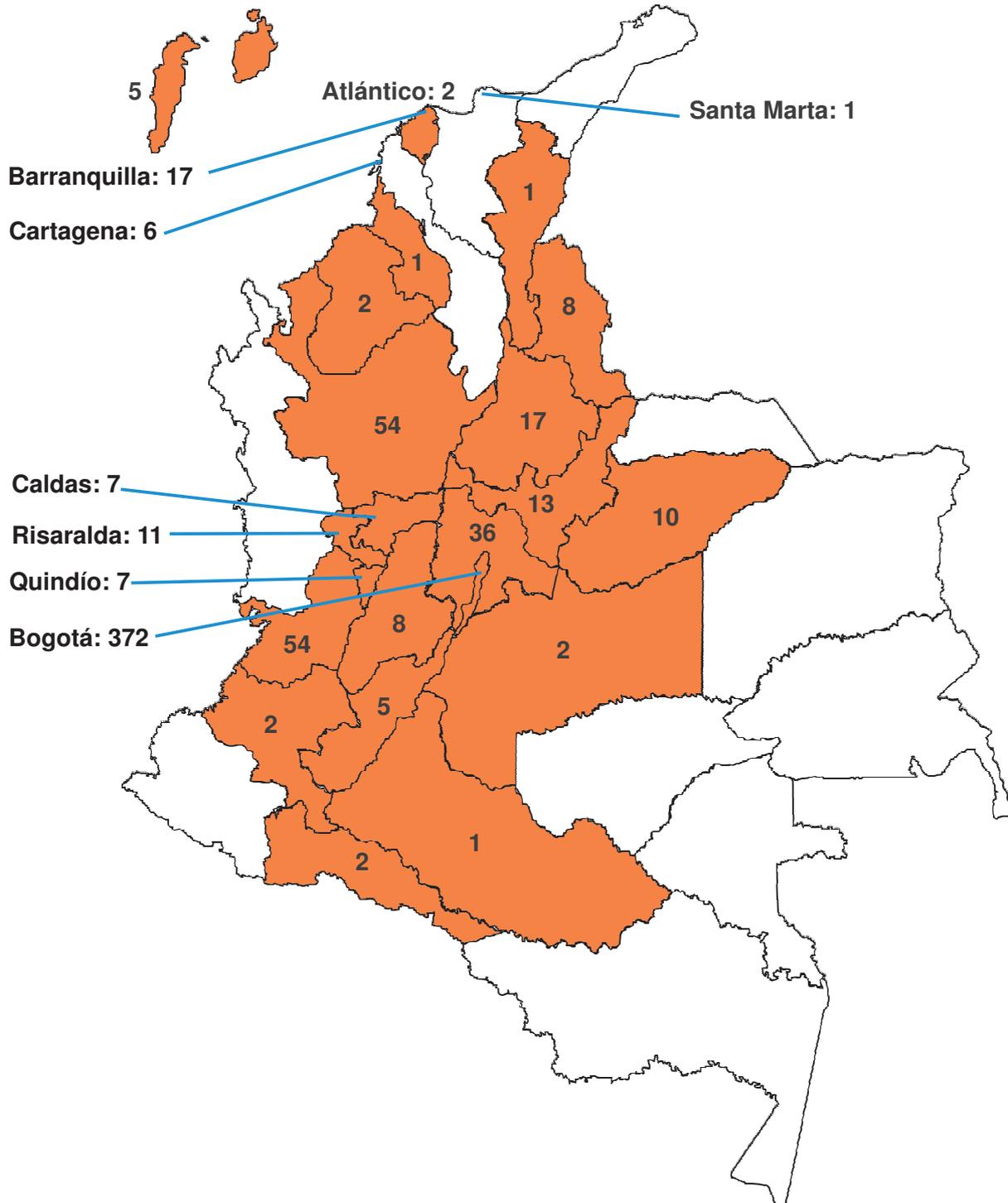


Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

Volumen 29, No.3 - Septiembre, 2009

Bogotá, D.C., Colombia, S.A.



Portada: Colombia: 644 casos confirmados de influenza por virus pandémico A H1N1/09, en 21 departamentos y 4 distritos. Grupo ASIS-Vigilancia, Boletín 126, semana 35 de 2009, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 29, No. 3, Bogotá, D.C., Colombia - Septiembre, 2009

Comité Editorial

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

CARLOS ARTURO HERNÁNDEZ
Bogotá, D.C., Colombia

RUBÉN SANTIAGO NICHOLLS
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia
Organización Panamericana de la Salud
Washington, D.C., Estados Unidos

EDITORES ASOCIADOS

ENRIQUE ARDILA
Bogotá, D.C., Colombia

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

MARÍA CRISTINA FERRO
Investigadora Emérita
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

MIGUEL A. GUZMÁN
Bogotá, D.C., Colombia

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

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

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

SECRETARIA DEL COMITÉ LINDA GRACE MOLANO

Comité Científico

ARNOLDO BARBOSA RAMÍREZ
Hospital Clínic, Universidad de
Barcelona, Barcelona, España
Centro de Investigaçãõ Em Saude
Da Manhiça, Manhiça, Mozambique

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

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

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

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

GUSTAVO ROMÁN
University of Texas
San Antonio, TX, Estados Unidos

PEDRO ROMERO
Ludwig Institute for Cancer
Research, Lausanne branch
Lausana, Suiza

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

GIOCONDA SAN BLAS
Instituto Venezolano de
Investigaciones Científicas
Caracas, Venezuela

ÁLVARO SANABRIA
Universidad de la Sabana
Fundación Abood Shaio
Bogotá, D.C., Colombia

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

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

ROBERT TESH
University of Texas
Galveston, TX, ESTADOS UNIDOS

BRUNO TRAVI
University of Texas
San Antonio, TX, Estados Unidos

GUSTAVO VALBUENA
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

JUAN MIGUEL VILLALOBOS
Universidade Federal de Rondônia
Porto Velho, Brasil

JOHN WALKER
Cideim
Cali, Colombia
Universidad de Derby
Derbyshire, Reino Unido

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

© 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 *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

Contenido

Editorial

- Influenza pandémica 2009-2010, ¿en qué podemos mejorar la respuesta?
Fernando De la Hoz337

Presentación de caso

- Hemotórax espontáneo: una forma inusual de presentación de la porfiria intermitente aguda
Juliana Buitrago, Sandra Viviana Santa339

- Adenoma del oído medio
Edwin Abraham Medina, Viviana Leticia Arias348

Artículos originales

- Efectividad de la citología cérvico-uterina para la detección temprana de cáncer de cuello uterino en el marco del sistema de salud de Colombia
Raúl Murillo, Ricardo Cendales, Carolina Wiesner, Marion Piñeros, Sandra Tovar354

- Eficacia del Orbscan II® y Pentacam® en la evaluación de los mapas de elevación en candidatos a cirugía refractiva mediante un análisis de repetibilidad
María Ximena Núñez, Claudia Blanco362

- Detección de efectos secundarios asociados a la administración de tramadol y dipirona en un hospital de alta complejidad
Giovanny Alberto Montoya, Claudia Vaca, María Fernanda Parra369

- Diferencias de sexo, edad y lípidos plasmáticos asociadas al polimorfismo de la apolipoproteína E en un grupo de escolares de Quindío, Colombia
Patricia Landázuri, Nelsy Loango, Martha Lucía Gallego, Beatriz Restrepo382

- Impacto de un botadero a cielo abierto en la presentación de síntomas respiratorios y en costos familiares de atención en salud de niños entre 1 y 5 años en Cali, Colombia
Sandra Lorena Girón, Julio César Mateus, Fabián Méndez392

- Identificación de algunos genes asociados al proceso de germinación de la conidia al micelio en *Paracoccidioides brasiliensis*
Ana María García, Orville Hernández, Beatriz H. Aristizábal, Luz Elena Cano, Ángela Restrepo, Juan G. McEwen403

- Caracterización preliminar de los sitios de cría de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) en el municipio de Leticia, Amazonas, Colombia
José Joaquín Carvajal, Ligia Inés Moncada, Mauricio Humberto Rodríguez, Ligia del Pilar Pérez, Víctor Alberto Olano413

- Brote de rabia urbana transmitida por perros en el distrito de Santa Marta, Colombia, 2006-2008
Andrés Páez, Gloria Rey, Carlos Agudelo, Álvaro Dulce, Édgar Parra, Hernando Díaz-Granados, Damaris Heredia, Luis Polo424

- Supervivencia de pacientes con cáncer de cuello uterino tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología
Constanza Pardo, Ricardo Cendales437

- Susceptibilidad *in vitro* de cepas de *Trypanosoma cruzi* a hexadecilfosfolina (miltefosina), nifurtimox y benznidazole aisladas en Santander, Colombia
Katherine Paola Luna, Indira Paola Hernández, Cesar Mauricio Rueda, María Magdalena Zorro, Simon L. Croft, Patricia Escobar448

- Evaluación de los efectos del glifosato y otros plaguicidas en la salud humana en zonas objeto del programa de erradicación de cultivos ilícitos
Marcela Varona, Gloria Lucía Henao, Sonia Díaz, Angélica Lancheros, Álix Murcia, Nelcy Rodríguez, Víctor Hugo Álvarez456

- Presencia de anticuerpos contra neuroreceptores cardiacos de acetilcolina muscarínicos tipo II en pacientes con enfermedad de Chagas e implantación de marcapasos
Nubia Catalina Tovar, María Clara Echeverry, Guillermo Mora476

Revisión de tema

- Las metacaspasas y su rol en la vida y muerte de los parásitos protozoarios humanos
Iveth J. González485

Instrucciones para los autores

Contents

Editorial

- Pandemic influenza, 2009-2010: ¿how can we improve the response?
Fernando De la Hoz337

Case presentation

- Acute intermittent porphyria presenting as spontaneous hemothorax
Juliana Buitrago, Sandra Viviana Santa339
- Middle ear adenoma
Edwin Abraham Medina, Viviana Leticia Arias348

Original articles

- Effectiveness of cytology-based cervical cancer screening in the Colombian health system
Raúl Murillo, Ricardo Cendales, Carolina Wiesner, Marion Piñeros, Sandra Tovar354
- Efficacy of Orbscan II® and Pentacam® topographers by a repeatability analysis when assessing elevation maps in candidates to refractive surgery
María Ximena Núñez, Claudia Blanco362
- Adverse events associated with tramadol and dipirona administration in a level III hospital
Giovanny Alberto Montoya, Claudia Vaca, María Fernanda Parra369
- Gender, age and plasma lipids differences associated with apolipoprotein E polymorphism in school children
Patricia Landázuri, Nelsy Loango, Martha Lucía Gallego, Beatriz Restrepo382
- Impact of an open waste disposal site on the occurrence of respiratory symptoms and on health care costs of children
Sandra Lorena Girón, Julio César Mateus, Fabián Méndez392
- Identification of genes associated with germination of conidia to form mycelia in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*
Ana María García, Orville Hernández, Beatriz H. Aristizábal, Luz Elena Cano, Ángela Restrepo, Juan G. McEwen403

- Characterization of *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) larval habitats near the Amazon River in Colombia
José Joaquín Carvajal, Ligia Inés Moncada, Mauricio Humberto Rodríguez, Ligia del Pilar Pérez, Víctor Alberto Olano413
- Outbreak of urban rabies transmitted by dogs in Santa Marta, northern Colombia
Andrés Páez, Gloria Rey, Carlos Agudelo, Álvaro Dulce, Édgar Parra, Hernando Díaz-Granados, Damaris Heredia, Luis Polo424
- Survival analysis of cervical cancer patients
Constanza Pardo, Ricardo Cendales437
- In vitro* susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole
Katherine Paola Luna, Indira Paola Hernández, Cesar Mauricio Rueda, María Magdalena Zorro, Simon L. Croft, Patricia Escobar448
- Effects of aerial applications of the herbicide glyphosate and insecticides on human health
Marcela Varona, Gloria Lucía Henao, Sonia Díaz, Angélica Lancheros, Álix Murcia, Nelcy Rodríguez, Víctor Hugo Álvarez456
- Presence of antibodies to cardiac neuroreceptors in patients with Chagas disease
Nubia Catalina Tovar, María Clara Echeverry, Guillermo Mora476
- Topic review**
Metacaspases and their role in the life cycle of human protozoan parasites
Iveth J. González485
- Instructions for authors

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 29, No. 3, Bogotá, D.C., Colombia - Septiembre, 2009

Editorial

Influenza pandémica 2009-2010, ¿en qué podemos mejorar la respuesta?

En abril de 2009, en varias ciudades de México y Estados Unidos se detectó un nuevo virus de influenza A H1N1 que afectaba a los humanos. Inicialmente se logró comprobar que este agente era lo suficientemente diferente del virus estacional A H1N1 como para considerarlo una potencial cepa pandémica y, posteriormente, su contagiosidad y capacidad de propagación alrededor del mundo hizo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) declarase que, en efecto, el mundo estaba sufriendo de una nueva pandemia de influenza después de 40 años. Hasta el momento, el comportamiento clínico del virus ha sido moderado, dado que su virulencia parece ser bastante similar a la de las cepas estacionales, pero con los conocimientos actuales no se puede descartar que en el futuro se presenten comportamientos más agresivos con una letalidad mayor (1,2).

Aunque los organismos internacionales llevaban varios años preparando a los países para enfrentar una pandemia de influenza y existían avances en la preparación para enfrentar esta amenaza, el comportamiento epidemiológico del virus ha develado que los niveles de respuesta de los países son claramente desiguales. Para el 12 agosto de 2009, la OMS reportó la identificación de casi 180.000 casos de influenza por el virus nuevo y cerca de 1.500 muertes asociadas a ese agente. Llamaba la atención que más de 50% de los casos y de las muertes reportadas habían ocurrido en las Américas, mientras que regiones como África y el Medio Oriente aportaban menos de 3.000 casos y 10 muertes (3).

Esta desigualdad en el reporte pone de presente que, pese a los esfuerzos de la OMS y de sus organismos adscritos, el mundo no estaba completamente preparado para enfrentar la pandemia, aun de un virus relativamente benigno, en un aspecto más que fundamental como es el de la vigilancia virológica y epidemiológica. Este vacío en la preparación se nota no sólo en la carencia de reportes de sitios que deben tener casos, sino también en la ausencia de una directriz sobre la forma de definir los casos, las muertes y sobre cómo ejercer la vigilancia según los diferentes escenarios epidemiológicos.

A nivel regional, el patrón de agudas diferencias en el acceso al diagnóstico y en los procedimientos de vigilancia se repite si observamos las cifras divulgadas por la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Países geográficamente comparables, como Chile y Argentina, muestran diferencias abismales en el reporte epidemiológico ya que Chile, con una población mucho más pequeña, reporta 12.000 casos mientras que Argentina no llega a 7.000. Cosa similar sucede en el área andina, donde Ecuador, Perú y Venezuela reportan muchos más casos que Colombia, que tiene una población sustancialmente mayor que cualquiera de ellos (4).

En el interior de Colombia nuevamente se repite el vacío en la información epidemiológica válida y oportuna que permita tomar decisiones en el futuro, como, por ejemplo, sobre la necesidad de vacunar contra el virus o no hacerlo. A 31 de julio el país reportaba 270 casos de influenza y 17 fallecimientos, la gran mayoría en Bogotá, que sólo concentra el 11% de la población. Pese a que, indudablemente, el país ha tenido una respuesta adecuada en la atención de los enfermos y en el aprovisionamiento de medicamentos para hacer frente a la amenaza, y a los avances en la capacidad local para estudiar mejor los aspectos moleculares del virus, el aspecto de la vigilancia debe ser revisado y reestructurado (5).

Los aspectos anteriormente mencionados ponen de presente que la vigilancia en salud pública sigue siendo una de las principales debilidades en la respuesta a la epidemia en el nivel global, regional

y nacional. Este componente de la respuesta debe ser fortalecido rápidamente porque, como se ha demostrado en pandemias anteriores, es muy posible que nos enfrentemos en el futuro cercano a nuevas ondas epidémicas del virus con comportamientos más virulentos y es necesario que el país pueda identificar rápidamente el comienzo de estas ondas en cualquier lugar donde se presenten. De la identificación rápida de variantes más virulentas de la cepa pandémica depende en gran parte la reducción del impacto, en términos de muertes y sufrimientos, y la aplicación de medidas de control o prevención a gran escala, así como la evaluación del impacto de esas medidas (6).

Otro aspecto que necesita decisiones rápidas tiene que ver con la introducción de vacunas contra el virus pandémico A H1N1. Varias empresas multinacionales han anunciado que en pocos meses tendrán lista una vacuna contra el nuevo virus A H1N1 y diferentes países, especialmente desarrollados, han manifestado su interés en comprar la vacuna para proteger a sus poblaciones. De ser así, sería la primera vez que en años recientes una vacuna nueva es usada masivamente sin suficientes pruebas de campo para establecer su seguridad, eficacia y costo-efectividad, todo justificado en aras de proteger a la población de una amenaza real e inmediata. Por estas razones, la decisión sobre la introducción masiva de esa vacuna representa un reto para los países menos desarrollados, donde los escasos recursos deben dirigirse prioritariamente a acciones que se sabe que funcionan y que salvan vidas, y la decisión sobre la introducción de la vacuna debe ser evaluada cuidadosamente contra las posibilidades no sólo económicas del país sino, también, contra la capacidad logística de aplicar un número importante de dosis antes de que empiece una segunda onda epidémica del virus pandémico. Los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) de los Estados Unidos han recomendado recientemente que la vacunación contra el virus pandémico no debe reemplazar ni desplazar la vacunación contra los virus estacionales, lo que complicaría aún más la factibilidad de la vacunación masiva contra el virus pandémico.

Estos dos aspectos, el fortalecimiento de la vigilancia y la decisión de la introducción de la nueva vacuna contra el virus pandémico, deben ser una prioridad para enfrentar la nueva onda de influenza y, por ello, se requiere que los organismos multilaterales lideren los acuerdos entre los países y en su interior, de manera que exista una respuesta racional que permita reducir al máximo el impacto del evento con la inversión más razonable y factible (7,8).

Fernando De la Hoz

Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Referencias

1. **Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, et al.** Emergence of a novel swine origin influenza A H1N1 virus in Humans. *N Engl J Med.* 2009;360:2605-15.
2. **Trifonov V, Khiabani H, Rabadan R.** Geographic dependence, surveillance and origins of the 2009 influenza A H1N1 virus. *N Engl J Med.* 2009;361:115-9.
3. **World Health Organization.** Pandemic influenza A H1N1. Update 61. Fecha de consulta: 17 de agosto de 2009. Disponible en: http://www.who.int/csr/don/2009_08_12/en/index.html.
4. **Panamerican Health Organization.** Actualización regional. Pandemia H1N1 2009. Fecha de consulta: 14 de agosto de 2009. Disponible en: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=view&id=1702&Itemid=1167.
5. **Ministerio de la Protección Social.** Informe de prensa 103 de 2009. Fecha de consulta: 17 de agosto de 2009. Disponible en: <http://www.minproteccionsocial.gov.co/VBeContent/NewsDetail.asp?ID=18841&IDCompany=3>.
6. **Miller M, Viboud C, Balinska M, Simonsen L.** The signature features of influenza pandemics. Implications for policy. *N Engl J Med.* 2009;360:2595-8.
7. **Centers for Disease Control and Prevention.** Novel H1N1 vaccination recommendations. Fecha de consulta: 17 de agosto de 2009. Disponible en: <http://www.cdc.gov/h1n1flu/vaccination/acip.htm>.
8. **Yamada T.** Poverty, Wealth, and access to pandemic influenza vaccines. *N Engl J Med.* 2009. Fecha de consulta: 17 de agosto de 2009. Disponible en: <http://content.nejm.org/cgi/content/full/NEJMp0906972>

PRESENTACIÓN DE CASO

Hemotórax espontáneo: una forma inusual de presentación de la porfiria intermitente aguda

Juliana Buitrago¹, Sandra Viviana Santa²

¹ Área Quirúrgica, Programa de Medicina, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia

² Programa de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia

Las porfirias son un grupo de alteraciones metabólicas de la síntesis del hem, de carácter hereditario. Son condiciones relativamente raras, de difícil diagnóstico, pero con una respuesta impresionante al tratamiento y con buen pronóstico, si se identifican y tratan a tiempo. La más común de las formas agudas es la porfiria intermitente aguda.

Se presenta el caso de un hombre de 23 años que consultó por dolor abdominal y que, concomitantemente presentaba un hemotórax espontáneo de dos litros, presentación inusual nunca antes descrita para la porfiria intermitente aguda.

Se incluye una breve revisión de los aspectos más relevantes de la porfiria intermitente aguda, epidemiología, diagnóstico, clínica y manejo, además de una serie de reflexiones sobre cómo sospechar tempranamente el diagnóstico.

Palabras clave: hemotórax, porfiria intermitente aguda, abdomen agudo, dolor abdominal, porfobilinógeno, sintasa de hidroximetilbilano.

Acute intermittent porphyria presenting as spontaneous hemothorax

The porphyrias are inherited disorders of the heme biosynthetic pathway. They are relatively rare and often misdiagnosed; however, acute episodes can be curtailed by early administration of heme arginate. Acute intermittent porphyria is the commonest of acute forms of porphyria. Here, a case is presented of a 23-year-old male with acute intermittent porphyria who came to the emergency clinic with an unexplained abdominal pain. In addition, he exhibited spontaneous hemothorax (two liters of blood accumulated in the chest) as an unusual manifestation of the disease. The most relevant aspects of acute intermittent porphyria are discussed, along with its epidemiology, diagnosis, clinical presentation and treatment. Complexities and diagnostic requirements in making a diagnosis of porphyria are described.

Key words: hemothorax; porphyria, acute intermittent; abdomen, acute; abdominal pain, porphobilinogen, hydroxymethylbilane synthase.

Caso clínico

Se presenta el caso de un hombre de 23 años de edad que consultó inicialmente a una institución de segundo nivel por un cuadro clínico de once días de evolución, de dolor abdominal

persistente tipo cólico, acompañado de poliuria y estreñimiento. En urgencias fue tratado con solución salina isotónica intravenosa y analgesia, con leve mejoría de su dolor y fue dado de alta. Volvió a consultar tres días después por persistencia e intensificación del dolor y ausencia de deposición desde una semana antes.

Correspondencia:

Juliana Buitrago, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira, La Julita, Pereira, Colombia.

Teléfonos: 333 0014, 335 6342, extensión 321; fax: 313 7125.

julianabuitrago@yahoo.com

Se encontró taquicárdico, deshidratado, con presión arterial de 160/100 mm Hg, presión arterial media de 121 mm Hg, frecuencia cardíaca de 118 por minuto, frecuencia respiratoria de 35 por minuto, con evidente disnea, sin tos y, a la auscultación, hipoventilación basal izquierda;

Recibido: 16/04/08; aceptado:05/03/09

presentaba distensión abdominal pero sin signos de irritación peritoneal.

En las ayudas diagnósticas se encontró: un cuadro hemático con 7,7 de hemoglobina, 9.000 leucocitos y 402.000 plaquetas; amilasa de 130 U/L, glucemia de 186 mg/dl, sodio de 129 mEq/L y potasio de 2,5 mEq/L; en la radiografía de tórax se observó opacidad del hemitórax izquierdo indicativa de derrame pleural masivo izquierdo.

Fue valorado por el cirujano de turno quien solicitó una ecografía abdominal que reportó: "Imagen con características ecográficas homogéneas a nivel del receso costo-diafragmático posterior en el lado izquierdo en la base del campo pulmonar, que produce desplazamiento anterior del bazo. Hay importante distensión de asas abdominales". Se realizó toracentesis con la que se obtuvo sangre, por lo que se colocó tubo de toracostomía y se drenó en forma espontánea 2.000 ml de hemotórax. Además, se realizó una minuciosa investigación buscando posibles causas del hemotórax, como alteraciones de la coagulación, aneurisma de arteria esplénica, aneurismas de arteria intercostal, etc. mediante pruebas hematológicas y tomografía axial computadorizada con contraste de tórax y abdomen. Sin embargo, no se halló un factor causal del hemotórax, tampoco tumores o ninguna otra alteración en tórax o abdomen.

El paciente evolucionó favorablemente con mejoría de su dolor y disminución progresiva del drenaje torácico hasta retirarse el tubo sin complicación. Se tomó radiografía de tórax de control, en la que se encontró reexpansión pulmonar, sin alteraciones del parénquima y adecuada evacuación del hemotórax. Se hizo interconsulta a medicina interna para buscar la causa de su dolor abdominal asociado a hemotórax e hipertensión, con la convicción de que su dolor abdominal no estaba originado por una causa quirúrgica y que debía buscarse una causa médica a los síntomas, una noxa sistémica que estuviera afectando al paciente. El médico internista de turno realizó pruebas de coagulación y, al no hallar ninguna alteración alguna, decidió darlo de alta por medicina

interna y el paciente egresó del hospital con acetaminofén e ibuprofeno.

Dos meses después, volvió a consultar por un episodio igual, más coluria. Una ecografía abdominal reportó hepato-esplenomegalia y edema periportal, por lo que el paciente fue remitido a tercer nivel para valoración por un médico internista. Casualmente, una muestra de orina cambió de color y se tornó oscura, por lo que el internista solicitó concentración de protoporfobilinógeno en orina.

El paciente permaneció hospitalizado con persistencia de su dolor abdominal y vómito ocasional, con deterioro progresivo de su estado general. Nueve días después se averiguó en el laboratorio por el examen solicitado y la bacterióloga informó que "no hay reactivos y hay que esperar".

Al día 11 de hospitalización, presentó cuadriparexia con arreflexia generalizada y convulsiones. Para ello, recibió dextrosa en agua destilada al 5% y captopril sublingual. En el día 13 presentó diálogo incoherente y empeoramiento de su estado general. Fue remitido a la unidad de cuidados intensivos, en donde encontraron al paciente con disfagia, no hablaba, no tosía y presentaba hiponatremia grave, compactación fecal e imposibilidad para abrir los párpados. Se intubó y se conectó a un respirador.

Dos días después en la unidad de cuidados intensivos presentó aspirados mucopurulentos y murmullo vesicular rudo a la auscultación. Una electromiografía confirmó polineuropatía y radiculopatía. El reporte de porfobilinógeno fue positivo en orina, llegó 19 días después de solicitado.

Veinte días después se indicó iniciar hematina 4 mg/kg diarios por 4 días. Además, se realizó traqueostomía. El paciente presentó síndrome de respuesta inflamatoria sistémica con hemocultivos positivos para *Serratia* spp. y *Acinetobacter baumani*. Se iniciaron antibióticos con diagnóstico de sepsis por catéter. El urocultivo fue positivo para *Escherichia coli*. Presentó un grave estado de desnutrición más síndrome de pérdida de la condición física; también, presentó melenas, ansiedad, irritabilidad y deseos de

muerte, por lo que fue valorado por psiquiatría y se inició fluoxetina y clonazepam. Finalmente, presentó neumonía basal izquierda y falleció pocos días después.

Durante las diferentes hospitalizaciones el paciente recibió lidocaína local, dipirona, dalteparina, trimetoprim-sulfametoxazol, clonazepam, midazolam, diazepam, warfarina, alprazolam, hidrocortisona, piperazina, tazobactam y cefalosporinas de todas las generaciones.

Revisión de la literatura

Las porfirias conforman un grupo de alteraciones metabólicas de la biosíntesis del hem, de carácter hereditario. Son causadas por una deficiencia

parcial de una de las siete enzimas en la vía de formación del grupo hem, que lleva a acumulación de porfirinas y precursores de porfirinas. Cada tipo de porfiria se caracteriza por un patrón único de acumulación y excreción de precursores del hem, secundario a la reducción de la enzima específica para ese paso (figura 1).

La prevalencia de la porfiria varía ampliamente de país a país y, también, según el tipo de porfiria. Los reportes oscilan entre 0,2 y 5 por 100.000 habitantes (1). En Latinoamérica parece ser baja la prevalencia, según reportes de Argentina (1:125.000) (2). En Colombia, es una entidad poco frecuente. Además, se sabe que hay muchos portadores asintomáticos; esto ha

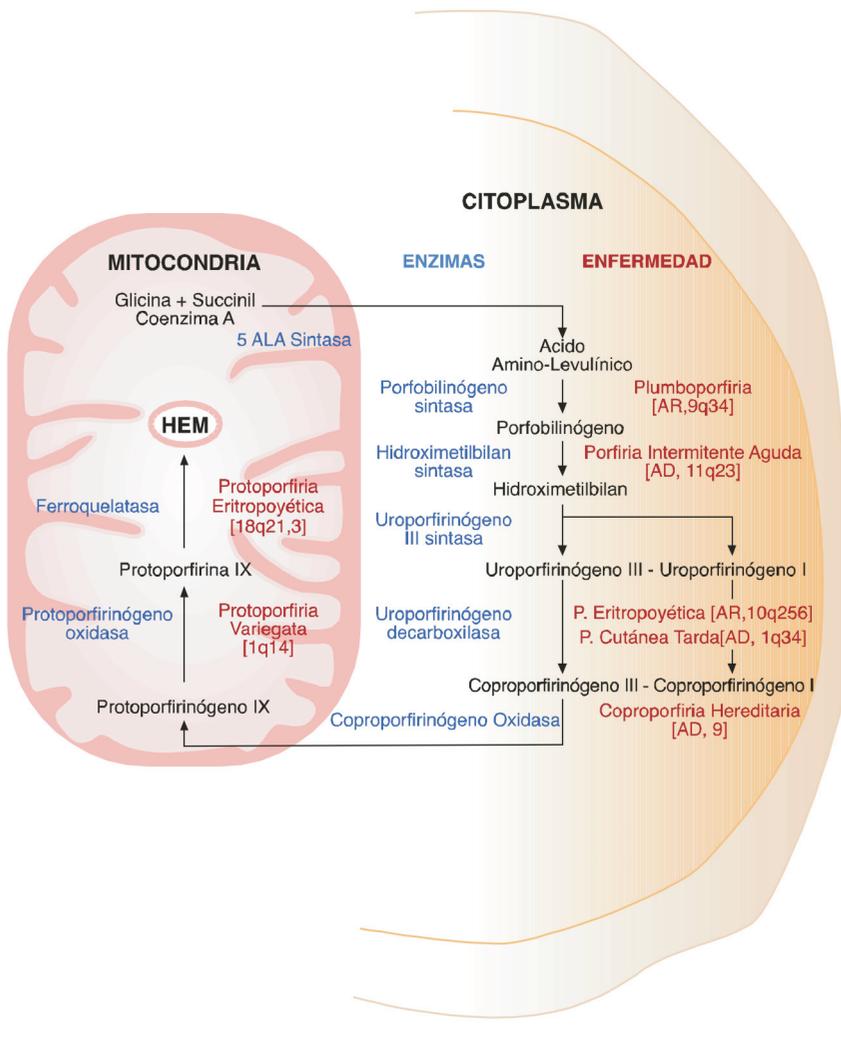


Figura 1. Síntesis del grupo hem. Enzimas requeridas en cada paso a la izquierda en azul y consecuente proceso patológico clínico derivado del déficit parcial de la correspondiente enzima a la derecha. Entre corchetes, se ilustra el tipo de herencia así: AD, autosómica dominante; AR, autosómica recesiva.

Cuadro 1. Clasificación de las porfirias de acuerdo con su forma de presentación clínica.

Clasificación de las porfirias
Neuropsiquiátricas
Porfiria intermitente aguda Plumboporfiria
Dermatológicas
Porfiria eritropoyética congénita Porfiria cutánea tarda Protoporfiria eritropoyética
Formas mixtas
Coproporfiria hereditaria Porfiria variegata

hecho difícil identificar la verdadera prevalencia de la porfiria en el mundo.

Hay siete tipos de porfiria que se clasifican, de acuerdo con los rasgos clínicos, en neuropsiquiátrica, dermatológica y formas mixtas (cuadro 1). Se presenta de cuatro a cinco veces más frecuentemente en mujeres (3).

La porfiria se presenta en tres formas diferentes: con lesiones cutáneas, con ataques agudos o ambos. Entre las que se presentan con ataques agudos, están la porfiria intermitente aguda, la porfiria *variegata*, la coproporfiria hereditaria y la plumboporfiria. Por el contrario, a menudo la única presentación clínica de las formas cutáneas son las lesiones en piel. La edad de presentación está usualmente alrededor de los 30 años (entre los 18 y los 40); los ataques son raros en la pubertad. En las mujeres, los ataques agudos ocurren, generalmente, antes de la menstruación o en el embarazo.

La porfiria intermitente aguda es la forma más frecuente entre las porfirias agudas (3). Es una enfermedad autosómica dominante que resulta del defecto en la enzima deaminasa de porfobilinógeno o sintasa de hidroximetilbilan, que aceleran la conversión de porfobilinógeno a hidroximetilbilan. El síntoma más común es el dolor abdominal, que puede acompañarse de síntomas psiquiátricos o neurológicos. En general, los síntomas que acompañan al cuadro clínico de la porfiria intermitente aguda pueden ser, en orden de frecuencia: dolor abdominal (97%), taquicardia (80%), orinas oscuras (>70%), neuropatía motora periférica (60%),

estreñimiento (casi 50%), náuseas y vómito (42%), cambios mentales (40%), hipertensión (casi 40%), ausencia de reflejos (<30%), dolor de espalda (<30%), neuropatía sensitiva (25%), hipotensión postural (21%), convulsiones (20%), dolor torácico (12%) y coma (10%) (4,5).

Todavía no se han aclarado la fisiopatología de la enfermedad y la forma como el incremento en las porfirinas y sus precursores causan el daño. Existen algunas hipótesis que incluyen la presencia de radicales libres (6), la neurotoxicidad directa por el ácido amino-levulínico (7) y la deficiencia de hem en el tejido neurológico (8). Sin embargo, sólo 10% a 15% de los portadores del gen desarrollan la porfiria y en una tercera parte de los pacientes no se identifican antecedentes familiares, ya que probablemente la condición permanece latente por varias generaciones (3).

Los ataques agudos son desencadenados por exposición a factores precipitantes como ingestión de drogas ilícitas (anfetaminas, cocaína y sus derivados), alcohol, ayuno, estrés, infecciones, tabaquismo, tratamiento con hormonas sexuales y medicamentos prescritos, entre los que se encuentra una lista de fármacos asociados y otros que no han sido confirmados pero que producen preocupación porque podrían estar asociados con el desencadenamiento de las crisis de porfiria (3). En el cuadro 2 se hallan algunos fármacos de uso frecuente que se han asociado a las crisis y, en el cuadro 3, algunos cuya asociación es controversial, pero se recomienda no suministrarlos, ya que no han sido declarados como de uso seguro en los pacientes con porfiria (1). En general, se contraindican los medicamentos que incrementan la actividad del sistema p450 en el hígado (1). No obstante, en algunos pacientes no se puede identificar ningún factor desencadenante. De otro lado, la frecuencia y gravedad de los ataques también varían ampliamente. En algunos casos, los ataques pueden amenazar la vida pero también se han identificado pacientes en los que la enfermedad permanece latente a través de la vida, aun en presencia de factores precipitantes.

Cuando un paciente con porfiria intermitente aguda identificada presenta síntomas, debe

Cuadro 2. Listado de medicamentos que se han asociado con ataques agudos de porfiria. No deben suministrarse a pacientes con porfiria confirmada o sospechada (1).

Fármacos asociados con ataques agudos de porfiria	
Acido flufenámico	Hidroclorotiazida
Acido nalidíxico	Hioscina
Amitriptilina	Imipramina
Anticonceptivos orales	Levonorgestrel
Barbitúricos	Linestrenol
Carbamazepina	Lisinopril
Cloramfenicol	Medroxiprogesterona
Clorpropamida	Metildopa
Dapsone	Metoclopramida
Diclofenaco	Nandrolona
Difenhidramina	Nifedipina
Dihidroergotamina	Nitrofurantoina
Dimenhidrinato	Noretisterona
Enalapril	Oxifenbutazona
Ergotamina	Oxymetazolina
Eritromicina	Piroxicam
Espironolactona	Progesterona
Etanol	Rifampicina
Fenilbutazona	Simvastatina
Fenitoína	Sulfadiazina
Fenobarbital	Sulfametoxazol
Furosemida	Sulfazalacina
Glibenclamida	Sulfonilureas
Griseofulvina	Tamoxifeno
Halotano	Teofilina
Hidantoinas	Tolbutamida
Hidralacina	Verapamilo

aclararse si se deben a la porfiria o a alguna otra condición concomitante. Para esto, conviene saber que los ataques agudos de porfiria se asocian invariablemente a aumento de la excreción urinaria de ácido amino-levulínico y porfobilinógeno. Con frecuencia, la orina es oscura debido a la polimerización del porfobilinógeno a porfirinas y otros pigmentos. Entre los ataques, los niveles pueden ser normales. El diagnóstico de porfiria se hace al demostrar aumento de la excreción urinaria de porfobilinógeno. Si éste es normal en un paciente con síntomas, se excluye el diagnóstico. Un error frecuente es ordenar la cuantificación de porfirina en orina, examen que puede no incluir la búsqueda del porfobilinógeno como precursor de porfirina, y éste debe ser solicitado específicamente.

Los exámenes imaginológicos no son de ayuda en el diagnóstico de la porfiria intermitente aguda, porque son inespecíficos. Las radiografías

de abdomen pueden mostrar un íleo. La tomografía axial computadorizada de cerebro puede ser normal o mostrar edema si ha habido convulsiones.

Se estima que 1% de los ataques agudos son fatales (3). El manejo incluye la hospitalización. Los medicamentos identificados como asociados a ataques agudos o con evidencia controversial de asociación a ataques agudos, no deben suministrarse en estos pacientes. Si hay dolor, los opiáceos, como la morfina, son seguros. La clorpromazina puede ser útil para mejorar el sueño y promover la relajación. La taquicardia y la hipertensión pueden manejarse con propanolol. Si se presentan convulsiones, pueden deberse a hiponatremia. Así, los electrolitos y la osmolaridad deben verificarse constantemente. Las

Cuadro 3. Listado de medicamentos que tienen evidencia controversial con ataques agudos de porfiria. Hay recomendación de evitar su suministro a pacientes con porfiria confirmada o sospechada (1).

Fármacos con evidencia experimental controversial de asociación con ataques agudos de porfiria, pero considerados de riesgo para pacientes con porfiria.

Acido mefenámico	Flunitrazepam
Alprazolam	Flurazepam
Aminofilina	Haloperidol
Amiodarona	Hioscina
Anfetaminas	Isoniacida
Bromocriptina	Ketoconazole
Captopril	Loprazolam
Cefalosporinas	Mepivacaina
Cinarizina	Mercaptopurina
Ciclofosfamida	Metanfetamina
Ciclosporina	Metrotexate
Clemastina	Miconazol
Clonazepam	Minoxidil
Cloroformo	Nitrazepam
Cocaína	Nortriptilina
Colistina	Novobiocina
Danazol	Oxicodona
Derivados mercuriales	Oxitetraciclina
Dextropropoxifeno	Parametadiona
Diazepam	Prometazina
Dihidralacina	Rifampicina
Diltiazem	Simvastatina
Doxiciclina	Tinidazol
Enflurane	Tioridazina
Ergotamina	Trazodone
Etionamida	Trimetropim
Etomidato	Valproato de sodio
Fenfluramina	Vinblastina/vincristina

convulsiones representan un verdadero problema, ya que casi todos los anticonvulsivos son porfirrogénicos. Actualmente, el tratamiento de elección es la gabapentina y la vigabatrina (9). Para el estreñimiento, pueden darse laxantes y ablandadores fecales.

El tratamiento fundamental de la porfiria intermitente aguda es disminuir la síntesis del hem y reducir la producción de precursores de porfirina; esto incluye una alta ingestión calórica a base de glucosa, ya sea oral o intravenosa, y arginato de hem (hematina) (10). Ambas reducen la síntesis del ácido amino-levulínico, lo que resulta en remisión clínica y bioquímica, con disminución comprobable de la excreción del ácido amino-levulínico y el porfobilinógeno en orina. La hematina debe suministrarse en una etapa temprana de los ataques, antes de que haya cambios neurológicos irreversibles, a una dosis diaria de 3 a 4 mg/kg por cuatro días, en infusión intravenosa lenta de 15 minutos, por vía central ya que es muy irritante. Su acción y la mejoría clínica se han reportado como espectaculares (3). Así, la meta es reducir la morbilidad y prevenir las complicaciones, especialmente las neurológicas.

Los ataques recurrentes son raros, pero se debe educar a estos pacientes y advertirles sobre los factores desencadenantes. Se estima que 60% a 80% de los pacientes que tienen un ataque de porfiria intermitente aguda, nunca tendrán otro. Si se confirman ataques recurrentes, debe suministrarse infusión de hematina en forma crónica, por ejemplo, en época premenstrual en las mujeres (1). Ya que no es una entidad frecuente, sería útil que los pacientes portaran una identificación y un folleto con el listado de los medicamentos que no se recomiendan o que precipitan los ataques agudos. La mayoría de los autores recomiendan realizar tamización a todos los miembros de la familia de un paciente con diagnóstico de porfiria. En los países desarrollados existen agrupaciones de pacientes y familiares con porfiria que trabajan en los procesos educativos y de identificación de pacientes. Infortunadamente, hasta el momento, en Colombia no hay una agrupación que sirva de apoyo a los pacientes y médicos, con

información y facilidades para la consecución del medicamento.

Discusión

Indudablemente, el problema fundamental en el caso que presentamos se centra en la dificultad diagnóstica. No hemos encontrado en la literatura reportes de hemotórax espontáneo como parte del cuadro clínico de la porfiria intermitente aguda y no tenemos aún una explicación para la patogénesis del hemotórax espontáneo que presentó este paciente. No hubo traumatismo asociado. No se demostraron alteraciones hematológicas, como suele ser la norma en los casos de porfiria.

Si bien en este paciente el motivo de consulta y el síntoma más predominante fue el dolor abdominal, el hemotórax espontáneo —por su magnitud y volumen, dos litros— desvió la atención a la búsqueda de otro tipo de problemas hematológicos y vasculares.

Contribuyó a la dificultad diagnóstica el hecho de que los síntomas neurológicos no se presentaron concomitantemente con el dolor abdominal. El paciente fue dado de alta de su cuadro inicial, con total normalidad neurológica y mental. No existió déficit motor ni hubo alteraciones psiquiátricas en esa primera hospitalización. Sin embargo, entre los síntomas más llamativos que debieron haber guiado el diagnóstico inicial, se identifica el dolor abdominal, que claramente los cirujanos que evaluaron el paciente definieron como de causa no quirúrgica y solicitaron a los internistas su ayuda en la búsqueda de una causa médica del dolor, asociado a una hipertensión que fue persistente a lo largo de todas sus consultas y hospitalizaciones.

Retrospectivamente, un paciente joven con hipertensión persistente asociada a dolor abdominal recurrente debe hacer pensar en la posibilidad de la porfiria intermitente aguda. La enfermedad no se presenta más frecuentemente en hombres, sino en mujeres, pero los hombres no están exentos. Generalmente, el primer episodio se presenta alrededor de los 30 años, pero es claro que lo hace después de la adolescencia y este paciente tenía 23 años.

Tampoco se hallaron antecedentes familiares que pudiesen haber guiado la búsqueda etiológica. No obstante, en muchos casos no se presenta el antecedente familiar, ya que un buen porcentaje de los pacientes son portadores que nunca van a desarrollar un ataque agudo de porfiria; entonces, hay familiares con porfiria latente que no son identificables.

Con tal posibilidad de factores precipitantes, queda difícil identificar o implicar alguno directamente en este caso específico. No obstante, este paciente sufrió días antes un episodio de litiasis ureteral que ameritó instrumentación y colocación de catéter doble J. Suponemos que debió recibir analgésicos de uso común, la gran mayoría asociados con ataque agudo de porfiria. Sin un antecedente familiar o personal, ni ningún síntoma en un hombre joven con un primer episodio de litiasis ureteral, entidad que se presenta con frecuencia en este perfil epidemiológico de pacientes, no se contraindica el uso de analgésicos de uso común, del orden de las hioscinas o la dipirona, ya que la porfiria intermitente aguda es una entidad rara con una baja prevalencia en nuestro país y que existen algunos pacientes con aumento de la excreción de porfobilinógeno urinario que jamás desarrollan síntomas, aun en presencia de factores precipitantes como el suministro de medicamentos reconocidamente asociados a los ataques agudos de porfiria.

A su ingreso inicial, presentó síntomas inespecíficos que se han descrito en la porfiria, tales como náuseas, vómitos, taquicardia y estreñimiento. Las ayudas diagnósticas también mostraron cambios inespecíficos, como íleo, y, definitivamente, la presencia del hemotórax masivo en la radiografía sí confundió toda posibilidad diagnóstica. Inicialmente, se pensó en un derrame pleural, pero para sorpresa de todos, la toracentesis mostró sangre rutilante que obligó a la colocación de un tubo de tórax por importante compromiso respiratorio del paciente, con salida espontánea de dos litros de sangre, que cesó también espontáneamente.

Un síntoma persistente, raro en un paciente tan joven, fue la hipertensión, que no se modificó

aun después del drenaje del hemotórax. Consideramos que la doble sintomatología de dolor abdominal e hipertensión persistente, debió haber guiado al diagnóstico, ya que aunque la hipertensión es un síntoma inespecífico, no son muchas las entidades nosológicas que la causan en un hombre de 23 años.

En los ingresos posteriores, además de los síntomas anteriores, empezó a presentar cambios neurológicos, hiponatremia y debilidad, que guiaron a los internistas y, especialmente al neurólogo clínico, en la sospecha diagnóstica. Hubo dilación para la confirmación diagnóstica del laboratorio, pero una simple prueba, como es la de exponer la orina por largo tiempo a la luz para verificar los cambios de coloración, que efectivamente sucedieron en este paciente, debe tomarse como prueba diagnóstica inicial y, ante la imposibilidad de confirmar prontamente el diagnóstico de laboratorio, consideramos que autoriza a los médicos tratantes a colocar la hematina.

Otra opción en estos casos de entidades poco frecuentes, es recurrir a las agrupaciones conformadas en los países desarrollados que trabajan por el bienestar de los pacientes con porfiria y que, estamos seguros, hubieran escuchado nuestras peticiones, tanto para la confirmación diagnóstica, ya que existen laboratorios de referencia en los países desarrollados, como para la consecución del medicamento, que también fue un poco difícil.

Infortunadamente, el deterioro de este paciente fue progresivo. El medicamento recomendado para la porfiria intermitente aguda (hematina) se suministró después del establecimiento del daño neurológico, que fue precisamente el que guió el diagnóstico. Hasta entonces, el paciente sí recibió una serie de medicamentos que, o bien están identificados como asociados a los ataques de porfiria intermitente aguda o están en el listado de medicamentos no recomendados por ser controversial su asociación con las crisis de porfiria. Las complicaciones que sobrevinieron después, solamente son la consecuencia lógica de una suma de procesos y predisposiciones secundarias al daño neurológico, a la disminución

en la ingestión, la desnutrición progresiva, a la inmunosupresión y a la inevitable invasión a que tuvo que ser sometido en las unidades de cuidados intensivos, con asociación de procesos infecciosos que terminaron con la vida del paciente.

Sin duda, el diagnóstico de porfiria en este paciente, antes de la presentación de los síntomas neurológicos, requería una dosis alta de sospecha de la enfermedad.

Si bien el grupo de las porfirias son entidades del campo de la medicina interna y de manejo médico, la porfiria intermitente aguda por excelencia llega de primera mano a los cirujanos dado su síntoma predominante: el dolor abdominal. Como parte de un equipo interdisciplinario, los cirujanos debemos estar atentos a las posibles causas de abdomen agudo de origen no quirúrgico, precisamente a aquellas entidades que escaparían a nuestro manejo y control, las entidades poco frecuentes, pero no por ello menos fatales, aunque en forma mucho menos drástica que la mayoría de las entidades quirúrgicas. Debemos dirigir nuestra atención a lo poco conocido, ya que algunas entidades sistémicas tienen su primera manifestación en el abdomen y, como parte del equipo, poder aportar algo más a la solución, que simplemente descartar la entidad quirúrgica como causa del problema. Nos cabe entonces una responsabilidad moral, aunque no necesariamente legal, en la identificación y resolución del abdomen agudo de origen médico.

Conclusiones

Las porfirias son un grupo de entidades hereditarias ocasionadas por una alteración metabólica en la síntesis del grupo hem.

Las manifestaciones clínicas de la porfiria intermitente aguda pueden ser amplias y también inespecíficas. El antecedente familiar y personal puede estar ausente.

Las porfirias agudas no se identifican fácilmente, con frecuencia se cometen errores diagnósticos. Se debe estar atento a la tríada de dolor abdominal, síntomas neurológicos y síntomas psiquiátricos.

Las formas agudas pueden amenazar la vida, pero los ataques responden al suministro temprano de la hematina.

Si se diagnostica porfiria, debe practicarse tamiación a los familiares, ya que existen numerosos portadores asintomáticos.

Los pacientes con porfiria diagnosticada son de manejo especializado y deben sufrir un proceso educativo que incluya el suministro de un listado de medicamentos y situaciones precipitantes de los ataques agudos de porfiria.

Un adulto joven con dolor abdominal e hipertensión, debe ser investigado para porfobilinógeno urinario, aunque no presente síntomas neurológicos.

La porfiria intermitente aguda debe sospecharse ante la presencia de dolor abdominal asociado a alguno de de las siguientes circunstancias: hiponatremia, hipertensión, mujer en edad fértil, debilidad muscular y orina oscura.

Conflicto de intereses

Las autoras declaramos que no existe conflicto de intereses en esta investigación.

Financiación

Esta investigación fue financiada por la Universidad Tecnológica de Pereira.

Referencias

1. **DeLoughery TG.** Porphyria, acute intermittent. Fecha de consulta: marzo del 2008. Disponible en: <http://www.emedicine.com/med/topic1880.htm>
2. **De Siervi A, Méndez M, Varela L, Rossetti MV, Parera V, Batlle A.** Estudios genéticos de las porfirias agudas en Argentina. *Acta Bioquím Clin Latinoam.* 2002;36:505-13.
3. **Thadani H, Deacon A, Peters T.** Diagnosis and management of porphyria. *BMJ.* 2000;320:1647-51.
4. **Kappas A, Sassa S, Galbraith RA, Nardaman Y.** The porphyries. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic basis of inherited diseases.* 6th edition. New York: McGraw- Hill; 1989. p. 1305-66.
5. **McColl KE, Dover S, Fitzsimons E, Moore MR.** Porphyrin metabolism and the porphyries. In: Weatherall DJ, Ledingham JC, Warrell DA, editors. *Oxford Textbook of Medicine.* Oxford: Oxford University Press; 1996. p. 1388-99.

6. **Monterio H, Bechara EJH, Abdalla DS.** Free radicals involvement in neurological porphyrias and lead poisoning. *Mol Cell Biochem.* 1991;103:73-84.
7. **Bonkovsky HL.** Advances in understanding and treating "the little imitator", acute porphyria. *Gastroenterology.* 1993;105:590-4.
8. **Lindberg RL, Parcher C, Grandchamp B.** Porphobilinogen deaminase deficiency in mice causes a neuropathy resembling that of human hepatic porphyria. *Nat Genet.* 1996;12:195-9.
9. **Hahn M, Gildemeister OS, Krauss GL, Pepe JA, Lambrecht RW, Donohue S, et al.** Effects of new anticonvulsants medications on porphyrin in cultured liver cells: potential implications for patients with acute porphyria. *Neurology.* 1997;49:97-106.
10. **Sassa S.** Understanding the porphyries. Fecha de consulta: 10 de noviembre de 2008. Disponible en: <http://www.uptodate.com/patients/content/topic.do?topicKey=~E4oMR6..hWichZE>

PRESENTACIÓN DE CASO

Adenoma del oído medio

Edwin Abraham Medina, Viviana Leticia Arias

Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia,
Bogotá, D.C., Colombia

Las neoplasias del oído medio son lesiones raras que, generalmente, plantean retos diagnósticos por la escasa información existente sobre su biología y la carencia de uniformidad de criterios para su análisis.

Se presenta el caso de un tumor de oído observado clínicamente en el canal auditivo externo, el cual protruía del oído medio a través del tímpano, y en cuyo espécimen de resección se encontró un tumor epitelial benigno con una de sus superficies revestida por epitelio escamoso. La escasa información clínica inicial incrementó la dificultad diagnóstica y para su diagnóstico se requirió apoyo en técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica. El diagnóstico definitivo fue adenoma del oído medio. Además, se hace una revisión del tema y se plantean algunas claves diagnósticas sobre este tipo de lesiones.

Palabras clave: adenoma/patología, oído medio, inmunohistoquímica, diagnóstico diferencial, tumor carcinoide.

Middle ear adenoma

Middle ear neoplasms are rare lesions and difficult to diagnose due to limited information about their biology and the lack of standard criteria for their analysis. Herein, a middle ear neoplasm is described that became apparent because of its appearance in the external ear duct as it protruded from the middle ear through the eardrum. Following resection, the specimen was determined to be a benign epithelial tumor. Absence of adequate clinical information complicated the diagnosis; therefore, histochemistry and immunohistochemistry analyses were necessary to reach the final diagnosis of middle ear adenoma. Diagnostic criteria are proposed to properly diagnose these types of lesions.

Key words: Adenoma/pathology; ear, middle; immunohistochemistry; differential, diagnosis; carcinoid tumor.

En el estudio de las lesiones tumorales del oído medio se ha aceptado, durante muchos años, que las metástasis y la extensión local de las neoplasias son más frecuentes que los tumores primarios(1). Igualmente, las neoplasias primarias del oído medio fueron por mucho tiempo mal comprendidas por parte de los patólogos y los otorrinolaringólogos. La mayoría de las lesiones se diagnosticaban bajo el término “ceruminoma”

y esta definición incluía también las lesiones propias del conducto auditivo externo (2,3). Con los estudios de Michaelis, Hyams, Derlacki y otros (4-6), se logró una mejor interpretación y clasificación de las neoplasias del oído medio, y se separaron claramente de las lesiones del oído externo (7,8).

Inicialmente, se reconocieron lesiones de tipo adenoma, así como tumores con diferenciación neuroendocrina. Se consideró que se trataba de dos lesiones diferentes y se generó un sinnúmero de discusiones acerca de los criterios para definir cada una de ellas (9). Después de muchas discusiones, se logró concluir que las dos lesiones representan los extremos de un espectro de diferenciación de una única lesión tumoral, que comparten la misma biología benigna

Correspondencia:

Edwin Abraham Medina, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 N° 45-03, edificio 471, oficina 224, Bogotá, D.C., Colombia.

Teléfono: (+1) 316 5000, extensión 15177; fax: (+1) 316 5000, extensión 15185.

eamediname@unal.edu.co

Recibido: 20/08/08; aceptado: 18/03/09

y que, en general, son lesiones tan polimorfas que pueden llegar a generar serios problemas diagnósticos para el patólogo general (2,3,6,9).

Se ha llegado a plantear, aunque no a manera de consenso, que el diagnóstico de estas neoplasias se fundamenta en pilares de coloración de rutina, inmunohistoquímica y microscopía electrónica. Sin embargo, dada lo benigno de la lesión, no se ha aceptado este enfoque diagnóstico tan costoso y, en una gran cantidad de casos, se ha optado por basar el diagnóstico en la morfología observada bajo la microscopía de luz y en algunos marcadores histoquímicos e inmunohistoquímicos, sólo para diferenciarlo de ciertas lesiones de apariencia similar (3,8).

En general, estas lesiones son exóticas y no existe en la literatura de nuestro país un reporte de este tipo de tumores, por lo que genera gran interés presentar su enfoque diagnóstico.

Presentación del caso

Se trata de una paciente de 41 años que realizó múltiples consultas a lo largo de un año debido a sensación de oído tapado e hipoacusia ligera, en el lado derecho, que fue manejada como un tapón de cerumen repetidamente por medicina general con lavados de oído. Sin embargo, los síntomas se incrementaron y se profundizó la hipoacusia hasta llegar a la sordera de conducción definida por un otorrinolaringólogo. En la consulta con este especialista, también se encontró una pequeña masa de apariencia tumoral que protruía del oído medio con lesión parcial de la membrana timpánica. Fue llevada a cirugía para resección-biopsia de la lesión y se obtuvieron, mediante miringotomía, múltiples fragmentos de tejido de consistencia firme, de color parduzco, con escaso sangrado. No se mencionó por parte del especialista el compromiso de la cadena de huesecillos ni del nervio facial.

En el estudio histológico, se observó un fragmento de tejido recubierto por epitelio escamoso con un tumor epitelial benigno de crecimiento expansivo, compuesto por estructuras de aspecto de trabécula y tubulares revestidas por una capa de células rectangulares sin atipias ni mitosis, con secreción en la luz, así como áreas sólidas

compuestas por células de escaso citoplasma y núcleo pequeño hiper cromático. El estroma estaba ricamente irrigado (figuras 1-3).

Se realizaron estudios de histoquímica con coloraciones de ácido peryódico de Schiff (PAS), Ziehl-Nielsen (ZN) y azul alciano en el Laboratorio de Patología Interfacultades de la Universidad Nacional de Colombia, acorde con la metodología adaptada del *Armed Forces Institute of Pathology* (AFIP) de los Estados Unidos (10), y se demostró la secreción de mucoproteínas en la luz y mínimo componente intracitoplasmático (figura 4); igualmente, no se observó pigmento pardo en el citoplasma celular.

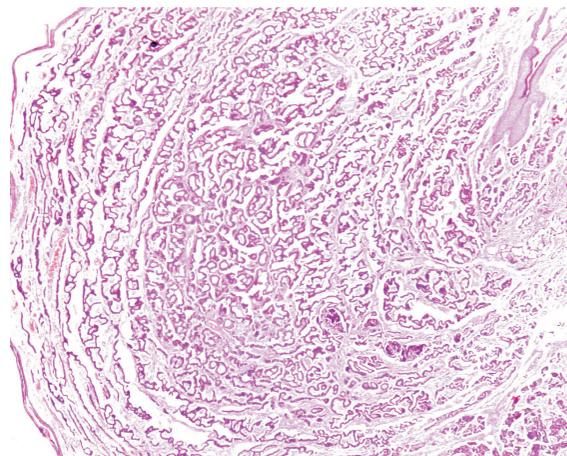


Figura 1. Adenoma del oído medio, vista panorámica. Hematoxilina-eosina, 2X.

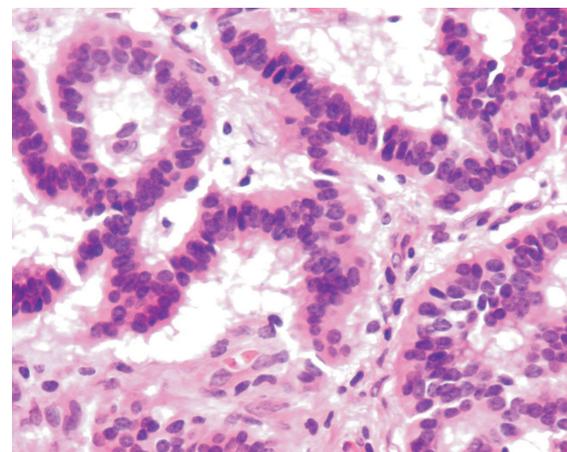


Figura 2. Área glandular. Hematoxilina-eosina, 40X.

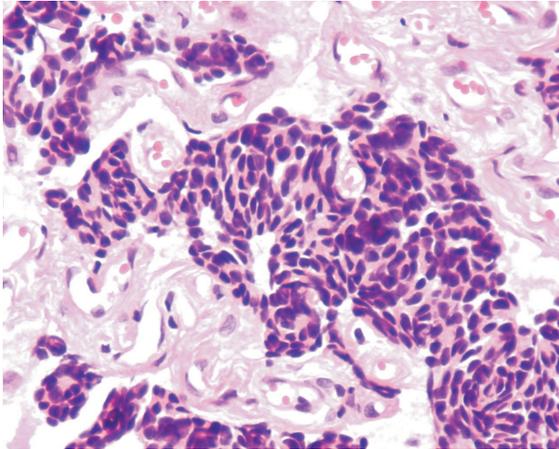


Figura 3. Área de trabéculas. Hematoxilina-eosina, 40X.

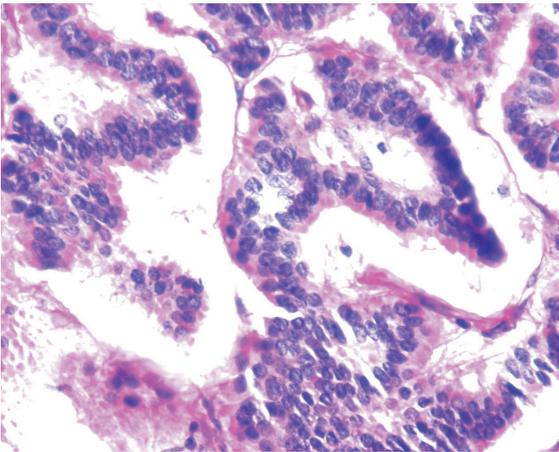


Figura 4. Coloración de PAS (ácido peryódico de Schiff), 40X

Para las tinciones de inmunohistoquímica, se empleó la metodología propia del Laboratorio de Patología Interfacultades de la Universidad Nacional de Colombia, adaptada de los insertos de los reactivos. Previa inhibición de la actividad peroxidasa endógena con H_2O_2 al 3%, se hizo la recuperación antigénica en Target 10x (Dako®) y lavados seriados con TBS, se incubó por 30 minutos con cromogranín A en dilución 1:200 (Novocastra®) y RTU-S100p prediluida (Novocastra®), y se valoró la reactividad con el sistema de estreptavidina-HRP (Dako®), para el cual se usó como cromógeno diaminobencidina (DAB). Luego del montaje de las láminas, se pudo demostrar la positividad, tanto de cromogranina como de S100 con intensidad leve a moderada,

en todos los patrones observados en la lesión. No se evidenció patrón de células mioepiteliales con S100 (figuras 5 y 6).

Discusión

El oído medio, en general, es un sitio exótico para la presentación de lesiones tumorales. Se ha reconocido una gran variedad de tumores que comprometen el oído medio por contigüidad, pero las lesiones primarias no se observan frecuentemente. En los últimos 40 años se han publicado en la literatura anglosajona alrededor de 120 casos, como reportes simples o series

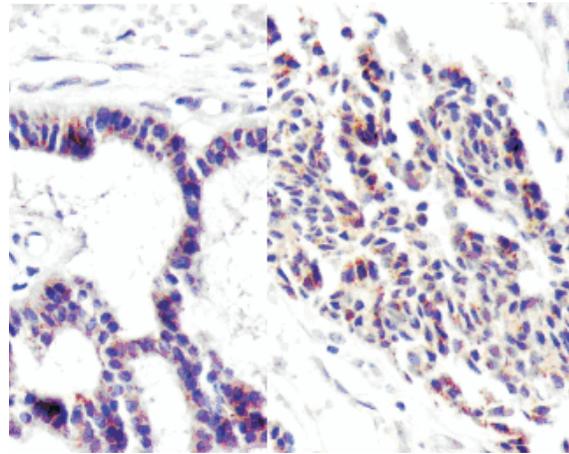


Figura 5. Inmunotinción en patrón glandular (izquierda) y de trabéculas (derecha). Cromogranina, 20X y 40X.

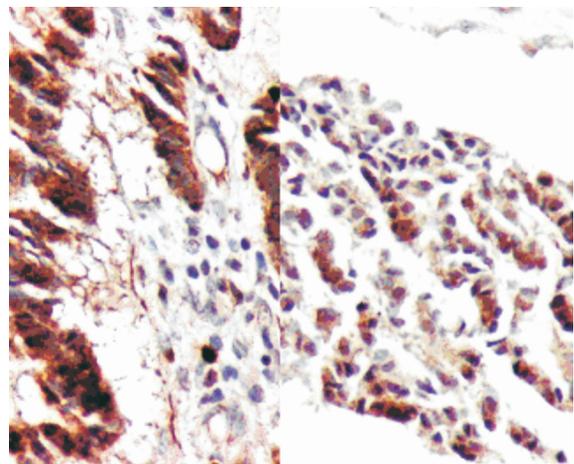


Figura 6. Inmunotinción en patrón glandular (izquierda) y de trabéculas (derecha). S100, 40X.

pequeñas no mayores de 50 pacientes, de lesiones tumorales primarias del oído medio (8,9,11). Con los análisis realizados a finales de los años noventa, se llegó a la conclusión de que todas estas lesiones correspondían a un tumor tipo adenoma de origen incierto, presuntamente epitelial, con grados de diferenciación variable entre mucinoso y neuroendocrino, de comportamiento totalmente benigno, que se denominó adenoma del oído medio, aunque algunos consideran que es más descriptiva la denominación de adenoma neuroendocrino del oído medio (2,3,5). Sin embargo, los detractores de esta denominación argumentan que este tumor no tiene un origen glandular, razón por la cual el nombre de adenoma no sería preciso (7).

Este tipo de lesiones se manifiestan con cambios unilaterales caracterizados por hipoacusia, trastornos de la motricidad facial, alteraciones del equilibrio, dolor ocasional y, en raras ocasiones, sangrado o secreción (2-4,12,13). A pesar de la diferenciación neuroendocrina, sólo se han descrito palpitaciones y diarrea en un paciente, el cual mejoró su sintomatología con la escisión del tumor. Sin embargo, no se le realizaron estudios bioquímicos completos que permitieran realizar el diagnóstico de síndrome carcinoide (6).

El adenoma del oído medio aparece entre la segunda y la octava décadas de la vida, sin preponderancia de sexo y, en general, tiene un curso indolente, por lo que la consulta se retrasa, incluso, durante años (3,4,8). También, puede ser un hallazgo fortuito en estudios radiológicos de pacientes, por otra parte, asintomáticos (7,9).

En el estudio radiológico se reconoce una lesión de densidad de tejidos blandos que ocupa el oído medio, usualmente compromete la cadena de huesecillos y se extiende a través de la trompa de Eustaquio (9). En raras ocasiones, puede llegar a romper el tímpano o a erosionar el hueso temporal, sin que indique un proceso maligno (13), aunque algunos autores proponen que, de encontrarse comprometido el tímpano, el tumor se debería considerar como un carcinoma de bajo grado (5). El compromiso del nervio facial es más por compresión que por infiltración,

aunque en algunos casos se observó invasión microscópica del nervio por el tumor (3,8).

En el examen macroscópico, el tumor es bien delimitado, sin cápsula, nodular, de color pardo-grisáceo-amarillento, sangra poco, de consistencia elástica y tamaño promedio de 1 cm (7-9). Usualmente, es de fácil resección y las recurrencias son escasas (8). No hace metástasis, pero puede generar compromiso local por extensión (14).

En el examen microscópico, se observan patrones variados entre glandulares, de criba o de trabécula, en sábanas, "organoide" o células sueltas de apariencia de plasmocitos. Estos patrones pueden aparecer mezclados en el mismo caso (1-3,7-9). Las células son poligonales, entre cúbicas y redondas, con citoplasma eosinófilo finamente granular y núcleos redondeados excéntricos con cromatina fina, y pueden presentar un patrón de "sal y pimienta" (2,13). El pleomorfismo y las mitosis son raras, pero pueden aparecer sin ser indicativos de neoplasia maligna (7).

En los estudios de histoquímica se encuentra material positivo con las coloraciones de PAS, mucicarmín y azul alciano en las luces glandulares y en el citoplasma de algunas células (2,9,14). Las preparaciones de inmunohistoquímica muestran reactividad para marcadores epiteliales y neuroendocrinos (3). Existen diferencias en la reactividad según el patrón histológico pero, actualmente, carecen de relevancia diagnóstica (1). Los estudios de ultraestructura permiten observar microvellosidades, uniones estrechas intercelulares, anclaje a membrana basal gruesa y gránulos secretorios en las células apicales (células mucinosas o tipo A) y basales (células neuroendocrinas o tipo B) (1-3). Se acepta que no hay células que presenten los dos tipos de gránulos, aunque existen reportes individuales que afirman lo contrario (9).

El diagnóstico diferencial se plantea con ciertas lesiones que se extienden al oído medio, originadas de áreas adyacentes. Especial importancia ha reclamado el paraganglioma yuxtayugular, por su apariencia "organoide" y reactividad a marcadores neuronales, que podría generar

cierta confusión (5,13). Es prudente diferenciarlo con estudios de retículo que muestra el patrón *zellballen* del paraganglioma, y queratinas, las cuales son negativas en este último (1,7,8). Otra lesión importante es el tumor papilar agresivo del oído medio, que se considera una extensión del tumor del saco endolinfático y de la mastoides; en este tumor, son clave las estructuras papilares (15). Algunas lesiones, como meningiomas, paragangliomas yuxtayugulares y tumores del seno endodérmico, se pueden extender al oído medio desde la bóveda craneana. Se han observado, también, metástasis de tumores de mama, pulmón, riñón, estómago, laringe, parótida, oído externo y piel (por ejemplo, melanoma). En estudios por congelación, se puede confundir con paraganglioma (65,6%), otitis media crónica (18,8%) y colesteatoma (15,6%) (2). Un resumen de los principales diagnósticos diferenciales de los tumores de oído medio se presenta en el cuadro 1.

Cuando el tumor rompe el tímpano, incluso inadvertidamente para el otorrinolaringólogo, la lesión puede rotularse como del oído externo y generar confusión con el adenoma de glándulas

de cerumen (16,17). Esta última lesión está compuesta por dos líneas celulares, una interna, rectangular, de características apocrinas con gránulos PAS y ZN perinucleares de pigmento pardo, y células mioepiteliales que son reactivas para S100, p63 y CK5/6, entre otros marcadores (18,19). A pesar de la aparente diferencia, algunas veces el adenoma de glándulas de cerumen puede adquirir un patrón sólido, o sus luces glandulares pueden ser ocluidas por el estroma y generar serios problemas diagnósticos (20). Además, aun hoy muchos clínicos siguen considerando el origen de las glándulas de cerumen de las lesiones del oído medio, a pesar de que se ha demostrado la inexistencia de dicho tipo celular en esta ubicación (4).

El presente caso generó una especial dificultad, por la escasa información inicial con que se contaba. La imagen histológica mostró un fragmento de tejido con recubrimiento epitelial plano estratificado con capa córnea, con una lesión tumoral que comprometía los bordes de sección, compuesta por estructuras glandulares y de trabécula de una población monomorfa de células poligonales

Cuadro 1. Diagnóstico diferencial de neoplasias de oído medio.

Entidad	Características importantes
Paraganglioma	Células epitelioideas que forman patrón <i>zellballen</i> rodeadas por células espinosas de sustento HQ: reticulina IHQ: cromogranina (+), sinaptofisina (+) y queratinas (-), S100 (+) en células de sustento
Schwannoma	Áreas hipercelulares (Antoni A) e hipocelulares (Antoni B), cuerpos de Verocay IHQ: S100 difuso (+)
Papiloma mucoso tipo schneideriano	Cubierto por células escamosas y en columna. Son evertidos (fungiformes), invertidos (endofíticos) u oncócitos (cilíndricos), recordando su contraparte nasal.
Pólipo inflamatorio y plasmocitoma	Patrón "plasmocitoide" IHQ: marcadores linfoides (+)
Carcinoma escamocelular	Presenta diferentes estados de diferenciación y puede simular otitis media crónica en las fases iniciales.
Adenocarcinoma papilar	Tiene apariencia papilo-glandular recubierta por monocapa de células cúbicas que pueden infiltrar o flotar libremente. Producen sustancia similar al coloide (tumor de bajo grado de la bolsa endolinfática). IHQ: EMA (+), queratinas (+) y S100 (+)
Colesteatoma	Queratinocitos enucleados, células gigantes y hemosiderina
Otitis media crónica	Metaplasia glandular, inflamación crónica y tejido de granulación
Coristoma	Salival (mucinoso) y glial (descartar tejido cerebral herniado).
Hamartoma	Hemangioma

HQ: histoquímica; IHQ: inmunohistoquímica

de núcleo excéntrico. La ausencia de mitosis y el pleomorfismo fortaleció el carácter benigno de la lesión. La reactividad en la luz de material con PAS y azul alciano, evidenció el carácter secretor de moco de la lesión que, sumado a la inmunorreactividad para cromogranina, fueron indicadores del origen del tumor en el oído medio. No se reconoció material positivo con PAS perinuclear, como tampoco la coloración de Ziehl-Nielsen evidenció pigmento pardo en esta ubicación. La positividad difusa de S100 en casi todas las células tumorales descarta la existencia de células mioepiteliales y dilucida, sumada a los otros hallazgos, el carácter de la lesión (2,3).

El diagnóstico final del caso es adenoma (neuroendocrino) del oído medio parcialmente reseca, por lo que la paciente requiere de nueva intervención quirúrgica para reseca completamente la lesión y evitar nuevo crecimiento del tumor.

Conflictos de intereses

Los autores señalan que no existe conflicto de intereses con los contenidos enunciados en el artículo.

Financiación

El presente manuscrito se elaboró en el marco de las actividades docente-asistenciales del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, con recursos propios del mismo.

Referencias

1. **Stanley MW, Horwitz CA, Levinson RM, Sibley RK.** Carcinoid tumors of the middle ear. *Am J Clin Pathol.* 1987;87:592-600.
2. **Berns S, Pearl G.** Middle ear adenoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2006;130:1067-9.
3. **Wassef M, Kanavaros P, Polivka M, Nemeth J, Monteil JP, Frachet B, et al.** Middle ear adenoma. A tumor displaying mucinous and neuroendocrine differentiation. *Am J Surg Pathol.* 1989;13:838-47.
4. **Orendorz-Frączkowska K, Jaworska M, Gawron W, Badowski R.** Middle ear ceruminous adenoma as a rare cause of hearing loss and vertigo: Case reports. *Auris Nasux Larinx.* 2005;32:393-7.
5. **Gunduz M, Yamanaka N, Saito T, Kuki K, Yokoyama M, Nakamine H.** Middle ear adenoma with neuroendocrine differentiation. *Auris Nasus Larynx.* 2000;27:73-6.
6. **Hale RJ, McMahon RFT, Whittaker JS.** Middle ear adenoma: Tumour of mixed mucinous and neuroendocrine differentiation. *J Clin Pathol.* 1991;44:652-4.
7. **Ribé A, Fernández PL, Ostertarg H, Clarós P, Bombí JA, Palacín A, et al.** Middle ear adenoma (MEA): A report of two cases, one with predominant "plasmocitoid" features. *Histopathology.* 1997;30:359-64.
8. **Mills SE, Fechner RE.** Middle ear adenoma: A cytologically uniform neoplasm displaying a variety of architectural patterns. *Am J Surg Pathol.* 1984;8:677-85.
9. **Torske KR, Thompson LD.** Adenoma versus carcinoid tumor of the middle ear: a study of 48 cases and review of the literature. *Mod Pathol.* 2002;15:543-55.
10. **Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH.** Laboratory methods in histotechnology. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology/American Registry of Pathology; 1992. p. 151, 156-60, 219-20.
11. **Rosai J.** Rosai and Ackerman's surgical pathology. 9th edition. Philadelphia: Mosby-Elsevier Inc.; 2004. p. 2774, 2776-7.
12. **Wenig BM.** The ear. En: Weidner N, editor. *Modern surgical pathology.* 1st edition. New York: Saunders-Elsevier Science; 2003. p. 285-6.
13. **Mills SE.** Tumors of the upper aerodigestive tract and ear. Atlas of tumor pathology. 3rd series. Fascicle 26. Washington D.C.: Armed Forces Institute of Pathology; 2000. p. 401-6, 431-4.
14. **Wenig BM.** The ear. In: Mills SE, editor. *Sternberg's diagnostic surgical pathology.* 4th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 1053-4, 1058-60.
15. **Gaffey MJ, Mills SE, Fechner RE, Intemann SR, Wick MR.** Aggressive Papillary middle-ear tumor. A clinicopathologic entity distinct from middle-ear adenoma. *Am J Surg Pathol.* 1988;12: 790-7.
16. **Lassaletta L, Patrón M, Olóriz J, Pérez R, Gavilán J.** Avoiding misdiagnosis in ceruminous gland tumours. *Auris Nasux Larinx.* 2003;30:287-90.
17. **Iqbal A, Newman P.** Ceruminous gland neoplasia. *Br J Plast Surg.* 1998;51:317-20.
18. **Thompson LD, Nelson BL, Barnes EL.** Ceruminous adenomas. A clinicopathologic study of 41 cases with a review of literature. *Am J Surg Pathol.* 2004;28:308-18.
19. **Kuwabara H, Haginomori SI, Takamaki A, Ito K, Takenaka H, Kurisu Y, et al.** Lipomatous pleomorphic adenoma of the ceruminous gland. *Pathol Int.* 2006;56:51-3.
20. **Conlin PA, Mira JL, Graham SC, Kaye KS, Cordero J.** Ceruminous gland adenoid cystic carcinoma with contralateral metastasis and the brain. *Arch Pathol Lab Med.* 2002;126:87-9.

ARTÍCULO ORIGINAL

Efectividad de la citología cérvico-uterina para la detección temprana de cáncer de cuello uterino en el marco del sistema de salud de Colombia

Raúl Murillo¹, Ricardo Cendales², Carolina Wiesner³, Marion Piñeros⁴, Sandra Tovar³

¹ Subdirección de Investigaciones, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, D.C., Colombia

² Grupo de Radioterapia, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, D.C., Colombia

³ Grupo de Prevención, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Área de Salud Pública, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El cáncer de cuello uterino continúa siendo la primera causa de muerte por cáncer en mujeres colombianas, a pesar de la implementación desde 1991 de la detección temprana basada en la citología.

Objetivos. Evaluar la efectividad de la citología cérvico-uterina en Colombia.

Materiales y métodos. Se realizó un estudio de casos y controles (de población), equiparado por edad y entorno social. Los casos fueron mujeres de 25 a 69 años con cáncer invasor y los controles, mujeres sin cáncer invasor. Se trabajó en cuatro departamentos como escenarios diferenciales según el nivel de organización de la detección temprana y la mortalidad por esta causa. Los casos se seleccionaron aleatoriamente de los registros de patología en cada departamento (2005). Se aplicó una encuesta sobre los factores de riesgo y la historia de las citologías en los 72 meses previos.

Resultados. Se incluyeron 50 casos y 50 controles por departamento (400 sujetos). El promedio de edad fue de 48,4 años, el analfabetismo de 12,5% y las personas sin aseguramiento de 13,8%. El promedio de citologías fue más alto en los controles que en los casos ($p < 0,01$). El porcentaje de casos con antecedente de citología fue de 49,5%. El uso de anticonceptivos y la falta de práctica de la citología estuvieron asociados con cáncer invasor (OR=2,53 y 3,54, respectivamente).

Conclusiones. La citología sigue siendo efectiva en la detección temprana del cáncer de cuello uterino. La efectividad está determinada más por la calidad de la prueba que por las coberturas de población. Es necesario revisar la normatividad del país. Los estudios de casos y controles son una herramienta útil en la evaluación de programas.

Palabras clave: neoplasias del cuello uterino, tamización masiva, evaluación de programas y proyectos de salud, citología, Colombia.

Effectiveness of cytology-based cervical cancer screening in the Colombian health system

Introduction. Despite the implementation of cytological screening since 1991, cervical cancer continues to be the leading cause of cancer mortality among Colombian women.

Objectives. The effectiveness of cytology-based cervical cancer screening was subjected to review in the context of the Colombian health system.

Materials and methods. A case-control study was done. Invasive cervical cancer cases between 25-69 years were recruited and histopathological confirmation was required. Controls without invasive cancer were matched by age and neighborhood. Cases and controls were recruited in four Colombian provinces representing different settings for cervical cancer control with respect to program performance and mortality rates. The cases were randomly selected from the pathology in each province (year 2005). A survey of risk factors and cytology history in the previous 72 months was conducted.

Results. Fifty cases and 50 controls in each department were enrolled for a total of 400 subjects. The average age was 48.4 years, illiteracy 12.5%, and persons without health insurance 13.8%.

The average number of Pap-smears was higher among controls ($p < 0.01$). Cases with a Pap-smear in the previous 36 months was nearly half (49.5%). Oral contraceptives and the lack of cytology were associated with invasive cervical cancer.

Conclusions. Cytology-based screening continued to be effective for early detection of cervical cancer in Colombia but its effectiveness was determined by quality of Pap-smears rather than by screening coverage. Governmental guidelines need to be revisited. Case-control studies provided a useful tool for evaluation of the screening program.

Key words: Uterine cervical neoplasms, mass screening, program evaluation, cytology, Colombia.

La tamización basada en citología cérvico-uterina ha reducido la mortalidad por cáncer de cuello uterino en los países desarrollados pero, infortunadamente, este efecto no se ha logrado en la mayoría de los países en vías de desarrollo, incluida Colombia (1,2). Las razones de la falta de efectividad en las naciones de bajos recursos se atribuyen, además de las limitaciones socioeconómicas, a problemas en la organización de los programas (3). Sin embargo, a la fecha, las evaluaciones de los programas se han centrado en la cobertura de la tamización, sin que exista relación clara entre ésta y el comportamiento de la mortalidad (4); por consiguiente, no existe suficiente información acerca de cuáles componentes de los programas son los responsables de la falta de efectividad.

En los años siguientes a la introducción de la tamización de cáncer de cuello uterino en América Latina, se realizaron análisis tendientes a valorar el impacto de la toma de citología sobre el riesgo de cáncer. Un estudio adelantado en Cali, Colombia, demostró que el riesgo de desarrollar cáncer invasor era 10 veces superior en las mujeres que no habían sido incluidas en la tamización que en las mujeres que sí habían sido incluidas (RR=9,9) (5). En concordancia, el registro de cáncer de esa ciudad documentó, en los años precedentes al estudio, un incremento en el diagnóstico de cáncer *in situ*, frente a un

descenso en el diagnóstico de cáncer invasor (5), lo cual evidencia un efecto positivo del programa de tamización con citología, similar a lo observado en países como Canadá (6).

Los datos confirmaron en su momento los beneficios de la citología en la reducción del riesgo de cáncer invasor; sin embargo, tal información no se relacionó con la mortalidad por cáncer de cuello uterino. Por otro lado, los programas iniciados en Colombia alrededor de los años setenta y ochenta, como el de Cali, fueron luego incorporados al programa nacional en 1990, pero, tras la reforma del sector salud en 1993, este programa perdió su carácter vertical y se transformó en un conjunto de actividades reglamentadas, pero desarrolladas por múltiples actores sin una unidad de coordinación (7).

Tras más de 15 años de la introducción del programa y de la reforma, la mortalidad por cáncer de cuello uterino en Colombia no muestra una tendencia clara al descenso y afecta, principalmente, a grupos de población con limitaciones para el acceso a los servicios y deficientes condiciones socioeconómicas (8,9). La falta de efectividad de la tamización puede estar relacionada con diversos factores, que incluyen la cobertura de la población, la calidad en la toma y lectura de la citología, el acceso oportuno a la confirmación diagnóstica y el tratamiento, y la calidad del tratamiento, entre otros.

El realizar una evaluación integral de los distintos aspectos del programa es una tarea compleja que no puede adelantarse en un solo estudio. En el presente trabajo se analiza la diferencia en la historia de la citología en mujeres con cáncer invasor y los controles de población en cuatro departamentos de Colombia, con el

Correspondencia:

Raúl Murillo, Subdirección de Investigaciones, Instituto Nacional de Cancerología, Calle 1 No. 9-85, Bogotá, D.C., Colombia.

Telefax: (571) 334 1360

rmurillo@cancer.gov.co

Recibido: 07/11/08; aceptado:05/03/09

fin de evaluar la efectividad de la citología en la detección temprana de la enfermedad como indicador de desempeño del programa y, a su vez, generar hipótesis documentadas sobre las causas de la falta de impacto del mismo en nuestro país.

Materiales y métodos

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigaciones del Instituto Nacional de Cancerología de Colombia.

Se llevó a cabo un estudio de casos y controles en cuatro departamentos que representaban escenarios diferenciales según el nivel de organización de las actividades de detección temprana de cáncer de cuello uterino y según la mortalidad por esta causa. Dos departamentos tenían un adecuado desempeño en el número de citologías realizadas, pero presentaban tasas de mortalidad alta y baja, respectivamente (Caldas y Boyacá), y dos departamentos tenían un inadecuado desempeño en el número de citologías e, igualmente, tenían tasas de mortalidad diferenciales (Tolima y Magdalena) (10).

Se diseñó un estudio pareado asumiendo como casos las mujeres entre 25 y 69 años con diagnóstico histopatológico de cáncer invasor de cuello uterino y, como controles, las mujeres en el mismo rango de edad pero sin cáncer invasor (verificado por citología). Los controles se equipararon por edad al momento de la encuesta (± 2 años) y por lugar de residencia (residentes en el mismo municipio y barrio del caso durante periodos similares). Se incluyeron mujeres que hubieran residido en los departamentos de estudio como mínimo por tres años y que no hubiesen estado embarazadas en ese lapso de tiempo. Se excluyeron los controles con antecedentes de histerectomía o de tratamientos relacionados con cáncer invasor o lesiones cervicales de cualquier grado y todas las mujeres cuya condición física o mental impedía el diligenciamiento adecuado del cuestionario. Los casos se seleccionaron aleatoriamente a partir del universo de pacientes con cáncer invasor identificado en los laboratorios de patología de cada departamento y diagnosticados durante el año 2005.

Enfermeras profesionales contactaron los casos y su respectivo control (ubicados en el mismo barrio y seleccionados aleatoriamente a partir de la información suministrada por vecinos del lugar, pero sin consultar los casos para su ubicación), y diligenciaron una encuesta estructurada sobre factores de riesgo para cáncer de cuello uterino y sobre la historia de citologías en los 48 meses previos al momento de la encuesta, incluidos los motivos de realización de las mismas. Los motivos de realización de las citologías fueron codificados y un médico epidemiólogo entrenado en cáncer y enmascarado con respecto a la condición de caso o control del sujeto, clasificó las citologías como diagnósticas o de tamización. Para los casos y los controles, las citologías motivadas en síntomas, las correspondientes a controles posteriores a una citología anormal (*ASCUS* o más) y las correspondientes a controles posteriores al tratamiento fueron excluidas del análisis. Para los casos, las citologías realizadas con posterioridad al diagnóstico fueron también excluidas.

Análisis estadístico

Se hizo doble digitación de la información en una base de datos validada. Se calculó un tamaño de muestra entre 40 y 50 pares para cada departamento basado en la prueba de McNemar, asumiendo un poder de 80%, confianza 95%, pruebas a una cola, razones de disparidad de 2 a 3 y una proporción de pares discordantes entre 0,2 y 0,3.

El análisis se hizo con el programa SPSS®, versión 15.0. En el componente descriptivo se utilizaron medidas de tendencia central y de dispersión para las variables numéricas, y proporciones para las variables categóricas. La hipótesis nula de igualdad de proporciones se probó por la prueba de McNemar y la hipótesis nula de igualdad de medias por la *t* de Student para medidas repetidas si la variable numérica tenía distribución normal o, por la prueba de Wilcoxon, si no había distribución normal. Dada la suficiencia de la muestra los valores de *p*, finalmente, corresponden a pruebas de dos colas. En el análisis multivariable se utilizó un modelo jerárquico de regresión logística

condicional seleccionando variables mediante el método paso a paso hacia atrás con criterio de permanencia de 0,05. Se presentan análisis individuales a nivel departamental y un análisis para los cuatro departamentos.

Resultados

Se contactaron 428 mujeres (222 casos y 206 controles); 28 mujeres no fueron elegibles por embarazo en los tres años previos (10), negativa a conceder la entrevista (8), diagnóstico inadecuado (cáncer *in situ*, 6 casos, y cáncer invasor, un control) o residencia fuera del departamento (3). Se incluyeron, finalmente, 50 casos y 50 controles en cada departamento.

A 31 casos que desconocían el diagnóstico de cáncer se les dio información y se les orientó para el acceso al tratamiento. El promedio de edad fue de 48,4 años, la tasa de analfabetismo fue menor de 10%, con excepción del departamento del Magdalena en donde fue de 26% (cuadro 1). La proporción de personas sin aseguramiento fue baja en los departamentos con buen desempeño en la realización de citologías y, mayor, en los departamentos restantes. Un porcentaje significativamente mayor de los casos no sabía leer ni escribir, inició relaciones sexuales y tuvo su primer parto antes de los 19 años, tuvo tres o más hijos, y tuvo mayor uso de anticonceptivos orales (cuadro 1).

El análisis por departamento mostró diferencias importantes con respecto al análisis global, por razones debidas a la disminución en el tamaño de la muestra; sin embargo, la práctica de, al menos, una citología de tamización en los últimos 36 meses fue una de las pocas variables que conservó diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles (cuadro 2). En todos los departamentos, el promedio de citologías en los cinco años previos a la encuesta fue mayor en los controles que en los casos; Boyacá tuvo la menor diferencia entre casos y controles y, Magdalena, la más alta. A su vez, los departamentos con promedios de citologías más altos en el periodo evaluado fueron Tolima y Caldas. El porcentaje de casos con antecedentes de citología en los últimos tres años estuvo entre 38% y 56% (cuadro 2).

En el modelo multivariable sólo el tiempo de uso de anticonceptivos orales y la práctica de citología de tamización en los últimos 36 meses estuvieron significativamente asociados con el riesgo de cáncer en el análisis global. En el análisis por departamento, únicamente la práctica de citología en los últimos 36 meses mostró asociación significativa con OR bajo en Boyacá y Caldas (3,6 y 3,7, respectivamente), OR intermedio en Magdalena (5,3) y un OR más cercano a la efectividad teórica en Tolima (20,5) (cuadro 3).

Discusión

Los estudios de casos y controles se han utilizado para valorar la eficacia de la tamización basada en la citología en el diagnóstico de cáncer temprano (5,11,12). A pesar de que esta eficacia ya está demostrada, el uso de tales estudios en la evaluación de un programa de salud pública ayuda a valorar las estrategias de tamización en las condiciones específicas de un sistema de salud y el aporte de distintos componentes en los resultados obtenidos. En este estudio, el alto porcentaje de ejecución de la muestra prevista y la equiparación de los casos y los controles por edad y por el entorno social, reducen la posibilidad de sesgos y dan mayor validez a los resultados obtenidos.

No obstante, nuestro estudio tiene varias limitaciones. La historia de citologías basada en encuestas introduce un sesgo de memoria que se ha propuesto como favorecedor de la tamización (13). En nuestro estudio, este sesgo se comporta en forma similar entre casos y controles, debido a la equiparación de las condiciones sociales mediante controles de población como se demuestra en el cálculo de los OR. La opción de revisar historias clínicas reduciría el sesgo de memoria, pero introduciría un sesgo de recolección de información ya que, ante la ausencia de programas estructurados en nuestro país, los datos sobre tamización se encontrarían más en los casos que en los controles, lo que los hace no comparables.

Una dificultad adicional es la clasificación de citologías con fines diagnósticos o de tamización. Los estudios previos eliminan siste-

máticamente los registros en un periodo previo al diagnóstico de cáncer (14,15). Nuestros cuestionarios incluyeron información detallada sobre los motivos de realización de la citología; consideramos que la evaluación ciega de un epidemiólogo asegura una valoración aceptable

del tipo de citología, dadas las características del sistema de salud colombiano: no es frecuente en nuestro medio tener chequeos de rutina, máxime en una población como la de estudio, entre quienes el nivel educativo fue primaria en 48,5% y ninguno en 12,5%.

Cuadro 1. Características de la población.

Variable	Boyacá	Caldas	Magdalena	Tolima	Total	Valor de p**
Edad (promedio)	48,5	47,4	50,9	46,9	48,4	0,19
Estado civil						
Soltera	18,0	23,0	13,0	21,0	18,8	0,42
Casada/unión libre	63,0	55,0	73,0	65,0	64,0	
Separada/viuda	19,0	22,0	14,0	14,0	17,3	
Analfabetismo	10,0	5,0	26,0	9,0	12,5	0,01
Aseguramiento en salud*						
Contribuyentes	33,0	56,0	23,0	40,0	38,0	ND
Subsidiados	63,0	41,0	57,0	28,0	47,3	
Sin seguro	3,0	2,0	19,0	31,0	13,8	
Inicio de relaciones sexuales (años)						
<15	13,0	12,0	15,0	14,0	13,5	<0,01
15 a 19	55,0	49,0	55,0	59,0	54,5	
≥20	32,0	39,0	30,0	27,0	32,0	
Edad al primer parto (años)						
<15	1,0	0,0	3,0	3,0	1,8	<0,01
15 a 19	37,0	45,0	45,0	49,0	44,0	
≥20	62,0	55,0	52,0	48,0	54,3	
Número de hijos nacidos vivos						
≤2	28,0	36,0	25,0	33,0	30,5	<0,01
≥3	72,0	64,0	75,0	67,0	69,5	
Más de tres compañeros sexuales en la vida	39,0	36,0	16,0	24,0	28,8	0,01
Uso de anticonceptivos orales (años)						
≤5	86,0	69,0	82,0	70,0	76,8	0,05
≥5	14,0	31,0	18,0	30,0	23,3	
Fumadoras (más de 100 cigarrillos en la vida)	58,0	68,0	54,0	73,0	63,3	<0,01

* De las mujeres, 4% no reportan información sobre la afiliación al sistema de salud.

** El valor de p representa las diferencias globales entre casos y controles (datos no mostrados) y se obtuvo mediante la prueba de McNemar para las variables categóricas y la prueba de Wilcoxon para las variables numéricas.

Los datos están expresados en porcentajes con excepción de la edad que se reporta como promedio.

Cuadro 2. Antecedentes en la práctica de citología.

Historia de citología	Boyacá		Caldas		Magdalena		Tolima		Total		Valor de p*
	Caso	Control	Caso	Control	Caso	Control	Caso	Control	Caso	Control	
Antecedente de citología en los últimos 36 meses (%)	48,0	68,0	56,0	80,0	38,0	70,0	56,0	90,0	49,5	77,0	<0,01
Promedio de citologías en los últimos 60 meses	1,12	1,57	1,39	2,0	0,6	1,44	1,37	2,9	1,11	1,97	<0,01

* Los valores de p expresan las diferencias globales entre casos y controles y se obtuvo mediante la prueba de McNemar para las variables categóricas y la prueba de Wilcoxon para las variables numéricas. Los últimos 36 meses y los últimos 60 meses están en relación con el momento de la encuesta, tal como se describe en la sección de métodos.

Cuadro 3. Análisis multivariable sobre riesgo de cáncer invasor del cuello uterino.

Variable	Boyacá		Caldas		Magdalena		Tolima		Total	
	OR	IC95%	OR	IC95%	OR	IC95%	OR	IC95%	OR	IC95%
Analfabetismo										
Sí	1		1		1		1		1	
No	0,65	0,10-4,18	6,31	0,43-91,81	2,1	0,50-9,36	0,2	0,01-2,58	1,78	0,81-3,90
Aseguramiento en salud*										
Contribuyentes	1		1		1		1		1	
Subsidiados	1,26	0,20-7,99	ND	ND	0,88	0,14-5,60	7,36	0,86-63,25	1,26	0,67-2,37
Sin seguro	2,66	0,10-74,76	ND	ND	0,19	0,02-1,93	2,42	0,52-11,32	0,62	0,28-1,40
Inicio de relaciones sexuales (años)										
≥20	1		1		1		1		1	
15 a 19	2,65	0,61-11,51	2,19	0,34-14,19	1,63	0,25-10,90	1,78	0,26-12,36	1,85	0,88-3,89
<15	7,32	0,62-82,20	1,06	0,14-7,69	1,44	0,12-17,65	4,23	0,17-103,15	2,06	0,80-5,29
Edad al primer parto (años)										
≥20	1		1		1		1		1	
<19	2,72	0,79-9,36	1,07	0,16-6,92	1,92	0,24-15,22	0,94	0,14-6,26	1,25	0,66-2,37
Número de hijos nacidos vivos										
≤2	1		1		1		1		1	
≥3	1,00	0,33-3,02	2,38	0,57-9,98	3,25	0,65-16,20	0,87	0,19-3,96	1,34	0,77-2,34
Más de tres compañeros sexuales en la vida										
No	1		1		1		1		1	
Sí	,93	0,56-6,64	0,54	0,12-2,42	2,5	0,33-18,30	2,59	0,73-9,24	1,6	0,87-2,91
Uso de anticonceptivos orales (años)										
≤5	1		1		1		1		1	
≥5	1,48	0,30-7,32	6,67	1,54-25,59	7,63	0,41-140,80	1,11	0,21-15,97	2,53	1,32-4,86
Citología en los 36 meses previos										
Sí	1		1		1		1		1	
No	3,67	1,03-13,07	3,76	0,96-14,72	5,32	1,39-20,41	20,57	2,52-168,20	3,54	2,01-6,24

OR ajustados por las variables incluidas

Nuestros datos muestran, para todos los departamentos incluidos, que el antecedente de citología se relaciona con menor riesgo de cáncer invasor: en Caldas el OR no fue significativo, pero estuvo en el límite del intervalo de confianza. No obstante, la magnitud del efecto tuvo diferencias importantes entre grupos de población. Esta variación podría estar mediada en primera instancia por las coberturas de tamización de la población (diferencia en el antecedente de citología en los últimos tres años entre casos y controles). Concordantemente, los departamentos de Magdalena y Tolima mostraron los mayores gradientes de cobertura entre casos y controles (cuadro 2), lo cual se relaciona con la mayor efectividad observada en estos departamentos (OR de 5,32 y 20,57, respectivamente).

No obstante, la efectividad no mostró relación directa con la cobertura de la población en una perspectiva global, ya que, según la Encuesta

Nacional de Demografía y Salud de 2005, Caldas tiene las mayores coberturas, tanto para el antecedente de citología en los últimos tres años como para la medición a un año (81,3% y 66,8%, respectivamente), seguido en su orden, por Tolima (72,0% y 44,3%), Boyacá (70,7% y 43,3%) y Magdalena (66,6% y 47,6%) (16).

Un factor que pudiera relacionarse con la efectividad es la regularidad de los programas de tamización (frecuencia de la citología). Tolima y Caldas muestran un promedio mayor de citologías realizadas en los últimos cinco años (2,1 y 1,7, respectivamente), lo cual podría indicar mayor regularidad en la asistencia a los programas. Sin embargo, las diferencias con los departamentos restantes no son significativas y, nuevamente, el gradiente entre casos y controles para esta variable es más alto en el Magdalena (cuadro 2), lo que coincide con la mayor efectividad en este departamento que en Caldas.

Cabe destacar que, en general, hubo un alto porcentaje de casos de cáncer invasor con antecedentes de citología en los últimos tres años (49,5%). Este dato indica que, quizá, la efectividad está mediada por factores diferentes a la cobertura e inherentes a la prueba de tamización, sin embargo, es de anotar que el estudio no indagó sobre el acceso a la confirmación diagnóstica (colposcopia-biopsia) tras el resultado de una citología positiva. En este sentido, el hallazgo de 31 casos que no conocían el diagnóstico puede estar relacionado con la falta de seguimiento de las citologías positivas.

Un componente esencial de la tamización basada en la citología cérvico-uterina es el control de calidad, el cual resulta de mayor relevancia por tratarse de una prueba dependiente del operador. A pesar de su importancia, pocos países en desarrollo evalúan de forma rutinaria la calidad de la citología y, entre quienes lo hacen, pocos utilizan la correlación citología-biopsia como indicador (4). En América Latina, únicamente Chile y Cuba tienen datos nacionales y sólo el primero utiliza el índice anotado previamente (4). Además, algunas experiencias adelantadas en la región demuestran que lograr niveles adecuados de calidad es una tarea difícil y que mantenerlos resulta aún más complicado (17,18).

Al momento de esta publicación no se cuenta con datos sobre la calidad de la citología en los departamentos incluidos, ni en otras regiones del país. Sin embargo, la baja efectividad observada en Boyacá y Caldas, en donde la historia de citología no difiere mayormente entre casos y controles (cuadro 2), indican que el problema para los dos se centra probablemente en la calidad de la prueba, a diferencia de Magdalena y Tolima, en donde quizá pesa más la baja cobertura de la población de alto riesgo, hecho coincidente con una mayor tasa de analfabetismo y un promedio de citologías en los casos mucho menor.

En un estudio cualitativo de la percepción de los actores sobre el programa de tamización en los cuatro departamentos incluidos, se encontró que las actividades de control de calidad son prácticamente inexistentes (10), lo cual

corroboraría la hipótesis planteada en torno a la calidad como el factor de mayor contribución en el hallazgo de una menor efectividad en Boyacá y Caldas. No obstante, algunos trabajos plantean la posibilidad de introducir un sesgo en contra de la citología si no se diferencian los casos detectados por tamización; esto puede ocurrir cuando los estudios se basan en datos rutinarios y se ha corregido asumiendo como caso únicamente los cánceres en estadio IB o más (14). Nuestro estudio incluye como controles casos de cáncer *in situ* lo que corrige parcialmente el problema; además, la limitación descrita no explicaría las diferencias observadas entre departamentos, toda vez que las historias de tamización de los casos son equiparables entre los que tuvieron baja efectividad y los que tuvieron efectividad media o alta (cuadro 2).

Apesar de que no es posible obtener conclusiones definitivas por la falta de información sobre la calidad de la prueba y el acceso a la confirmación diagnóstica, la información aportada por el estudio es muy relevante, debido a que evidencia que la problemática de la tamización de cáncer de cuello uterino, al menos para dos de los cuatro departamentos evaluados, no se centra en la cobertura sino en otros componentes del programa. Esto corrobora hallazgos previos que indican que aspectos distintos de la cobertura, como el seguimiento de las mujeres con citología positiva, podrían tener mayor impacto (19), y es contrario al énfasis puesto actualmente en la normatividad del país (metas de programación). Tal situación exige la obtención de información complementaria sobre otros componentes de los programas, la revisión urgente de la normatividad y el fortalecimiento integral de las estrategias de tamización.

Conflicto de intereses

Ninguno de los autores declara conflictos de interés para la publicación de este manuscrito.

Financiación

El trabajo fue realizado con recursos de inversión de la Nación suministrados al Instituto Nacional de Cancerología y designados bajo el código institucional 41030311-05.

Referencias

1. **Kitchener H, Castle P, Cox J.** Achievements and limitation of cervical cytology screening. *Vaccine*. 2006;24:63-70.
2. **Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM.** Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. Lyon: IARC Press; 2002.
3. **Sankaranarayanan R, Madhukar-Budukh A, Rajkumar R.** Effective screening programmes for cervical cancer in low- and middle-income developing countries. *Bull World Health Organ*. 2001;79:954-62.
4. **Murillo R, Almonte M, Pereira A, Ferrer E, Gamboa O, Jerónimo J, et al.** Cervical cancer screening programs in Latin America and the Caribbean. *Vaccine*. 2008;26:L37-48.
5. **Aristizábal N, Cuello C, Correa P, Collazos T, Haenszel W.** The impact of vaginal cytology on cervical cancer risks in Cali, Colombia. *Int J Cancer*. 1984;34:5-9.
6. **Liu S, Semenciw R, Probert A, Mao Y.** Cervical cancer in Canada: changing patterns in incidence and mortality. *Int J Gynecol Cancer*. 2001;11:24-31.
7. **Murillo R.** Control del cáncer de cuello uterino en Colombia: triunfos y desafíos de la tamización basada en la citología cérvico-uterina. *Biomédica*. 2008;28:468-70.
8. **Piñeros M, Hernández G, Bray F.** Increasing mortality rates of common malignancies in Colombia: an emerging problem. *Cancer*. 2004;101:2285-92.
9. **Murillo R, Piñeros M, Hernández G.** Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia. Bogotá: Instituto Nacional de Cancerología, Instituto Geográfico Agustín Codazzi; 2004.
10. **Wiesner C, Murillo R, Piñeros M, Tovar S, Cendales R, Gutiérrez MC.** El control del cáncer cervicouterino en Colombia: percepción de los actores del sistema de salud. *Rev Panam Salud Pública*. 2008; en imprenta.
11. **Herrero R, Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, de Britton RC, Gaitan E, et al.** Screening for cervical cancer in Latin America: a case-control study. *Int J Epidemiol*. 1992;21:1050-6.
12. **Hernández-Ávila M, Lazcano-Ponce EC, de Ruiz PA, Romieu I.** Evaluation of the cervical cancer screening programme in Mexico: a population-based case-control study. *Int J Epidemiol*. 1998;27:370-6.
13. **Zappa M, Visioli CB, Ciatto S, Iossa A, Paci E, Sasieni P.** Lower protection of cytological screening for adenocarcinomas and shorter protection for younger women: the results of a case-control study in Florence. *BJC*. 2004;90:1784-6.
14. **Sasieni P, Adams J, Cuzick J.** Benefit of cervical screening at different ages: evidence from the UK audit. Of screening histories. *BJC*. 2003;89:88-93.
15. **Andrae B, Kemetli L, Sparén P, Silfverdal L, Strander B, Ryd W, et al.** Screening-preventable cervical cancer risks: evidence from a nationwide audit in Sweden. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100:622-9.
16. **Piñeros M, Cendales R, Murillo R, Wiesner C, Tovar S.** Cobertura de la citología de cuello uterino y factores relacionados en Colombia, 2005. *Rev Salud Pública (Bogotá)*. 2007;9:327-41.
17. **Lazcano-Ponce EC, Moss S, Alonso P, Salmerón J, Hernández M.** Cervical cancer screening in developing countries: why is it ineffective? The case of Mexico. *Arch Med Res*. 1999;30:240-50.
18. **Lewis MJ.** A situational analysis of cervical cancer in Latin America and the Caribbean. Washington D.C.: Pan American Health Organization; 2004.
19. **Gamboa OA, Chicaíza L, García-Molina M, Díaz J, González M, Murillo R, et al.** Cost-effectiveness of conventional cytology and HPV-DNA testing for cervical-cancer screening in Colombia. *Salud Pub Mex*. 2008;50:276-85.

ARTÍCULO ORIGINAL

Efficacy of Orbscan II® and Pentacam® topographers by a repeatability analysis when assessing elevation maps in candidates to refractive surgery

María Ximena Núñez¹, Claudia Blanco^{1,2}

¹ Cornea and Refractive Surgery Unit, Vision Sana Research Group, Clínica de Oftalmología de Cali, Cali, Colombia

² Ophthalmology Service. Universidad del Valle, Cali, Colombia

Introduction: Anterior and posterior corneal elevations are measurements used to detect keratoconus suspects.

Purpose: To determine the efficacy of Orbscan II® and Pentacam® when assessing their elevation maps.

Materials and methods: The efficacy of the Orbscan II and Pentacam measuring the anterior and posterior corneal elevations were evaluated in a sample of 68 eyes. The concordance between the two devices and the coefficient of repeatability were measured following the parameters of the British Standard Institution by the Bland-Altman concordance analysis and the Lin concordance correlation coefficient.

Results: The coefficient of repeatability at the point of maximum anterior elevation was 68.29% with the Orbscan and 24.20% with the Pentacam. The concordance correlation coefficient was 0.64 (CI 95%: 0.48-0.76) with the Orbscan and 0.94 with the Pentacam (CI 95%: 0.91-0.96). The coefficient of repeatability at the point of maximum posterior elevation was 38.7% with the Orbscan and 68.0% with the Pentacam. The concordance correlation coefficient was 0.69 with the Orbscan (CI 95%: 0.55-0.80) with a precision of 0.71 and an accuracy of 0.97, and 0.24 with the Pentacam (CI 95%: 0.00-0.45) with a precision of 0.24 and an accuracy of 0.99.

Conclusions: Measurement of the point of maximum posterior elevation is better with the Orbscan II and less precise with the Pentacam. The random error can be reduced by using the mean of three assessments and can serve as a guide in the search of diagnostic devices with minimum absolute relative error in all measurements.

Key words: cornea, corneal topography, keratoconus, reproducibility of results, selection bias, efficacy

Eficacia del Orbscan II y Pentacam en la evaluación de los mapas de elevación en candidatos a cirugía refractiva mediante un análisis de repetibilidad

Introducción. La elevación posterior es una de las medidas usadas para detectar pacientes con sospecha de queratocono.

Objetivo. Determinar la eficacia del Orbscan II y Pentacam en la evaluación de los mapas de elevación.

Materiales y métodos. Se evaluaron 68 ojos con Orbscan II y Pentacam. Con parámetros del *British Standard Institution*, se midieron el coeficiente de repetibilidad mediante un análisis de concordancia con el método de Bland-Altman y el coeficiente de correlación de concordancia de Lin. Se midió la concordancia entre ambos equipos.

Resultados. El coeficiente de repetibilidad del punto de máxima elevación anterior en Orbscan fue de 68,29% y de 24,20% en Pentacam. El coeficiente de correlación de concordancia fue de 0,64 (IC95% 0,48-0,76) en Orbscan y en Pentacam fue de 0,94 (IC95% 0,91-0,96). El coeficiente de repetibilidad del punto de máxima elevación posterior en Orbscan fue de 38,69% y en Pentacam fue 68,03%. El coeficiente de correlación de concordancia en Orbscan fue de 0,69 (IC95% 0,55-0,80) con una precisión de 0,71 y una exactitud de 0,97, y en Pentacam fue de 0,24 (IC95% 0,00-0,45) con una precisión de 0,24 y una exactitud de 0,99.

Conclusiones. La eficacia de Orbscan II y Pentacam en la evaluación del punto de máxima elevación posterior resulta afectada por la imprecisión de la medida y es peor en el Pentacam. Este error aleatorio se puede manejar usando la media de tres mediciones y nos orienta a la búsqueda de equipos en los que el error relativo absoluto sea el menor posible en todas las medidas que ofrezca.

Palabras clave: córnea, topografía de la córnea, queratocono, reproducibilidad de resultados, sesgo de selección, eficacia.

The assessment of the radius at the point of maximum anterior and posterior elevation can be taken from the elevation maps shown by topographers such as the Orbscan II (Bausch & Lomb Surgical, Rochester, USA), Pentacam (Oculus, Wetzlar, Germany), or the very new rasterstereography topographer (Galilei, Ziemer Group, Port, Switzerland.)

This evaluation is part of the preoperative evaluation of patients who are going to refractive surgery, and is used to establish if corneas are normal, or with keratoconus. Other preoperative measurements are keratometry, pachymetry. The difference between the upper and lower half from the cornea and other more complex radii obtained from topographers data based on Placido disk, slit scanning, Scheimpflug cameras or combinations of these systems. Laser-Assisted *in situ* Keratomileusis (LASIK) is contraindicated when keratoconus is suspected or confirmed due to a possible biomechanical decompensation and corneal ectasia.

Regarding anterior and posterior elevations values reported, Rao, *et al.* (1) considered 12 μm as the maximum anterior elevation radius and 40 μm as the normal Orbscan II limit of maximum posterior elevation radius. Although the posterior corneal surface is not optically as important as the anterior one, it has been considered structurally more fluid and a more sensitive indicator of abnormality (2).

Likewise, there are publications about the repeatability of the Pentacam determining the

posterior curvature radius after a refractive surgery (3), repeatability of the Pentacam assessing the corneal power in curvature maps, corneal thickness, anterior chamber and pupil (4), repeatability of the Orbscan and Pentacam measuring the corneal thickness (5), and repeatability of the Pentacam establishing the anterior and posterior sphere of reference (6). However, studies were not found that reported the repeatability of the maximum anterior and posterior elevation points assessed by the Orbscan or Pentacam--the two usual assessments achieved preoperatively before refractive surgeries.

Before comparing the elevation maps given by the Orbscan and Pentacam, repeatability determined by the precision and accuracy of their measurements must be characterized. The level of confidence on the information provided by these devices depends on the efficacy of both devices--defined as the difference between what was measured and the real value (7). The purpose of the current work is to establish the confidence and repeatability of the best sphere of reference (BFS) and of the radius at the point of maximum anterior and posterior elevation achieved by the Orbscan II and the Pentacam by means of the coefficient of repeatability (CR) and the Lin's concordance correlation coefficient (CCC).

Materials and methods

Patients consulting the Refractive Surgery Unit by the first time at the Clínica de Oftalmología de Cali (Colombia) between May 5 and May 10, 2006 were included in the study because the four topographic devices were available during that time. The sample size was fixed at 90 eyes because this number constituted the institutional weekly historical average during the 12 months prior to this research. After the initial

Correspondence:

María Ximena Núñez, Clínica de Oftalmología de Cali, carrera 47 Sur No. 8C-94, office 201, Cali, Colombia.
Phone number: (572) 5110253-25110293; Fax (572) 5520896.

dranunez201@yahoo.es, ximena@visionsana.com

Recibido: 03/07/08; aceptado:10/03/09

recruitment of 90 eyes, 78 eyes from 41 patients satisfied the inclusion criteria. At this stage, 12 eyes from 8 patients were excluded, 6 eyes because suspected keratoconus and 6 eyes for incomplete data. Abnormal suspicious corneas, and with keratoconus were excluded because they may provide extremely variable data that will be difficult to compare with normal corneas. From the 78 eyes remaining, 10 eyes were also excluded from 5 patients who did not agree to participate in the study. The final eligible sample was 68 eyes from 36 patients.

The average age was 35 years (range, 20 to 45 years). These were candidates for refractive surgery and had normal corneas based in their refraction, slit lamp examination, pachymetry, slit scanning topography (Orbscan II), single Scheimpflug topography (Pentacam) and Placido disc topography (Scout and Tomey). Topographic exams were performed by skilled and experienced staff. The results were assessed in a blinded design. Patients coming to the refractive surgery unit received a consecutive number by personnel not involved in the study. Exams were not identified regarding to their age, gender, race, and origin of patients or to the practitioner who requested the test, allowing a camouflage of information for operators and researchers.

When the patients were using contact lenses, they were instructed to stop 15 days prior to the topographic examinations. The Orbscan II and Pentacam maps with poor centering were repeated to avoid errors of the BFS. Automatic established Orbscan II parameters were used for the float BFS elevation maps centered to the apex defined by this system. The Orbscan II BFS was obtained from a 10-mm-diameter area and its Placido disc data were used to obtain the curvature maps. With the Pentacam, a 10-mm-diameter area was also used to calculate the float BFS fixed to the apex defined by the Scheimpflug system but the curvature maps were derived from the elevation data.

To measure the repeatability of each device, parameters from the British Standard Institute were followed (8,9). Three measurements per

eye from each patient and each device were taken by the same operator between 8:00 am and 5:00 pm. Two consecutive measurements per eye from each patient and each device were taken by the same operator. The concordance between the measurements per device was calculated using the coefficient of repeatability (CR) of Bland Altman (10) obtained from the repeated measurements taken under identical conditions. The CR was defined as the standard deviation (SD) of the mean difference from the repeated measurements divided by the mean value. The confidence intervals of 95% (CI 95%) were obtained from the limits of agreement (LOA) of the mean differences (difference mean \pm 1,96 x standard deviation). The agreement, precision and correction factor of the measurement trend was assessed using the concordance correlation coefficient (CCC) of Lin (11,12). The correlation coefficient of Pearson was used to assess the linear association between measurements. Normal data was defined by means of the skewness and kurtosis coefficients. The t-test level of significance was $p < 0.005$. In addition, the concordance between both devices was calculated using the Bland Altman and Lin tests. The analysis was done using the Medcalc software, version 9.4.2.0.

Ethical matters

The protocol of this research was approved by the Institutional Medical Committee from the Clínica de Oftalmología de Cali. An informed authorization was signed by patients according to the Resolution 8430 of 1993.

Results

Radius of the anterior sphere of reference

The mean radius of the anterior BFS from the Orbscan II and Pentacam is shown in table 1. The data showed a normal distribution. The mean difference between the repeated means was -0.009 (CI 95%: -0.019 to 0.001, SD = \pm 0.04) with the Orbscan II and -0.002 (CI 95%: -0.007 to 0.001; SD = \pm 0.01) with the Pentacam. The concordance limits are shown in table 2.

The coefficient of repeatability, the concordance correlation coefficient, the accuracy and the

Table 1. Means of the radius of BFS and anterior and posterior elevations provided by the Orbscan II and Pentacam.

Corneal Radius	Orbscan II Mean \pm SD	Pentacam Mean \pm SD	Value of p
raBFS	7.90 mm \pm 0.24 CI 95%: 7.84-7.96	7.95 mm \pm 0.23 CI 95%: 7.89-8.01	p <0.0001
rpBFS	6.52 mm \pm 0.24 CI 95%: 6.46-6.57)	6.69 mm \pm 0.24 CI 95%: 6.63-6.75	p <0.0001
rMEA	9.27 μ m \pm 3.49 CI 95%: 8.41-10.14	11.50 μ m \pm 4.26 CI 95%: 10.44-12.55	p <0.0001
rMEP	27.81 μ m \pm 6.69 CI 95%: 26.15-29.47	29.50 μ m \pm 6.81 CI 95%: 27.81-31.19	p=0.20

raBFS: mean of the radius of the anterior sphere of reference
 rpBFS: mean of the radius of the posterior sphere of reference
 rMEA: mean of the radius at the point of maximum anterior elevation
 rMEP: mean of the radius at the point of maximum posterior elevation
 SD: standard deviation
 CI: confidence interval

precision from the repeated measurements with the Orbscan II and Pentacam are shown in table 3. The difference of means between the Orbscan II and Pentacam was -0.04 (CI 95%: -0.05 to -0.03, SD $=\pm$ 0.04). The range of LOA agreement was -0.13 to 0.04. The CCC was 0.96.

Radius of the posterior sphere of reference

The mean radius of the posterior BFS from the Orbscan II and Pentacam is shown in table 1. The data showed a normal distribution. The difference of means was -0.014 (CI 95%: -0.028 to 0.000; SD $=\pm$ 0.05) with the Orbscan II and 0.000 (CI 95%: -0.009 to 0.010; SD $=\pm$ 0.04) with the Pentacam. The range of agreement are shown in table 2.

The coefficient of repeatability, the concordance correlation coefficient, the accuracy and the precision from the repeated measurements with the Orbscan II and Pentacam are shown in table 3.

The difference of means between Orbscan II and Pentacam was of -0.17 (CI 95%: -0.20 to -0.14; SD $=\pm$ 0.11). The range of LOA agreement was -0.39 to 0.04. The CCC was of 0.71.

Radius at the point of maximum anterior elevation

The mean radius at the point of maximum anterior elevation in the Orbscan II and Pentacam is shown in table 1. The data showed a normal

distribution. The difference of means was -0.184 (CI 95%: -0.986 to 0.617; SD $=\pm$ 3.23) with the Orbscan II and 0.138 (CI 95%: -0.214 to 0.491; SD $=\pm$ 1.42) with the Pentacam. The limits-of-agreement are shown in table 2.

The coefficient of repeatability, the concordance correlation coefficient, the accuracy and the precision from the repeated measurements with the Orbscan II and Pentacam are shown in table 3. The difference of means between Orbscan II and Pentacam was -2.22 (CI 95%: -3.09 to -1.35; SD $=\pm$ 3.50). The range of LOA agreement was -9.08 to 4.64. The CCC was of 0.51.

Radius at the point of maximum posterior elevation

The mean radius at the point of maximum posterior elevation in the Orbscan II and Pentacam is shown in table 1. The data showed a normal distribution. The difference of means was 1.35 (CI 95%: -0.007 to 2.71; SD $=\pm$ 5.49) with the Orbscan II and 0.23 (CI 95%: -2.30 to 2.76; SD $=\pm$ 10.24) with the Pentacam. The limits-of-agreement are shown in table 2.

The coefficient of repeatability, the concordance correlation coefficient, the accuracy and the precision from the repeated measurements of Orbscan II and Pentacam are shown in table 3. The difference of means between Orbscan II and Pentacam was -1.69 (CI 95%: -4.31 to 0.93;

Table 2. Limits-of-agreement (LOA) of the mean differences between repeated measurements of Orbscan II and Pentacam calculated with the Bland-Altman's method.

Corneal radius	Mean	SD	LOA
raBFS Orbscan II	-0.009	0.042	-0.092/0.073
raBFS Pentacam	-0.002	0.018	-0.038/0.032
rpBFS Orbscan II	-0.014	0.057	-0.127/0.097
rpBFS Pentacam	0.000	0.041	-0.080/0.080
rMEA Orbscan II	-0.184	3.235	-6.525/6.156
rMEA Pentacam	0.138	1.423	-2.652/2.929
rMEP Orbscan II	1.353	5.492	-9.411/12.119
rMEP Pentacam	0.230	10.245	-19.849/20.31

raBFS: radius from the anterior sphere of reference
 rpBFS: radius from the posterior sphere of reference
 rMEA: radius at the point of maximum anterior elevation
 rMEP: radius at the point of maximum posterior elevation
 SD: standard deviation

Table 3. Measurement of coefficients of repeatability provided by the Orbscan II and Pentacam. Precision and accuracy from the repeated measurements.

Corneal radius	CR %	CCC	Precision	Accuracy
raBFS Orbscan II	1.04	0.98	0.98	0.99
raBFS Pentacam	0.44	0.99	0.99	0.99
rpBFS Orbscan II	1.71	0.97	0.97	0.99
rpBFS Pentacam	1.20	0.98	0.98	0.99
rMEA Orbscan II	68.29	0.64	0.64	0.99
rMEA Pentacam	24.20	0.94	0.94	0.99
rMEP Orbscan II	38.69	0.69	0.71	0.97
rMEP Pentacam	68.03	0.24	0.24	0.99

CR: repeatability measured by the coefficient of repeatability
 CCC: Lin's concordance correlation coefficient
 raBFS: radius of the anterior sphere of reference
 rpBFS: radius of the posterior sphere of reference
 rMEA: radius at the point of maximum anterior elevation
 rMEP: radius at the point of maximum posterior elevation

SD = ±10.60). The range of LOA agreement was -22.47 to 19.08. The CCC was of -0.22.

Discussion

With the Orbscan II we found a mean radius of the anterior and posterior BFS and a mean radius at the point of anterior and posterior maximum elevation (table 1) similar to those found by Fam, *et al.* in normal patients (13). However, we found a mean radius at the point of anterior and posterior maximum elevation with the Orbscan II and Pentacam different from those found by Hashemi, *et al.* (14). In this latter study, the values with the Pentacam, 6.80 μm and 17.98

μm respectively, corresponded to an adjustment of a BFS from an area with 6 mm, as the authors have indicated; however, the values with the Orbscan II, 14.07 μm and 32.87 μm respectively, seem to correspond to an adjustment of a BFS with 10 mm and not 6 mm as the authors show.

Chen, *et al.* found a good intrasession and intersession repeatability of the anterior and posterior BFS radius with the Pentacam, but they used the Cronbach test, indicated for psychological studies. Therefore, we believe this study did not accomplish the standards agreed for the analysis of this type of comparisons

(8-10). Furthermore, they suggested that taking an average of several exams is better than an individual reading, probably because this is a way to compensate statistically for the imprecision of the exam.

The coefficient of repeatability, the concordance correlation coefficient, the precision and accuracy of the radius of the anterior and posterior BFS with the Orbscan II and Pentacam were excellent, as shown by the standard deviation of differences and the lower LOA. Therefore, both topographers were efficient in providing the value of these variables and their measurements can be considered reliable.

The radius at the Pentacam's maximum anterior elevation point showed a poor CR, although it had excellent CCC, precision and accuracy. The CR of 1.42 was established by the standard deviation of the means differences of 1.42, with lower LOA of -2.652 and an upper LOA of 2.929. These findings have significant clinical importance because the difference among measurements can be until 3, a close value found for the standard deviation of the group mean (± 4.26).

The radius at the Orbscan's maximum anterior elevation point showed a poor CR determined by its regular precision and the standard difference of the difference of means of 3.23, with a lower LOA of -6.525 and an upper LOA of 6.156. These findings implied a wide variability of the result and therefore a clinical impact.

The CR from the radius at the point of maximum posterior elevation from Orbscan II and Pentacam was poor at the expense of the precision and the great SD from the differences of the means. It was worst in the case of Pentacam where the LOA of -19.849 at the lower limit and 20.31 at the upper limit gave differences up to 20 μm between exams with the same device, same patient and same examiner.

Our results on the precision measured with the Lin 's CCC and the SD from the differences measured by the Bland Altman test were in agreement with the assessments by repeated measurements. The SD indicated the level of

precision of our findings, with the lesser standard deviation indicating greater precision (7).

Comparing the Orbscan II and the Pentacam, we found differences between the radius of the anterior and posterior BFS, and the radius at the point of maximum anterior elevation with the t-test and the concordance test. The radius at the point of maximum posterior elevation did not show significant differences (t-test), but the concordance test showed a very high standard deviation with a consistent significant clinical limit of difference between both topographers.

Quisling, *et al.* (15) compared the Orbscan II and the Pentacam equaling parameters in both devices and found differences among eyes with keratoconus at the radius of the point of maximum posterior elevation, even though they did not find differences at the radius of the posterior BFS. Although their study used random samples, their results may have potential selection biases or information; therefore the inference to the general population is limited and the data is only applicable to the population studied. Because little information is available in the literature, our results are a great import because show an approximation to the real precision of the radius of the anterior and posterior BFS and the radius at the point of maximum anterior and posterior elevation taken with the Orbscan II and Pentacam. Furthermore, since the sample population did not differ from the at large population, the use of normal corneas in our research strengthens this approximation.

This is the first comparative study about the repeatability of the radius at the point of maximum anterior and posterior elevation provided by the Orbscan II and the Pentacam in patients with normal, unexplored corneas. It shows how the imprecision of this measurement appreciably affects the efficacy of Orbscan II and Pentacam during the preoperative evaluation of refractive surgery. The imprecision with the Pentacam (0.24) was worst. In contrast to the excellent accuracy of the same measurement, we discarded systematic errors from the examiner, with the calibration of the device or with the assessed persons. The imprecision of the maximum

posterior elevation with the Pentacam (0.24) was worst. In contrast, we found an excellent accuracy of the same measurement, thus we discarded systematic errors from the examiner, in the calibration of the device or the assessed persons. This concept guides our search for new devices that provide better resolution and, with different technological combinations, may show the least absolute relative error in a given measurement.

Conflict of interest

The authors do not have any commercial interest in products or companies described in this study.

Financing

The work was financed by *Clínica de Oftalmología de Cali*

References

1. **Rao S, Raviv T, Majmudar PA, Epstein RJ.** Role of Orbscan II in screening keratoconus suspects before refractive corneal surgery. *Ophthalmology*. 2002;109:1642-6.
2. **Turner T.** What corneal topography can tell you about corneal shape. In: Drummond AE, editor. *Customized corneal ablation: The quest for supervision*. 1st edition. Grove Road: Slack Inc; 2001. p. 11-32.
3. **Jain R, Dilraj G, Grewal SP.** Repeatability of corneal parameters with Pentacam after laser *in situ* keratomileusis. *Indian J Ophthalmol*. 2007;55:341-7.
4. **Shankar H, Taranath D, Santhirathelagan CT, Pesudovs K.** Anterior segment biometry with Pentacam: comprehensive assessment of repeatability of automated measurements. *J Cataract Refract Surg*. 2008; 34: 103-13.
5. **Lackner B, Schmidinger G, Pieh S, Funovics MA, Skorpik C.** Repeatability and reproducibility of central corneal thickness measurement with Pentacam, Orbscan, and Ultrasound. *Optom Vis Sci*. 2005;82:892-9.
6. **Chen D, Lam AK.** Intrasession and intersession repeatability of the Pentacam system on posterior corneal assessment in the normal human eye. *J Cataract Refract Surg*. 2007;33:448-54.
7. **Carvajal R.** Medición. En: Carvajal A, Torres C, Pubiano J, editores. *Estadística para análisis epidemiológico*. 1 edición. Cali: Catorse; 2004. p. 18-32.
8. **British Standards Institution.** Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results: general principles and definitions. BS ISO 5725 part 1. London: HMO; 1994.
9. **British Standards Institution.** Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results: basic methods for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. BS ISO 5725 part 2. London: HMO; 1994.
10. **Bland JM, Altman DG.** Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986;8:307-10.
11. **Lin LI.** A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics*. 1989;45:255-68.
12. **Lin LI.** A note on the concordance correlation coefficient. *Biometrics*. 2000;56:324-5.
13. **Fam HB, Lim KL.** Corneal elevation indices in normal and keratoconic eyes. *J Cataract Refract Surg*. 2006;32:1281-7.
14. **Hashemi H, Mehrvaran S.** Corneal changes after laser refractive surgery for myopia: comparison of Orbscan II and Pentacam findings. *J Cataract Refract Surg*. 2007;33:841-7.
15. **Quisling S, Sjoberg S, Zimmerman B, Goins K, Sutphin J.** Comparison of Pentacam and Orbscan IIz on posterior curvature topography measurements in keratoconus eyes. *Ophthalmology*. 2006;113:1629-32.

ARTÍCULO ORIGINAL

DetECCIÓN DE EFECTOS SECUNDARIOS ASOCIADOS A LA ADMINISTRACIÓN DE TRAMADOL Y DAPIRONA EN UN HOSPITAL DE ALTA COMPLEJIDAD

Giovanny Alberto Montoya, Claudia Vaca, María Fernanda Parra

Departamento de Farmacia, Hospital Universitario de La Samaritana, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. Un objetivo prioritario después de la comercialización de medicamentos, como la dipirona y el tramadol, en grupos particulares de población, como el colombiano, es garantizar la eficacia y la seguridad.

Objetivo. Describir y estimar la frecuencia de efectos secundarios, incluida la falla terapéutica, asociados al uso de tramadol y a la dipirona en el Hospital Universitario de La Samaritana (III nivel).

Materiales y métodos. Se hizo seguimiento intensivo de los efectos secundarios asociados a la dipirona y al tramadol en los pacientes hospitalizados en los Servicios de Medicina Interna, Ortopedia y Cirugía, durante un período de seis meses como parte de un proyecto a un año. La información se recolectó mediante el formato para reporte al Instituto Nacional de Vigilancia Médica y Alimentos, INVIMA. La probabilidad de causalidad se estableció mediante el algoritmo de la Organización Mundial de la Salud. Se calcularon los costos directos desde la perspectiva del pagador.

Resultados. Se detectaron 213 efectos secundarios en 171 de los 2.547 pacientes que ingresaron a los servicios (proporción de incidencia, 8,4%). El 53,4% se clasificó como posible para la dipirona y 46,82% para el tramadol; el 0,62%, (16 casos) correspondió a efectos secundarios serios. El sistema más frecuentemente afectado fue el gastrointestinal: dipirona, 27%, y tramadol, 42,9%. El costo generado por la atención de los efectos secundarios a los medicamentos del estudio fue de US\$ 14.346,53.

Conclusiones. El impacto negativo de los efectos secundarios de los medicamentos, los recursos que se emplean en su atención y la capacidad de prevenirlos, demuestran que se requieren programas institucionales de farmacovigilancia.

Palabras clave: dipirona/efectos secundarios, tramadol/efectos secundarios, costos en medicamentos, farmacoepidemiología.

Adverse events associated with tramadol and dipirona administration in a level III hospital

Introduction. The efficacy and safety of pharmaceutical drugs such as dipirone and tramadol must be a primary objective in the post-marketing period and as they are used in specific population groups.

Objectives. The frequency of adverse effects (including therapeutic failure) with the medications tramadol and dipirona were described and estimated.

Material and methods. At the Hospital Universitario de la Samaritana, Bogotá, D.C., Colombia, adverse events associated with dipirone and tramadol were rigorously tracked in patients hospitalized in the internal medicine, as well as the orthopedics and surgery departments. For a period of six months, data were collected by means of the Instituto Nacional de Vigilancia Médica y Alimentos (INVIMA) standard report form. Direct costs of adverse event treatment to the patient were calculated.

Results. Adverse reactions were detected 213 times in 171 (8.4%) of the 2,547 patients admitted to the services (incidence rate. Of these instances, 53.4% were rated as possible for dipirone and 46.82% for tramadol. Of the total, 0.6% (16 cases) were classes as serious adverse events. The gastrointestinal system was the most affected, with the incidences of adverse events for dipirone

of 27%) and tramadol of 42.9%. The total cost generated by the medical response to the 213 adverse events was estimated to be US\$14,346.53.

Conclusions. An unacceptable level of preventable adverse events was described that impacted the well-being of patients, as well as the costs associated with remedial treatment. These data recommend that institutional pharmacovigilance programs be required.

Key words: Dipyron/adverse effects, tramadol/adverse effects, drug costs, pharmaco-epidemiology.

La dipirona, también denominada metamizol, es un analgésico no narcótico de la familia de las pirazolonas, con actividad antiinflamatoria moderada y buena actividad analgésica y antipirética, pero con la potencialidad, como otros medicamentos, de producir efectos secundarios graves. Suecia y otros países industrializados, como Estados Unidos, retiraron el uso de dipirona hacia la década de los setenta, debido a los casos de agranulocitosis y anemia aplásica asociados a su uso, cuya mortalidad está cercana a 10%, y que se asocia a otras manifestaciones clínicas más comunes de tipo infeccioso, tales como amigdalitis, faringitis, estomatitis o neumonía (1). La incidencia de discrasias sanguíneas con la dipirona fue estimada en uno de cada 3.000 usuarios y, en 1981, *The Deutsche Bundesgesundheitsamt* calculó el riesgo de agranulocitosis con dipirona en uno de cada 20.000 usuarios por año, razón por lo cual también restringió su uso y prohibió todas sus indicaciones (2). No obstante, en Colombia y otros países, entre los que se incluyen Alemania, Italia, Francia, España, Suiza, Holanda y toda América Latina desde 1943, y la mayoría de los países asiáticos y africanos, continúan la comercialización de este fármaco.

“Las cifras varían en el tiempo, pero se calcula que al cabo de un año, se producen unos 220 millones de tratamientos con dipirona en América Latina. Es decir, que cada día se inician unos 600.000 tratamientos con este medicamento. Específicamente en Colombia, unos ocho millones de personas utilizan cada año medicamentos que contienen dipirona” (3).

Correspondencia:

Giovanny Montoya, Carrera 20 N° 187-71, casa 43, Bogotá, D.C., Colombia

Teléfono: (571) 673 4520

gamontoyapi@unal.edu.co

Recibido: 02/09/08; aceptado:10/03/09

En 1986, el *International Aplastic Anemia and Agranulocytosis Study*, llamado Estudio Boston, demostró grandes diferencias en la variación de riesgo en diferentes países, que podría explicarse por diferentes factores, como consumo y frecuencia del uso de dipirona, susceptibilidad genética de la población a la agranulocitosis y otros factores propios, y reportó una incidencia de agranulocitosis inducida de uno por cada 1'100.000 usuarios por semana. La dipirona claramente causa agranulocitosis, pero existe información insuficiente para cuantificar adecuadamente el riesgo (4). Es por esto que el determinar el balance riesgo/beneficio y los costos que se generan por los efectos secundarios asociados al uso de dipirona, es importante para los países en los que aún se comercializa, incluyendo Colombia.

Existen varias proyecciones, estudios observacionales y retrospectivos a partir de consumo del medicamento, que muestran que la incidencia de agranulocitosis asociada con la dipirona en América Latina es realmente baja y significativamente menor que la reportada en países como Suecia. Por ejemplo, el estudio de Sollero *et al.* realizado en Brasil, abarcó un período de 20 años, de 1954 a 1974, con 531.261 pacientes. Se registraron 15 casos de agranulocitosis por pirazolonas (incidencia<0,002%) y un caso por dipirona (incidencia<0,0002%) (5). En el “Estudio de prevalencia de agranulocitosis inducida por drogas en São Paulo, Brasil” de Nelson Hamerschlakl, que se llevó a cabo de septiembre de 1981 a marzo de 1990, en el cual se analizaron 19.385 historias clínicas, se encontraron cinco casos de agranulocitosis y sólo se confirmó en un caso la relación entre dipirona y el efecto secundario, con una incidencia de 0,44 a 0,82 casos por millón de pacientes al año.

En Argentina, el “Estudio retrospectivo de prevalencia de agranulocitosis en el medio hospitalario argentino” de Daniel Goldenberg *et al.*, en el que se analizaron 1'100.000 conteos de laboratorio en siete hospitales de la República Argentina, se encontraron seis casos en tres años de evaluación retrospectiva. En México, Jorge Bernardo Vargas Correa *et al.* elaboraron el estudio “Metamizol. Evaluación del riesgo para agranulocitosis y anemia aplásica”, en el que se revisaron los registros del Servicio de Hematología del Hospital Regional Mérida del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) desde 1992, y también se evaluaron los registros de los 10 años previos del Servicio de Medicina Interna (ingresos por agranulocitosis o anemia aplásica), así como los de consumo de medicamentos y metamizol del hospital mediante los registros de la farmacia de tres años a la fecha; se encontraron tres casos de agranulocitosis y cuatro de anemia aplásica en tres años de investigación retrospectiva; ninguno de ellos se asoció al uso de metamizol. La incidencia de anemia aplásica reportada en estudios mexicanos fue mayor, con 3,9 por millón de individuos al año (6).

El tramadol es un analgésico narcótico, derivado sintético de la codeína, utilizado para el control del dolor moderado a grave, como la mayoría de los opiáceos.

Cossmann *et al.* (1997) consideraron la información proveniente de los estudios clínicos de fase II a IV y después de la comercialización, y recolectaron datos provenientes de cerca de 21.000 pacientes, y encontraron que los efectos secundarios más frecuentes fueron: náuseas (6,1%), desvanecimiento (4,6%), somnolencia (2,4%), cansancio/fatiga (2,3%), sudoración (1,9%), vómito (1,7%), boca seca (1,6%), y alguna reacción de hipersensibilidad dada por alergias o reacciones anafilácticas (0,1%) (7).

En el estudio publicado por Tribiño y Maldonado, realizado en el Hospital Universitario de La Samaritana, se evaluaron los costos directos y los aspectos clínicos de las efectos secundarios a medicamentos en pacientes hospitalizados en el servicio de medicina interna; arrojó

resultados que incluyeron la detección de “268 reacciones adversas en 208 de los 836 pacientes que ingresaron al servicio (proporción de incidencia de 25,1% y razón de presencia de 0,32). El 74,3% de los EAM se clasificó como probable, dentro de (sic.) las cuales el 92,5% fue tipo A. El 81,3% correspondió a reacciones moderadas, encontrándose que el sistema más frecuentemente afectado fue el hematológico 33,9% y que los medicamentos que actúan en sangre fueron los más frecuentemente relacionados 37,6%” (8).

Dada la frecuencia del uso en el Hospital Universitario de La Samaritana, el perfil de seguridad y el comportamiento creciente del reporte de efectos secundarios, tanto en el ámbito institucional como en el nacional (Vacca C, Ocampo M. Avances del programa de farmacovigilancia en el HUS. Póster presentado en el III Encuentro Internacional de Farmacovigilancia; septiembre de 2006; Bogotá, D.C.) (9), para los fármacos descritos, se presentó la propuesta del estudio de seguimiento activo de los efectos secundarios asociados a los medicamentos tramadol y dipirona con un análisis de los costos directos desde la perspectiva del pagador, con el fin de establecer incidencias de efectos secundarios, detección de señales de seguridad y plantear estrategias de prevención y manejo en pro de los pacientes y de un uso adecuado de los medicamentos (10), mediante la búsqueda activa en dos fases de investigación de seis meses cada una y la recolección de datos de un año.

Materiales y métodos

Se realizó una búsqueda activa combinada con reporte voluntario de casos de los efectos secundarios asociados a los medicamentos dipirona y tramadol en sus presentaciones inyectables. Para este fin, se revisaron diariamente todas las historias clínicas de los pacientes a los que fueron prescritos dichos fármacos con seguimiento médico de cada caso, durante el período comprendido entre el 1º de marzo de 2007 y el 15 de septiembre de 2007; se trató de un estudio descriptivo, observacional con seguimiento de casos.

Se incluyeron pacientes sin restricciones de edad o sexo que fueron hospitalizados en los servicios de medicina interna, ortopedia y cirugía general del Hospital Universitario de La Samaritana, por ser los de mayor volumen de prescripción de dipirona y tramadol; también se incluyeron aquellos pacientes que ingresaron por sospecha de efectos secundarios relacionados con estos dos medicamentos.

Para el diseño del estudio no se tuvo en cuenta ningún criterio de exclusión. No se realizó un cálculo de muestra, ya que se incluyó la totalidad de los pacientes del hospital a quienes se prescribieron dichos medicamentos. El periodo elegido (1º de marzo a 15 de septiembre de 2007) corresponde al primer periodo de recolección de datos de seis meses de la primera fase del estudio, debido a que se programó una segunda fase de toma de datos por seis meses más, para completar un año de farmacovigilancia intensiva dirigida a los fármacos ya descritos, de acuerdo con el diseño planteado inicialmente.

La identificación de los pacientes con prescripción de los fármacos en estudio, se realizó mediante la consulta prediseñada por los departamentos de Informática y Farmacia del hospital. Una vez identificados los pacientes, la información se recolectó en el Formato de Reacciones Adversas a Medicamentos (FORAM) del Instituto Nacional de Vigilancia Médica y Alimentos (INVIMA) y se digitó en una hoja electrónica de Microsoft Excel® para su procesamiento.

Para las variables cuantitativas continuas, se calcularon el promedio y la desviación estándar, y para las variables cualitativas, se estableció la proporción expresada como porcentaje. La relación causal se estableció mediante el algoritmo y las categorías de causalidad de la Organización Mundial de la Salud (OMS). El registro de los efectos secundarios se realizó utilizando el diccionario WHOART (*World Health Organization Adverse Reaction Terminology*). El equipo de investigación reportó las sospechas de efectos secundarios a los medicamentos.

Análisis de datos

El análisis de datos se realizó con base en los resultados obtenidos en la primera fase

del estudio, que corresponde a seis meses de recolección activa.

Los datos recopilados se analizaron para:

describir y estimar la frecuencia de efectos secundarios a medicamentos, entendidos como cualquier situación médica desfavorable experimentada por un paciente en tratamiento con dipirona y tramadol, sin que necesariamente exista una relación de causalidad con el medicamento e incluyendo la falla terapéutica (falta de respuesta o beneficio clínico para el cual se administró el medicamento), asociados a su uso en el Hospital Universitario de La Samaritana (III nivel) en un periodo de un año;

caracterizar sociodemográficamente la población que presentó efectos secundarios asociados al uso de tramadol y dipirona, identificar las indicaciones para las cuales fueron prescritos, así como las alteraciones asociadas a la utilización de los mismos;

identificar los esquemas terapéuticos asociados a los fármacos sometidos a vigilancia activa, clasificar la causalidad y seriedad de los efectos secundarios detectados, generar alertas sobre los efectos secundarios serios a la dipirona y al tramadol, con el fin de proveer información para la orientación de decisiones y posibles estrategias de prevención, y realizar una estimación de los costos directos de los efectos secundarios (desde la perspectiva del pagador) detectados como prevenibles con los medicamentos del estudio.

El tipo de efectos secundarios en los que se determinó como definitiva su relación de causalidad con el algoritmo de la OMS, se distribuyeron según la clasificación de Rawlins y Thopson en: A: incrementada (*augmented*); B: rara (*bizarre*), y E: terminal (*end*) (11).

El diagnóstico principal de los casos se definió según la CIE-10. El criterio de seriedad se clasificó de acuerdo con las guías ICH-E2A, como cualquier situación médica desfavorable en la que el fármaco a cualquier dosis, causara la muerte, hubiese puesto en riesgo la vida del paciente, incapacitara o inhabilitara permanentemente, hubiese requerido o prolongado la

hospitalización del paciente, hubiese conducido a anomalías congénitas y cualquier efecto médicamente significativo.

Aspectos éticos

Teniendo en cuenta las disposiciones consignadas en las "Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud", según la Resolución N° 8430 de 1993, este proyecto se clasificó en la categoría de investigación sin riesgo, puesto que "los métodos y estrategias propuestas no involucran intervención o modificación intencionada de variables biológicas, fisiológicas o sociales de los individuos bajo estudio o la identificación de aspectos sensitivos de su conducta" (Título II, Capítulo I, Artículo 11), por lo cual se obvió la obtención del consentimiento informado.

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Investigaciones de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia y el Comité de Investigaciones del Hospital Universitario de La Samaritana.

Resultados

Durante el período de vigilancia activa, se realizó seguimiento a las historias clínicas de 2.547 pacientes a quienes se prescribieron los medicamentos del estudio en los servicios de medicina interna, ortopedia y cirugía general.

Con un promedio de edad de $58,9 \pm 0,67$ años, la media de los pacientes con efectos secundarios a la dipirona fue de $46,4 \pm 21,8$ años y de $51,5 \pm 18,8$ años para el tramadol, con 25,35% de los pacientes con edades mayores de 65 años.

Se detectaron 213 efectos secundarios a los medicamentos del estudio, en 171 pacientes de los 2.547 evaluados, con una proporción de incidencia (cociente entre número de pacientes con efectos secundarios y total de pacientes ingresados) de 8,4%. Los efectos secundarios a los medicamentos del estudio se presentaron en 95 hombres (55,5%) y 76 mujeres (44,4%).

A los pacientes que presentaron efectos secundarios por la dipirona, se les administró en promedio 7 ± 2 medicamentos (rango, 3 a 13), y se encontraron 21/87 pacientes, es decir,

24,1%, con tratamientos que incluían ocho o más medicamentos; por otra parte, a los pacientes que presentaron efectos secundarios al tramadol se les administró en promedio 7 ± 3 medicamentos (rango, 2 a 14), y se encontraron 39/84 pacientes, es decir, 46,4%, con tratamientos que incluían ocho o más medicamentos. La estancia hospitalaria para pacientes con efectos secundarios a la dipirona fue de $12,44 \pm 9,07$ días y de $9,28 \pm 7,32$ para el tramadol, y el promedio de días de estancia hospitalaria adicional para pacientes con efectos secundarios a la dipirona fue, en promedio, de 1,95 días con un rango entre 1 a 5 días y de 2,25 días con un rango entre 1 a 7 días para el tramadol.

La dipirona se prescribió principalmente como analgésico (96%) y sólo en 4% de los casos como antipirético, con diferentes esquemas terapéuticos resumidos en el cuadro 1.

Cabe resaltar que la dosis máxima recomendada para la dipirona es de 4 g al día, por vía intramuscular o intravenosa, por los periodos más cortos posibles (no más de una semana consecutiva) (12). Por otra parte, el tramadol se prescribió como analgésico en el 100% de los pacientes, utilizando los esquemas terapéuticos resumidos en el cuadro 2. De igual forma, en la información básica de prescripción para el medicamento se aclara que la dosis máxima recomendada de tramadol para pacientes adultos, mayores de 14 años, es de hasta 400 mg al día (12).

Los efectos secundarios a la dipirona y al tramadol comprendieron 51 manifestaciones diferentes,

Cuadro 1. Esquemas terapéuticos utilizados en los pacientes que presentaron efectos secundarios a quienes se prescribió dipirona.

Esquema terapéutico utilizado	Frecuencia	Porcentaje
5 g cada 8 horas, IV	1	1,35
2,5 g cada 6 horas, IV	51	68,90
2,5 g cada 8 horas, IV	16	21,62
2,0 g cada 6 horas, IV	1	1,35
1,0 g cada 8 horas, IV	1	1,35
1,0 g cada 6 horas, IV	4	5,40

IV: intravenoso

de las cuales, la más frecuente para la dipirona fue la falla terapéutica (21,59%), entendida como la ausencia del efecto terapéutico deseado por el médico tratante; las demás se presentan en el cuadro 3. Durante la observación hecha en este estudio, no se encontraron reportes de agranulocitosis asociados a la dipirona y los casos de compromiso hematológico, que alcanzaron una incidencia de 15,9%, correspondieron a seis casos de leucopenia (83,3% evaluados como posible) y cinco de anemia (80% evaluados como improbable), de acuerdo con el algoritmo de causalidad de la OMS.

No se encontró ningún caso de agranulocitosis con dipirona en este estudio, lo cual puede explicarse por varios factores, entre los que se incluyen un diseño experimental que no permite la detección de casos de este tipo, el uso distinto de dipirona entre países o la susceptibilidad

Cuadro 2. Esquemas terapéuticos utilizados en los pacientes que presentaron efectos secundarios a quienes se prescribió tramadol.

Esquema terapéutico utilizado	Frecuencia	Porcentaje
17 mg por hora, infusión	2	2,06
100 mg cada 8 horas, IV	7	7,21
50 mg cada 6 horas, IV	2	2,06
50 mg cada 8 horas, IV	73	75,20
50 mg cada 12 horas, IV	8	8,24
25 mg cada 6 horas, IV	2	2,06
25 mg cada 8 horas, IV	4	4,12

IV: intravenoso

Cuadro 3. Efectos secundarios más frecuentes en los pacientes a quienes se prescribió dipirona.

Efectos secundarios a dipirona	Frecuencia	Porcentaje	Incidencia por 100 pacientes/año	Porcentaje global reportado (15)
Falla terapéutica	19	21,59	0,029	ND
Vómito/náuseas	13	14,77	0,016	16 (25)
Erupción cutánea	7	7,95	0,025	<0,01->0,001
Prurito generalizado	6	6,82	0,0075	<0,01->0,001
Leucopenia	6	6,82	0,0075	<0,01->0,001
Anemia	5	5,68	0,0064	<0,01->0,001 (16)
Taquicardia	5	5,68	0,0064	ND
Disnea	4	4,55	0,0051	ND
Estreñimiento	2	2,27	0,0025	<1
Trombocitopenia	2	2,27	0,0025	<0,01
Total, 10 primeras causas		78,41		

genética de ciertos grupos de población a desarrollar agranulocitosis.

Para el tramadol, el estreñimiento fue el efecto secundario más frecuente (23,02%) y hubo dos casos de íleo adinámico que correspondieron a 1,59% de los efectos encontrados, con una incidencia de 0,037 por 100 pacientes al año (cuadro 4).

Al aplicar el algoritmo de la OMS para determinar la probabilidad de causalidad, la proporción de efectos secundarios a dipirona se clasificó como: posible (53,4%), improbable (30,68%), definitiva (9,09%), probable (3,4%) y no clasificada (3,4%). En cuanto al tramadol, la proporción de efectos secundarios se clasificó como: posible (46,82%), definitiva (30,15%), probable (12,69%) e improbable (10,31%).

De acuerdo con la clasificación de seriedad, la mayoría de los efectos secundarios a dipirona se clasificaron como no serios (93,18%) y los otros como serios (6,81%), mientras que, para el tramadol, fueron de 92,06% y 7,93%, respectivamente.

El principal sistema comprometido por los efectos secundarios a la dipirona y al tramadol fue el gastrointestinal, principalmente, náuseas, vómito y estreñimiento (cuadros 5 y 6). Las principales 10 categorías diagnósticas de los pacientes con efectos secundarios a la dipirona y al tramadol, se presentan en los cuadros 7 y 8.

De los efectos secundarios a la dipirona, 43 (48,86%) generaron costos por diferentes conceptos, discriminados de la siguiente forma: a) 28 de 88 (31,8%) requirieron medicamentos como parte del tratamiento de los efectos secundarios; el costo por concepto de medicamentos utilizados por esta causa fue de US\$ 1.398,59; b) 16 de 88 (18,18%) requirieron realización de exámenes paraclínicos adicionales, el costo por este concepto fue de US\$ 352,54 (tarifa SOAT); c) 6 del total de efectos secundarios detectados (6,8%) requirieron la realización de diferentes procedimientos cuyo costo fue de US\$ 193,43 (tarifa SOAT); d) en 10 de los efectos secundarios (11,36%) se solicitaron consultas a otros servicios, cuyo costo fue de US\$ 151,68 (tarifa SOAT); ninguno de los efectos secundarios detectados requirió traslado del paciente a la unidad de cuidados intensivos o intermedio, y e)

el costo por estancia hospitalaria adicional fue de US\$ 6.639,48 (tarifa SOAT).

Por otra parte, de los efectos secundarios al tramadol, 55 (43,65%) generaron igualmente costos por diferentes conceptos, discriminados de la siguiente forma: a) 44 de 126 (34,9%) requirieron medicamentos como parte del tratamiento de los efectos secundarios; el costo por este concepto fue de US\$ 313,27; b) 6 de 126 (4,76%) requirieron realización de exámenes paraclínicos adicionales; el costo por este concepto fue de US\$ 118,74 (tarifa SOAT); c) 4 del total de efectos secundarios a medicamentos detectados (3,17%) requirieron la realización de diferentes procedimientos cuyo costo fue de US\$ 42,02 (tarifa SOAT); d) en 13 de los efectos secundarios (10,31%) se solicitaron consultas a otros servicios, cuyo costo fue de US\$ 197,61 (tarifa SOAT).

Cuadro 4. Efectos secundarios más frecuentes en los pacientes a quienes se prescribió tramadol.

Efectos secundarios a tramadol	Frecuencia	Porcentaje	Incidencia por 100 pacientes/año	Porcentaje global reportado (12)
Estreñimiento	29	23,02	0,054	<1
Vómito/náuseas	19	15,08	0,035	6,1
Falla terapéutica	12	9,52	0,022	ND
Somnolencia	10	7,94	0,018	2,4
Taquicardia	7	5,56	0,013	<1
Vértigo/mareo	6	4,76	0,011	4,6
Hipotensión	3	2,38	0,0056	<1
Epigastralgia	3	2,38	0,0056	<1
Dificultad respiratoria	3	2,38	0,0056	<0,1
Íleo adinámico	2	1,59	0,0037	<0,1
Total, 10 primeras causas		74,61		

Cuadro 5. Compromisos más frecuentes en los pacientes a quienes se les prescribió dipirona.

Compromiso	Frecuencia	Porcentaje
Gastrointestinal	20	27,0
Piel	20	22,7
Falla terapéutica	19	21,6
Hematológico	14	15,9
Cardiovascular	5	5,7
Respiratorio	4	4,5
Hidroelectrolítico	3	3,4
Sistema nervioso central y sistema nervioso periférico	3	3,4
Total efectos secundarios	88	100,0

Cuadro 6. Compromisos más frecuentes en los pacientes a quienes se les prescribió tramadol.

Compromiso	Frecuencia	Porcentaje
Gastrointestinal	54	42,9
Sistema nervioso central y sistema nervioso periférico	24	19,0
Falla terapéutica	22	17,5
Cardiovascular	11	8,7
Piel	7	5,6
Hematológico	3	2,4
Hidroelectrolítico	3	2,4
Respiratorio	2	1,6
Total efectos secundarios	126	100,0

Ninguno de los efectos secundarios detectados requirió traslado del paciente a la unidad de cuidados intensivos o intermedios, y e) el costo por estancia hospitalaria adicional fue de US\$ 4.939,13 (tarifa SOAT).

Cuadro 7. Categorías diagnósticas de los pacientes que presentaron efectos secundarios a quienes se prescribió dipirona.

Categoría diagnóstica	Frecuencia	Porcentaje
Politraumatismo con fractura o sin ella	22	22,60
Posoperatorio de cirugía de abdomen	16	16,49
Enfermedad arterial oclusiva	8	8,24
Neoplasia de tejidos blandos	7	7,21
Posoperatorio de cirugía de tórax	5	5,15
Enfermedad autoinmune -lupus eritematoso sistémico	4	4,12
Neumonía bacteriana no especificada	4	4,12
Insuficiencia renal crónica	3	3,09
Neoplasias de tejidos duros	3	3,09
Trombosis venosa no especificada	2	2,06
Total, 10 primeras causas		76,17

Cuadro 8. Categorías diagnósticas de los pacientes que presentaron efectos secundarios a quienes se prescribió tramadol.

Categoría diagnóstica	Frecuencia	Porcentaje
Fractura simple o compleja	14	18,90
Posoperatorio de cirugía de abdomen	11	14,86
Politraumatismo con fractura o sin ella	7	9,45
Enfermedad arterial oclusiva	5	6,75
Neoplasia de tejidos blandos	5	6,75
Infección de tejidos blandos	5	6,75
Dolor abdominal	4	5,40
Insuficiencia renal crónica	3	4,05
Posoperatorio de cirugía de extremidades	3	4,05
Neumonía bacteriana no especificada	2	2,70
Total, 10 primeras causas		79,66

Cuadro 9. Distribución de costos de efectos secundarios de acuerdo con su origen (US\$).

Origen	Estancia hospitalaria	Medicamentos	Exámenes paraclínicos	Interconsultas	Procedimientos	Total
Dipirona	6.639,48	1398,6	352,54	151,68	193,42	8.735,73
Tramadol	4.939,13	313,28	118,74	197,61	42,02	5.610,79
Total	11.578,61	1711,88	471,28	349,29	235,44	14.346,53
Porcentaje	80,71	11,93	3,29	2,43	1,64	100

En resumen (cuadro 9), el costo total directo por la atención de los efectos secundarios a la dipirona y al tramadol fue de \$ 26´048,281 o US\$ 14.347 a una tasa de cambio de Col\$ 1.815,65 por dólar (13). Para la dipirona, el más costoso fue un caso de leucopenia y, para el tramadol, fue un caso de síndrome de Stevens-Johnson.

Si se acepta un porcentaje de efectos secundarios prevenibles de 70%, el monto ahorrado para el pagador sería de \$ 18'233.797 o US\$ 10.042,57.

Discusión

Desde el punto de vista de distribución por sexo, no se encuentra diferencia de proporciones entre el masculino y el femenino para la presentación de efectos secundarios. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estas distribuciones corresponden a datos crudos que deben compararse con los datos de distribución por sexo de la población usuaria del hospital en general, para definir si existe selección particular de los grupos por sexo, lo cual aplica para los datos del promedio global de edad.

Los adultos mayores presentan un riesgo especial de desarrollar efectos secundarios a los medicamentos. La frecuencia de efectos secundarios entre los ancianos es de 2 a 7 veces mayor que en la población menor de 60 años (14); esto es debido en parte al hecho de que los adultos mayores consumen más fármacos, y durante períodos más prolongados, que los más jóvenes (14,17,18). A esto se añade que los adultos mayores son más sensibles a los efectos perjudiciales de ciertos fármacos, como consecuencia de las alteraciones farmacodinámicas y farmacocinéticas, y a la disminución de la capacidad de reserva fisiológica y a la reducción de los mecanismos

homeostáticos corporales. Aunque el conocimiento clínico apoya la existencia de un mayor riesgo de aparición de reacciones adversas asociadas a la edad avanzada, parece que existe una gran variabilidad interindividual en el proceso de envejecimiento –incluyendo la naturaleza no uniforme de los cambios farmacocinéticos y farmacodinámicos en los sujetos de edad avanzada– lo cual indica que la realidad puede ser bastante más compleja. De manera que las características específicas del paciente (fisiológicas y funcionales) son probablemente más importantes que cualquier medida cronológica a la hora de predecir tanto los efectos secundarios, como los beneficios, de cualquier tratamiento farmacológico (14,19,20).

No se encontró ningún caso de agranulocitosis durante la búsqueda en la primera parte de este estudio, lo cual puede explicarse por varios factores, entre los que se incluye un diseño que no permite la detección de casos de este tipo por falta de potencia del estudio para detectarla, dada su baja incidencia, calculada en 1,2 casos de agranulocitosis por un millón de personas expuestas a la dipirona hasta por una semana (4), los hábitos de prescripción diferentes de dipirona entre países, la susceptibilidad genética de ciertos grupos de población a desarrollar agranulocitosis o por otras hipótesis ya planteadas que explican que ni la dipirona ni su metabolito activo 4-metil-amino-antipirina afectan el proceso de diferenciación de los granulocitos ni inducen apoptosis de los granulocitos ya diferenciados, sino que la agranulocitosis tiene un origen inmunoalérgico (21)

La falla terapéutica fue el efecto secundario más frecuente para la dipirona en este estudio, con una incidencia de 0,029 por 100 pacientes al año. Es importante mencionar que a los pacientes a quienes se prescribió como analgésico, fue con el fin de tratar enfermedades que generan dolor de intensidad moderada y grave, y que correspondieron a 60% de los pacientes medicados (cuadro 7), para cuya seriedad se debe reevaluar el uso de un antiinflamatorio esteroideo, como la dipirona.

Es de destacar que el número de medicamentos concomitantes es un factor fuertemente relacio-

nado con el desarrollo de efectos secundarios a los medicamentos (22-24). En este estudio, el promedio de medicamentos administrados a cada paciente fue de siete, con un porcentaje mayor a 24% en el caso de la dipirona y de 46% en el caso del tramadol para más de ocho medicamentos por paciente.

Para medicamentos como la dipirona y el tramadol, cuya principal vía de biotransformación es a través del sistema microsómico hepático (citocromo P450), el efecto de las interacciones medicamentosas aumenta significativamente, y el uso de medicamentos concomitantes es un factor esencial sobre la presentación o ausencia de efectos secundarios. Lugian *et al.* mencionan como factores de riesgo para la presencia de efectos secundarios a medicamentos en los pacientes hospitalizados, la edad y la complejidad de las enfermedades concomitantes, porque el cuidado de estos pacientes requiere mayor intervención (25).

Cabe resaltar que la dosis máxima recomendada para pacientes en quienes se prescribe dipirona es excedida en 94,6% de los pacientes del Hospital Universitario de La Samaritana, aunque la incidencia de efectos secundarios a la dipirona observados en los servicios de medicina interna, ortopedia y cirugía general no llevaron a hallazgos de seguridad adicionales a los ya descritos para el producto. Sin embargo, se debe hacer especial énfasis en que está siendo adecuadamente utilizado sólo en 5,4% de las prescripciones evaluadas. De este grupo, los cuatro pacientes que desarrollaron efectos secundarios fueron evaluados como no serios y correspondieron a tres efectos por compromiso dermatológico (erupción cutánea y prurito) y una epigastralgia. Todos los pacientes que presentaron efectos secundarios evaluados como serios tenían prescripción de dipirona a dosis de 2,5 g intravenosos cada 6 horas (dosis diaria total de 10 g). Por lo anterior, es importante generar alertas en el Hospital Universitario de La Samaritana con respecto a las sobredosis utilizadas del medicamento, con el fin de crear planes de control y sensibilización del uso adecuado de dipirona.

En cuanto a las dosis utilizadas para tramadol, se puede concluir que es un medicamento adecuadamente utilizado en los servicios de medicina interna, ortopedia y cirugía general, sin que se encontraran dosis por encima de las recomendadas en los pacientes medicados. Es de esperar que la mayor proporción de efectos secundarios se presente en los pacientes a los que se suministra el medicamento en dosis de 50 mg intravenosos cada 8 horas, dado que es el esquema más ampliamente utilizado en los servicios evaluados.

La mayoría de efectos secundarios se clasificaron como posibles (53,4% para la dipirona y 47% para el tramadol) de acuerdo con el algoritmo de causalidad de la OMS y, como no serios, según el criterio de seriedad; estos hallazgos se obtuvieron de la aplicación del algoritmo a cada caso por dos evaluadores independientes y de acuerdo con el criterio médico de los mismos. Los efectos secundarios definitivos desde el punto de vista de causalidad, se clasificaron como tipo B (100%), para la dipirona (correspondiente a los casos de falla terapéutica) y como A (52,6%) y (47,3%) fue de tipo B para el tramadol predominio, lo cual indica que la gran mayoría son predecibles.

El mayor porcentaje de los costos generados fueron causados por el incremento de la estancia hospitalaria de los pacientes que presentaron efectos secundarios a los medicamentos, que en total acumularon 170 días; también, se debe tener en cuenta que mediante este estudio se calcularon los costos directos relacionados directamente con los servicios sanitarios, entre los que se incluyen los costos de medicamentos, el cuidado sanitario, las pruebas diagnósticas, las consultas y la hospitalización. No se tuvieron en cuenta otros como costos por trabajo de personal de enfermería, camilleros y costos directos no sanitarios, entre los que se incluyen los servicios sociales.

Las limitaciones que se presentaron en esta investigación fueron:

es posible que la población del hospital donde se realizó el estudio presente diferencias con

respecto a la de otras instituciones, a pesar de que éste es centro de referencia de la red de salud de Cundinamarca, de manera que la asimilación de los resultados a otros hospitales puede ser discutible;

se reconoce que la forma más rigurosa de determinar la estancia hospitalaria adicional es mediante la diferencia entre la estancia del paciente con efectos secundarios a medicamentos y la estancia de un grupo de pacientes control apareados por variables como edad, sexo, diagnóstico y gravedad;

el cálculo de los recursos ahorrados al evitar los efectos secundarios prevenibles usa proporciones publicadas en la literatura; no se utilizó un algoritmo para definir el carácter prevenible de dichos efectos detectados y, por ello, no se calculó una proporción de efectos secundarios prevenibles; habría que determinar si las proporciones empleadas se ajustan a las características propias de nuestro medio, y

esta investigación incluyó sólo los servicios de medicina interna, ortopedia y cirugía general, por ser donde se prescribe el mayor porcentaje de los medicamentos del estudio; por lo tanto, dadas las diferentes enfermedades y medicamentos empleados en estos servicios, los efectos pueden no reflejar su comportamiento global en la institución.

Los hallazgos de esta investigación confirman que los efectos secundarios a medicamentos generan un impacto clínico negativo implícito en la evolución de los pacientes, no evaluada objetivamente en este estudio, y aumentan en forma considerable los costos de la atención hospitalaria.

Los programas de farmacovigilancia dirigidos a determinar tendencias o señales que permitan modificar, por medio de campañas de prevención y educación, errores de medicación que estén influenciando el sistema negativamente, redundarían en la reducción de la estancia hospitalaria y la morbilidad de los pacientes, y resulta en ahorros considerables para la institución. El mayor ahorro logrado al evitar efectos secundarios a medicamentos,

prevenibles mediante un programa de esta naturaleza, se daría en términos monetarios y disponibilidad de camas. Además, mejoraría la calidad de la atención y el resultado clínico del paciente. Por otra parte, indudablemente se requiere una mayor integración con el proceso de desarrollo y estatutos dispuestos en los Comités de Farmacia y Terapéutica institucional, teniendo en cuenta la alineación y el cumplimiento del Decreto 2200 de 2005, por el cual se reglamenta el servicio farmacéutico y se dictan otras disposiciones, y la Resolución 1403 de 2007, por la cual se determina el Modelo de Gestión del Servicio Farmacéutico, se adopta el Manual de Condiciones Esenciales y Procedimientos y se dictan otras disposiciones, y por medio del cual se deben fortalecer estos programas de farmacovigilancia.

En conclusión:

1. El estudio adelantado constituye una iniciativa de investigación conjunta entre la Universidad Nacional de Colombia y el Hospital Universitario de La Samaritana, que ha permitido a la fecha el seguimiento de 27.099 exposiciones a los fármacos en estudio y la detección de 214 efectos secundarios, la mayoría de los cuales se presentaron en pacientes de sexo masculino (54,3%) y edades promedio de $49,2 \pm 20,3$ años (media para la dipirona de $46,4 \pm 21,8$ y de $51,5 \pm 18,8$ para el tramadol).
2. La mayoría de los efectos secundarios ($\geq 90\%$) se clasificaron como no serios y posibles (dipirona, 53,4%, y tramadol, 46,82%).
3. El principal sistema comprometido por efectos secundarios a la dipirona y al tramadol fue el gastrointestinal, principalmente, náuseas, vómito y estreñimiento.
4. Aunque del total de efectos secundarios reportados ninguno fue realizado por los médicos tratantes, se destaca la oportunidad de la vigilancia activa en la detección de problemas asociados con el uso, en este caso de la dipirona, la cual fue prescrita como analgésico (96%) y como antipirético (4%), en dosis de 2,5 g intravenosos cada 6 horas en el 68,9% de los casos, dosis más de tres veces superior a la dosis diaria definida (3 g).
5. Dado que los pacientes que presentaron efectos secundarios con la dipirona recibieron concomitantemente, en promedio, 7 ± 2 medicamentos (rango 3 a 13) y que los pacientes que presentaron efectos secundarios con el tramadol, 7 ± 3 medicamentos (rango 2 a 14), se incrementa la probabilidad de experimentar una interacción medicamentosa de cualquier tipo.
6. Llama la atención que el efecto secundario más frecuente para la dipirona fuera la falla terapéutica (21,59%). Es de destacar que no se detectaron casos de agranulocitosis; los efectos hematológicos (15,9%) detectados correspondieron a 6 casos de leucopenia y a 5 de anemia.
7. Los efectos asociados al tramadol hacen parte del perfil de seguridad establecido para el fármaco, aunque con mayores incidencias a las reportadas. Por ejemplo, el efecto secundario más frecuente fue el estreñimiento (23,02%), con una incidencia de 54 por 100.000 pacientes año; el íleo adinámico, la taquicardia y la dificultad respiratoria se presentaron con incidencias de 3,7, 13 y 5,6 por 100.000 pacientes año, respectivamente.
8. El costo total directo por la atención de los efectos secundarios a la dipirona y al tramadol en el hospital, durante el tiempo de estudio (6 meses), fue de \$ 26'048.281 o US\$ 14.346,53. Si se acepta un porcentaje de efectos secundarios prevenibles de 70%, el monto ahorrado para el pagador sería de \$ 18'233.797 o US\$ 10.042,57.
9. Vale la pena resaltar que no se encontró ningún caso de agranulocitosis durante la búsqueda en la primera parte de este estudio. Como se había explicado anteriormente, la agranulocitosis es un evento raro cuya incidencia en Europa es de hasta 1 de cada 3.000 pacientes expuestos y, en Latinoamérica, de 1,2 casos de agranulocitosis por un millón de personas

expuestas a la dipirona hasta por una semana (10). En este caso hay un seguimiento activo con más de 1.390 exposiciones a dipirona sin que se reportara este efecto secundario; por lo anterior, es de notar que, a pesar de las sobredosis utilizadas del medicamento, que seguramente debe alertar a las autoridades sanitarias de la institución para crear planes de control y sensibilización de su uso adecuado..

10. A pesar de las sobredosis utilizadas de dipirona, este medicamento constituye un fármaco eficaz para el tratamiento sintomático del dolor y de la fiebre con un perfil riesgo/beneficio favorable.
11. Se debe fortalecer la implementación y puesta en marcha de programas institucionales de farmacovigilancia liderados por los comités de farmacia y terapéutica y que, alineados con la actual reglamentación vigente, permitan fortalecer la red nacional de farmacovigilancia e impactar en resultados positivos de uso adecuado de medicamentos (teniendo en cuenta las dosis diarias definidas y plasmándolas en los protocolos de manejo clínico) y prevenir los efectos secundarios en las instituciones prestadoras de servicios de salud. El presente es un estudio piloto que puede ser replicado en otras instituciones de salud.

Conflicto de intereses

El autor y coautores del presente artículo declaramos que no tenemos conflictos de interés de orden académico, institucional u operacional en el momento de la realización de la investigación.

Financiación

Esta investigación fue realizada por los autores con el apoyo o tutoría de los profesores de la Universidad Nacional de Colombia, como parte de los requisitos para optar al título de Master en Ciencias-Farmacología. Como tal, la presente investigación contó con financiación por fuente específica del Programa de Investigación del Hospital Universitario de La Samaritana y de la Universidad Nacional de Colombia.

Referencias

1. **Hamerschlak N, Cavalcanti A.** Neutropenia, agranulocytosis and dipyrone. Sao Paulo Med J. 2005;123:247-9.
2. **Schönhöfer P, Offerhaus L, Herxheimer A.** Dipyrone and agranulocytosis: what is the risk? Lancet. 2003; 361:968-9.
3. **Plager M.** Las preguntas más frecuentes acerca de Novalgina®. Sanofi-Aventis. Fecha de consulta: 5 de noviembre de 2006. Disponible en: <http://en.sanofi-aventis.com/publications/publications.asp>
4. **Edwards JE, McQuay HJ.** Dipyrone and agranulocytosis: what is the risk? Lancet. 2002;360:1438.
5. **Sollero L.** Incidence of agranulocytosis and the use of dipyrone in Brazil. Rev Bras Pesquisas Med Biol. 1976;9:79-86.
6. **Hamerschlak N, Maluf E, Pasquini R, Eluf-Neto J, Moreira FR, Cavalcanti AB, et al.** Incidence of aplastic anemia and agranulocytosis in Latin America: the LATIN study. Sao Paulo Med J. 2005;123:101-4.
7. **Grond S, Sablotzki A.** Clinical pharmacology of tramadol. Clin Pharmacokinet. 2004;43:879-923.
8. **Tribiño G, Maldonado C, Segura O, Díaz J.** Costos directos y aspectos clínicos de las reacciones adversas a medicamentos en pacientes hospitalizados en el servicio de medicina interna de una institución de tercer nivel de Bogotá. Biomédica. 2006;26:31-41.
9. **Grupo de Farmacovigilancia INVIMA/UN.** Boletín de Farmacovigilancia. No. 11. Fecha de consulta: 28 de septiembre 28 de 2006. Disponible en http://web.invima.gov.co/Invima//farmacovigilancia/docs_boletines/BOLETIN%2011.pdf
10. **Segura O, Maldonado C.** Las reacciones adversas a medicamentos: una aproximación desde el punto de vista económico. Biomédica. 2003;23:401-7.
11. **Hunziker T, Bruppacher R, Kuenzi U, Maibach R, Braunschweig S, Halter F, et al.** Classification of ADRs: a proposal for harmonization and differentiation based on the experience of the Comprehensive Hospital Drug Monitoring Bern/St. Gallen, 1974-1993. Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2002;11:159-63.
12. **Londoño A.** PR Vademecum 2008. 7ª edición. Bogotá: Licitelco S.A.; 2007.
13. **Dólar HOY.** Cotización del dólar en Colombia. Fecha de consulta: 24 de marzo de 2008. Disponible en: <http://www.wilkinsonpc.com.co/free/dolar-hoy.html>.
14. **Pucino F, Beck CL, Seifert RL, Strommen GL, Sheldon PA, Silbergleit IL.** Pharmacogeriatrics. Pharmacotherapy. 1985;5:314-26
15. **Dennis R, Gutiérrez JM, Rodríguez MN.** Creación de un programa piloto de farmacovigilancia en el Hospital

- Universitario San Ignacio. Acta Médica Colombiana. 1998;23:15-22.
16. **Katzung BG, Bertram G.** Farmacología básica y clínica. 10ª edición. East Norwalk: Mc Graw Hill/Appleton & Lange; 1996.
 17. **Cadieux RJ.** Drug interactions in the elderly. How multiple drug use increases risk exponentially. Postgrad Med. 1989;86:179-86.
 18. **Schneider JK, Mion LC, Frengley JD.** Adverse drug reactions in an elderly outpatient population. Am J Hosp Pharm. 1992;49:90-6.
 19. **Carty MA, Everitt DE.** Basic principles of prescribing for geriatric outpatients. Geriatrics. 1989;44:85-98.
 20. **Carnevali DL, Patrick M.** Nursing management for the elderly. 2ª edición. Philadelphia: JB Lippincott Co; 1986.
 21. **García-Martínez JM, Fresno JA, Lastres P, Bernabéu C, Betés PO, Martín-Pérez J.** Effect of metamizol on promyelocytic and terminally differentiated granulocytic cells. Comparative analysis with acetylsalicylic acid and diclofenac. Biochem Pharmacol. 2003;65:209-17.
 22. **Laporte JR, Capella D.** Métodos aplicados en estudios descriptivos de utilización de medicamentos. En: Laporte JR, Tognoni G, editores. Principios de epidemiología del medicamento. 2ª edición. Barcelona: Ediciones Técnicas y Científicas S.A; 1993. p. 68-9.
 23. **Carbonin P, Pahor M, Bernabei R, Sgadari A.** Is age an independent risk factor of adverse drug reactions in hospitalized medical patients? J Am Geriatr Soc. 1991;39:1093-9.
 24. **Nolan L, O'Malley K.** Prescribing for the elderly. Part I: Sensitivity of the elderly to adverse drug reactions. J Am Geriatr Soc. 1988;36:142-9.
 25. **Leape LL, Brennan TA, Laird N, Lawthers AG, Localio AR, Barnes BA, et al.** The nature of adverse events in hospitalized patients. Results of the Harvard Medical Practice Study II. N Engl J Med. 1991;324:377-84.

ARTÍCULO ORIGINAL

Diferencias de sexo, edad y lípidos plasmáticos asociadas al polimorfismo de la apolipoproteína E en un grupo de escolares de Quindío, Colombia

Patricia Landázuri¹, Nelsy Loango^{1,2}, Martha Lucía Gallego¹, Beatriz Restrepo¹

¹ Grupo de Enfermedades Cardiovasculares y Metabólicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

² Programa de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

Introducción. El polimorfismo de la apolipoproteína E (apoE) es un factor determinante genético de los niveles de colesterol total y colesterol LDL.

Objetivo. Evaluar la relación del polimorfismo apoE con el perfil lipídico por edad y sexo en escolares quindianos de 8 a 18 años.

Materiales y métodos. Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa y enzimas de restricción para la genotipificación de apoE en 500 escolares de 8 a 18 años. Los lípidos sanguíneos se determinaron con estuches comerciales.

Resultados. La frecuencia alélica fue: E3 (91,6%), E2 (5,3%) y E4 (3,1%); y la frecuencia genotípica: E3/E3 (90,8%), E2/E3 (5,6%) y E3/E4 (3,2%). No se encontraron homocigotos para E2/E2 y E4/E4. Se encontraron distribución genotípica y alélica similares para cada sexo.

El genotipo apoE y el sexo tuvieron un efecto significativo sobre el colesterol total y el colesterol LDL. En niños, ambas variables se distribuyeron así: E4>E3>E2 ($p<0,05$); en niñas: E3>E4>E2; el colesterol LDL en niños fue: E2>E4>E3; y, en niñas: E4>E2>E3.

En niños, el alelo con efecto protector fue el E2, en todas las variables; mientras que, en las niñas, este alelo fue protector sólo para el colesterol total y colesterol LDL; para triacilglicéridos y colesterol VLDL y altos niveles de colesterol LDL, el efecto protector estuvo en el E4 ($p<0,05$).

Conclusión. Estos resultados sugieren una asociación entre el genotipo apoE y los lípidos plasmáticos de la población estudiada, influenciada por sexo y edad, especialmente, en niñas mayores de 10 años. Sin embargo, se necesita ampliar la población.

Palabras clave: polimorfismo genético, apolipoproteínas E, lípidos, colesterol, triglicéridos, polimorfismo, hormonas, niño, adolescente.

Gender, age and plasma lipids differences associated with apolipoprotein E polymorphism in school children

Introduction. Apolipoprotein E (apoE) polymorphism is a genetic determinant of total cholesterol and LDL-c levels. Several studies have examined the relationship between variations at the APO E and cardiovascular disease. It is important to determine this relationship in the Colombian population.

Objectives. The relationship of apoE polymorphisms was associated with lipid profile by age and sex.

Materials and methods. A sample of 500 children aged 8 to 18 years, were selected from school populations in Quindio Province, Colombia. ApoE genotypes were determined by polymerase chain reaction and restriction enzyme. Lipid profiles were obtained by commercial kits.

Results. The apoE allele frequencies were as follows: E3 - 91.6%, E2 - 5.3, and E4 - 3.1%. Genotypic frequencies were as follows: E3/E3 - 90.8%, E2/E3 - 5.6%, and E3/E4 - 3.2%. No homozygotes for E2/E2 and E4/E4 were recovered. Similar genotypic and allelic distribution was found for each gender. ApoE genotype and gender had a significant effect on total serum cholesterol (CT) and low density lipoprotein cholesterol (c-LDL). In boys these variables were related as follows: E4>E3>E2 ($p<0.05$); in girls the relationships were somewhat changed

(E3>E4>E2). High density lipoprotein cholesterol (c-HDL) levels in boys were related as follows: E2>E4>E3; for girls, E4>E2>E3. In boys, for all variables, the protector effect was in E2; but in girls this allele was only a protector for CT and c-LDL. For triacylglycerol (TAG), very low density lipoprotein cholesterol (c-VLDL) and c-HDL, this the protector effect was associated with the E4 allele, ($p<0.05$).

Conclusion. The results suggested that modulation of apoE genotype on plasma lipids was influenced by gender and age, especially in girls older than 10 years.

Key words: Polymorphism, genetic; apolipoproteins E, lipids, cholesterol, triglycerides, hormones, child, adolescent.

El polimorfismo de la apoE es un factor determinante genético de los niveles de colesterol total y colesterol en las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) en plasma y, por lo tanto, un factor determinante de las enfermedades cardiovasculares (1-3).

Se ha estimado que 14% de la variación plasmática del colesterol está determinada genéticamente por el polimorfismo de apoE (3), mediante la interacción de las isoformas con el receptor de las LDL, lo cual permite la depuración de estas lipoproteínas y, por lo tanto, la reducción del colesterol y los triglicéridos. Entre las mayores isoformas de la apoE, las cuales son designadas como apoE2, apoE3 y apoE4, la apoE3 es la más común en todas las poblaciones estudiadas, con una frecuencia en la población de 77% y se considera la forma normal de la proteína (3). Comparadas con la apoE3, la apoE2 está asociada con bajo colesterol total en plasma y, la apoE4, con altos niveles de colesterol total y c-LDL y, está última, con un aumento en la captación posprandial de las lipoproteínas, aumento de la absorción intestinal de colesterol, descenso en la síntesis de bilis y rápida depuración de las LDL del plasma (3,4).

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de mortalidad en el mundo y en Colombia (5,6). En este país, algunos estudios de población muestran la presencia de un alto porcentaje de dislipidemias y obesidad en niños (7-9). Dado que la apoE juega un importante

papel en el metabolismo de las lipoproteínas que la contienen (10), es importante estudiar de qué manera los polimorfismos en el gen de la apoproteína E pueden modificar la concentración de lípidos plasmáticos en los niños por sexo y edad. Por lo tanto, este estudio fue diseñado para evaluar la relación de los polimorfismos del gen de la apoE con el perfil lipídico en escolares del departamento del Quindío, Colombia, según edad y sexo, para identificar de manera temprana el riesgo cardiovascular en ellos, asociado a estas variables.

Materiales y métodos

Diseño del estudio

Es un estudio descriptivo de corte transversal, realizado en el año 2006, con una muestra representativa de la población escolar del departamento del Quindío, según edad, sexo, tipo de colegio y estrato socioeconómico, con un intervalo de confianza de 95% y un error de muestreo de 5%. La selección se estableció por conglomerados de colegios públicos y privados, y se realizó mediante un muestreo aleatorio simple. Los colegios participantes tenían autorización de sus rectores y, los escolares, el consentimiento informado de los padres o adultos responsables. Este trabajo fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad del Quindío.

Variables

La información demográfica básica se recolectó mediante una encuesta. Se obtuvieron 7 ml de sangre por punción venosa en tubos secos, después de 12 horas de ayuno. El suero se obtuvo por centrifugación a 2.500g por 15 minutos, a 4°C, después de una hora de la recolección de la sangre, fue separado en microtubos y

Correspondencia:

Patricia Landázuri, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Quindío, Avenida Bolívar 12 N, Armenia, Colombia.

Teléfono: (576) 746 0158; fax: (576) 746 0148.

plandazu@uniquindio.edu.co

Recibido: 04/08/08; aceptado:13/03/09

se almacenó a -20°C hasta su uso. El mismo día de la toma de la muestra sanguínea, se determinó el peso, la talla y se cuantificaron las fracciones lipídicas. El peso corporal se midió con una balanza electrónica y se registró en kilogramos con un decimal. La estatura se midió con tallímetro y se registró con dos decimales. Cada medida se evaluó y se registró dos veces. Con el peso y la talla, se calculó el índice de masa corporal (IMC) en kg/m^2 .

El colesterol total, los triacilglicéridos y el colesterol en las lipoproteínas de alta densidad (c-HDL), se midieron por métodos enzimáticos (estuche Sera-Pak plus, Bayer). Para quienes tenían los triglicéridos por debajo de 400 mg/dl, el c-LDL se calculó con la ecuación de Friedewald (11). El colesterol en la lipoproteínas de muy baja densidad (c-VLDL), se determinó así: $\text{VLDL}=\text{triacilglicéridos}/5$.

El control interno de calidad se efectuó con los sueros de la marca Human®. Se tomaron como valores de referencia de las fracciones lipídicas séricas por edad y sexo, los puntos de corte recomendados por *The National Cholesterol Education Program* (NCEP) (12). Se evaluó el índice de Castelli (colesterol total/c-HDL), el cual está diseñado para adultos, pero varios autores (7,13) lo han utilizado en niños como un buen índice de riesgo cardiovascular, aplicando los siguientes valores de riesgo de enfermedades cardiovasculares: en mujeres, $\geq 4,5$, y en varones, $\geq 5,2$ (14).

Polimorfismo de apoE

El ADN fue extraído de 5 ml sangre completa tomada con anticoagulante. Para ello, se usó un estuche comercial de extracción (Wizard Genomics, Promega). La calidad y cantidad del ADN extraído se visualizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

El polimorfismo del gen de apoE se determinó por la amplificación específica de los alelos, usando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR se realizó según el siguiente procedimiento: 200 a 500 ng de ADN genómico, tampón de PCR 1X, MgCl_2 1,5 mM, cebadores a 0,4 μM , dNTP 200 μM , dimetil sulfóxido (DMSO)

10% y Taq polimerasa 3 unidades internacionales (UI), para un volumen total 50 μl . Las condiciones de amplificación fueron por cada ciclo (35 ciclos) de: 95°C por 1 minuto, hibridación a 60°C por 50 segundos y una extensión a 70°C por 2 minutos. Las secuencias de los cebadores usados para la amplificación fueron 5'-TAAGCTTGGCACGCCTGTCCAAGGA-3', para el cebador con sentido, y 5'-ACAGAATTGCCCCGGCCTGGTACAC-3', para el cebador antisentido.

El producto amplificado fue de 144 pares de bases (pb). Posteriormente, se realizó una digestión de 25 μl del producto amplificado con 10 UI de la enzima de restricción HhaI, durante 3 horas a 37°C . Los fragmentos resultantes de la restricción se separaron mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 12% con un voltaje constante de 45 mA.

Los productos se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta, tras tinción del gel con bromuro de etidio durante 30 minutos. Las siguientes longitudes de banda definieron los genotipos: apoE 3/3, 91 y 48 pb; apoE 2/2, 83 pb; y apoE 4/4, 91 y 72 pb. Los genotipos heterocigotos se determinaron por las siguientes longitudes de bandas: apoE 3/2, 91,83 y 48 pb; apoE, 3/4 91,72 y 48 pb; y apoE 2/4, como 91,83 y 72 pb.

Análisis estadístico

Se constituyeron tres grupos de niños de acuerdo con su edad (8 a 10, 11 a 14 y de 15 a 18 años). Para cada grupo de edad y sexo, se calcularon los promedios de las fracciones del perfil lipídico. Se efectuaron comparaciones de medias por el test de Mann-Whitney, porque las variables lipídicas no presentaron distribución normal. Se establecieron las diferencias estadísticas entre las proporciones mediante la prueba de ji al cuadrado (χ^2). Para buscar diferencias por sexo, se utilizó la prueba t de Student para muestras con varianzas desiguales. Las frecuencias de los alelos y genotipos se estimaron por conteo directo de los mismos.

Se constituyeron tres grupos de niños de acuerdo con su genotipo: grupo apoE2, formado

por los niños portadores de los genotipos apoE 2/2+apoE 2/3; grupo apoE3, integrado por el genotipo apoE 3/3; y grupo apoE4, formado por los genotipos apoE 3/4+apoE 4/4. Se realizó la prueba de ji al cuadrado para verificar si las frecuencias observadas de los genotipos guardaban concordancia con las esperadas bajo la hipótesis de Hardy-Weinberg. Para comparar los niveles de lípidos y lipoproteínas entre los grupos de genotipos, se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA).

En las variables que se encontraron significancias entre grupos, se realizó la prueba de Bonferroni como *post hoc*. Todos los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar. El nivel de significancia se estableció a $p < 0,05$. El análisis estadístico se hizo con el programa SPSS (versión 11,5).

Resultados

Población de estudio

La muestra (500 escolares) para la evaluación de las variables la conformaron 249 varones (49,8%) y 251 mujeres (50,2%), distribuidos así: 112 escolares con edades entre 8 y 10 años (22,4%), 205 entre 11 y 14 años (40,9%) y 184 entre 15 y 18 años (36,7%). El cuadro 1 muestra las características generales de los escolares distribuidos por sexo. Se encontraron diferencias significativas en la edad y el índice de masa corporal entre los sexos, y los promedios fueron de las dos variables mayores en las niñas.

Distribución de los lípidos sanguíneos por edad y sexo

Los datos del cuadro 2 resumen el comportamiento de los lípidos sanguíneos por edad y sexo de los escolares del estudio.

El análisis de los lípidos plasmáticos entre niños y niñas del mismo grupo de edad, mostró diferencias significativas de medias en el grupo de 15 a 18 años, en las variables c-HDL, c-VLDL, y triacilglicéridos ($p < 0,05$ para todas). El análisis por grupos de edad y sexo mostró que el colesterol total y el c-LDL disminuyeron con la edad en niños. En niñas, sólo el colesterol total tuvo este comportamiento, mientras que el c-LDL disminuyó del primero al segundo grupo y aumentó en el tercero, sin alcanzar las cifras del primer grupo de edad. En todos los grupos de edad, ambas variables (colesterol total y c-LDL) fueron ligeramente más altas en las niñas que en los niños, con diferencias significativas para el colesterol total, pero no para el c-LDL. En niñas y niños, el c-HDL fue muy bajo comparado con los valores de referencia de *The National Cholesterol Education Program* (12); además, desciende para ambos sexos en el grupo de 15 a 18 años; las diferencias fueron significativas entre niños y niñas de esa edad ($p < 0,05$) y entre ese grupo y los demás grupos de edad ($p < 0,005$).

El colesterol VLDL en niños tuvo el mismo comportamiento que el colesterol total y el c-LDL, y disminuyó con la edad; la diferencia fue significativa ($p < 0,05$) para todos los grupos de edad. En las niñas, las VLDL aumentaron en el grupo de 11 a 14 años. Las diferencias fueron significativas entre los grupos de edad. El c-VLDL fue más alto en los niños que en las niñas y las diferencias fueron significativas ($p < 0,05$).

La concentración de triglicéridos disminuye significativamente con la edad en los hombres ($p < 0,05$). En las mujeres tiene un aumento significativo en el grupo de 11 a 14 años ($p < 0,05$).

Cuadro 1. Características basales de la población de estudio distribuidas por sexo.

Variable	Niños n=249	Niñas n=251	P
Edad (años)	12,9 \pm 2,9 (8-18)	13,4 \pm 2,8 (8-18)	0,065
IMC kg/m ² (rango)	18,3 \pm 3,4 (12,3-33,6)	19,2 \pm 3,5(12,6-38,3)	0,003

IMC: índice de masa corporal

Todos los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar.

P: diferencia significativa a $p < 0,05$ producto de un ANOVA

Cuadro 2. Perfil lipídico, índice arterial e índice de masa corporal distribuidos por edad y sexo.

Variable	8-10 años		11-14 años		15-18 años		p
	Niños n=60	Niñas n=52	Niños n=107	Niñas n=98	Niños n=82	Niñas n=102	
CT	153,4±24,4	154,6±33,0	149,2±26,6	150,8±26,0	140,6±36,0	148,9±33,6	0,048
c-LDL	91,7±26,8	97,1±30,9	88,2±27,1	90,1±23,7	86,5±35,5	93,6±27,7	0,304
c-HDL	38,4±9,9	38,0±8,3	38,4±9,6	38,5±8,0	34,1±7,4	37,1±7,9*	0,005
c-VLDL	23,2±14,9	19,4±11,5	22,5±12,9	22,1±10,9	19,9±8,7	18,1±9,8*	0,011
TAG	116,2±74,5	97,1±57,3	112,9±64,7	110,9±54,5	99,6±43,8	90,6±49,0*	0,011
CT/HDL	4,2±1,0	4,2±1,1	4,1±0,9	4,0±0,9	4,2±1,3	4,1±1,1	0,280
IMC	16,5±3,3	16,9±1,9	17,9±3,3	19,0±3,6*	19,9±2,9	21,0±2,8*	0,001

CT: colesterol total; c-LDL: colesterol en lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol en lipoproteínas de alta densidad; c-VLDL: colesterol en lipoproteínas de muy baja densidad; TAG: triacilglicéridos; *: con diferencias estadísticas significativas por sexo a $p < 0,05$; p: significancia entre los grupo de edad.

En los tres grupos de edad, los triacilglicéridos siempre fueron mayores en los hombres comparados con las mujeres ($p < 0,05$).

Respecto al índice arterial (relación colesterol total/c-HDL), se encontró un valor promedio de 4,1 para sexos y grupo de edad, sin diferencia significativa.

Índice de masa corporal

El análisis del índice de masa corporal entre niños y niñas del mismo grupo de edad, mostró diferencias significativas de medias en el grupo de 11 a 14 y de 15 a 18 años. El análisis por grupos de edad y sexo mostró que, en ambos sexos, aumenta con la edad con diferencias significativas entre ellos ($< 0,01$). En niñas es mayor que en los niños en todos los grupos de edad ($p < 0,01$).

Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo apoE

El polimorfismo del gen de apoE se determinó en 500 escolares (249 niños y 251 niñas). La distribución genotípica y la frecuencia alélica se muestran en el cuadro 3. La distribución de los polimorfismos estuvo en equilibrio de Hardy-Weinberg y no se encontraron diferencias en las frecuencias entre niños y niñas. El alelo más frecuente fue el E3 (91,6%), seguido de E2 (5,3%) y E4 (3,1%). En toda la población, el genotipo más común fue el E3/E3 (90,8%), seguido del E2/E3 (5,6%) y el E3/E4 (3,2%). No se encontraron homocigotos para E2/E2 y

Cuadro 3. Frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos en el gen de la apoE en población de escolares quindianos.

Frecuencias alélicas	Total (n=500)	Niños (n=249)	Niñas (n=251)
E2	5,3 (29)	5,2 (14)	5,5 (15)
E3	91,6 (499)	92,0 (249)	91,6 (250)
E4	3,1 (17)	3,0 (8)	3,3 (9)
Frecuencias genotípicas			
E2/E2	0	0	0
E2/E3	5,6 (28)	5,6 (14)	5,6 (14)
E2/E4	0,2 (1)	0	0,4 (1)
E3/E3	90,8 (455)	91,2 (227)	90,8 (228)
E3/E4	3,2 (16)	3,2 (8)	3,2 (8)
E4/E4	0	0	0

E4/E4. Similar distribución genotípica y alélica se encontraron para cada uno de los sexos (cuadro 3).

Distribución del polimorfismo de la apoE y de los lípidos sanguíneos por sexo

La relación entre genotipos y lípidos en niños y niñas se presenta en el cuadro 4. La niña E2/E4 fue eliminada de los análisis debido al efecto opuesto de sus dos alelos sobre los lípidos. Una niña E2/E3 fue eliminada del grupo por su valores de lípidos en niveles patológicos (colesterol total=306,5, c-LDL=179,0 y triacilglicéridos=410 mg/dl).

Los datos muestran que el tipo de alelo apoE tiene un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre el colesterol total, el c-LDL, y el índice de Castelli (colesterol total/c-HDL) en cada sexo y entre sexos. Así, en los niños, los niveles de colesterol

Cuadro 4. Distribución del polimorfismo de la apoE y de los lípidos sanguíneos por sexo.

	E2 (13 niñas, 14 niños)	E3 (228 niñas, 227 niños)	E4 (8 niñas, 8 niños)	P
CT				
Niños	134,3 (91,7-178,5)	147,1 (90-351)	180,5 (144,5-221)	
Niñas	142,4 (109-194,0)	150,4 (5,1-241)	149,6 (169-106)*	0,015
c-LDL				
Niños	74,5 (37,4-111,1)	88,6 (11,7-298)	116,9 (91,8-146,7)	
Niñas	82,5 (33,6-125,8)	92,9 (371-83,4)*	89,5 (114,5-62,6)*	0,005
c-HDL				
Niños	39,1 (55,5-25,5)	36,8 (22-72)	38,8 (60,2-21,7)	
Niñas	40,8 (25,6-55,0)	37,6 (22-65,5)	43,6 (56,7-30)	0,290
c-VLDL				
Niños	23,7 (10-42)	21,7 (6,3-76,8)	24,8 (46,4-13,2)	
Niñas	19,1 (6,8-31,5)	19,9 (62-6,8)*	16,3 (32,5-5,6)	0,727
TAG				
Niños	118,7 (50-210)	108,3 (384-31,5)	123,9 (232,2-66)	
Niñas	95,3 (34-162,3)	99,3 (310-34)*	81,4 (162,5-28)	0,727
CT /HDL				
Niños	3,6 (2,3-7)	4,2 (9,2-2)	4,9 (5-3,7)	
Niñas	3,6 (2,9-5,6)	4,1 (8,5-2,2)	3,5 (4,1-2,9)*	0,006

*Con diferencias estadísticas significativas a $p < 0,05$ en cada variable comparadas por sexo. Los valores son la media (rango); P, significativo entre los alelos sin diferenciar sexo.

CT: colesterol total; c-LDL: colesterol en lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol en lipoproteínas de alta densidad; c-VLDL: colesterol en lipoproteínas de muy baja densidad; TAG: triacilglicéridos

total y c-LDL se distribuyeron por genotipo de la siguiente manera: E4>E3>E2 ($p < 0,05$); mientras que, en las niñas, ocurre lo contrario. Los niveles de colesterol total y c-LDL se distribuyeron así: E3>E4>E2. Para los niveles de c-HDL, la distribución en niños fue así: E2>E4>E3. Por el contrario, en las niñas, el alelo E4 presentó mayores niveles de c-HDL; la distribución fue así: E4>E2>E3. En cualquier polimorfismo, los hombres tienen niveles bajos de c-HDL comparados con los niveles de referencia.

En los niños, los niveles de c-VLDL y de triacilglicéridos se distribuyeron así, E4>E2>E3 ($p < 0,05$); mientras que, en las niñas, el c-VLDL y los triacilglicéridos se distribuyeron así: E3>E2>E4, ($p < 0,05$). La relación colesterol total/HDL fue estadísticamente significativa para el tipo de alelo y para el sexo ($p < 0,05$ para ambos); para los niños, la distribución por genotipos fue E4>E3>E2 y en las niñas fue E3>E2>E4.

En resumen, el alelo de riesgo en los niños fue el alelo E4, el cual presentó colesterol total, c-LDL, triacilglicéridos y c-VLDL más altos que

los niños con los otros dos alelos. El alelo E2 fue el alelo protector, con los valores más bajos para las mismas variables. Por el contrario, en las niñas el alelo de riesgo fue el E3, el cual presentó concentraciones de colesterol total, c-LDL, triacilglicéridos y c-VLDL más altos que en las portadoras de los otros dos alelos. El alelo E4 podría ser protector pues presentó los valores más bajos de triacilglicéridos y c-VLDL y valores intermedios para colesterol total y c-LDL. En el mismo sentido, los niveles de c-HDL tuvieron expresión diferente con respecto al sexo, mientras que el alelo E2 tenía las concentraciones de c-HDL más altas en niños y, el E4, las más bajas. En las niñas, el E3 fue el de menor valor y el E4 el más alto.

Discusión

Recientes estudios han mostrado que las dislipidemias también son un problema de la población joven, razón por la cual, muchos esfuerzos en investigación se han focalizado en describir la prevalencia de estas dislipidemias y sus causas y consecuencias en la infancia (15-17).

En relación con el polimorfismo apoE, varios estudios nacionales (18-20) e internacionales (1,2) se han enfocado en la interacción de este polimorfismo con los lípidos plasmáticos. En Colombia, éste es uno de los pocos trabajos que hay de genotipificación del polimorfismo de la apoE y su relación con los lípidos sanguíneos en escolares aparentemente sanos. En relación con las frecuencias, los resultados muestran que en esta población no se encontró diferencia entre los valores observados de las frecuencias alélicas y genotípicas y los valores esperados, de tal manera que la población estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg. Esto podría significar que la población estudiada no ha sido sometida a migraciones de población significativas de diferentes orígenes y mezclas recientes, o que la migración del campo a la ciudad quedó solapada porque el grupo incluye escolares de origen urbano y rural.

Por otro lado, el análisis muestra que la distribución del alelo E3 y el genotipo E3E3, fue más alta (90,8% y 91,6%, respectivamente) que la encontrada para el mismo alelo en Venezuela (83%) (21), Corea (85,2%) (22) y Grecia (80,7%) (23), muy cercana a la encontrada en una población adulta en Bogotá, Colombia (87%) (19) y en una población de escolares del centro oriente colombiano (86%) (20). La distribución fue similar a la descrita en un grupo de adolescentes mexicanos (89,5%) (24), una población indígena mexicana (90%) y una población mestiza mexicana (91,5%) (25); en estas dos últimas poblaciones, no se encontraron homocigotos E2 y E4, igual a los hallazgos de este estudio. Esto sugiere una influencia racial en la distribución genotípica y alélica en la población quindiana. La ausencia de homocigotos E2 y E4 en esta población, es diferente a los resultados encontrados en una población de jóvenes finlandeses, donde el genotipo E4E4 fue de 3,2% (26); y fue muy similar a los hallazgos en algunos grupos de población colombianos del centro y del centro-oriente del país, donde las frecuencias de los genotipos homocigotos E4 y E2 fueron muy bajas (E4E4 1%, E2E2 0,3%) (18-20). De hecho, se conoce que la población quindiana pertenece

a la autodenominada “comunidad paisa”, en la cual se ha estimado que el componente racial ancestral es 85% caucásica y 15% amerindia (27,28). Los datos del estudio sugieren que, para esta población joven, la influencia indígena puede ser importante en la distribución genotípica del polimorfismo de la apoE. Sin embargo, es necesario profundizar más en este aspecto racial.

Además, este estudio muestra que el polimorfismo apoE tiene un efecto significativo sobre los niveles de colesterol total y c-LDL plasmáticos de los escolares quindianos. En los varones, el colesterol total y el c-LDL se distribuyeron de acuerdo con lo descrito en otras poblaciones (1,21) y en otros grupos de la población colombiana (18-20), en los cuales se muestran bajos niveles de colesterol total y c-LDL y altos niveles de c-HDL, asociados al alelo E2, lo que sugiere un efecto protector anti-aterogénico relacionado con ese alelo, contrario al efecto aterogénico en los portadores del alelo E4, el cual está frecuentemente asociado con altos niveles de colesterol total y c-LDL y bajos niveles de c-HDL. Sin embargo, en las niñas el efecto fue diferente con respecto al alelo E4; las portadoras del mismo tenían niveles intermedios de los lípidos aterogénicos (colesterol total y c-LDL), los niveles más bajos de triacilglicéridos y c-VLDL, los mayores niveles de c-HDL. El alelo E3 tenía los niveles más altos de colesterol total y c-LDL, y los más bajos de c-HDL. Estos resultados sugieren una diferencia de sexo sobre la influencia del polimorfismo de la apoE en los lípidos plasmáticos de esta población a edades tempranas.

Estas diferencias de sexo en los niveles de lípidos dentro de cada genotipo apoE, se han descrito en otros estudios de población (29,30). Al respecto, varios de ellos han reportado la influencia de las hormonas sexuales, principalmente los estrógenos, en la modulación de la concentración de los lípidos plasmáticos por la apoE. Schaefer *et al.* (29) mostraron diferencias en los niveles plasmáticos de c-LDL en cada fenotipo de apoE, entre hombres jóvenes (<53 años) y mayores (>53 años), pero en las mujeres estas diferencias se limitaron

sólo a las posmenopáusicas. Otros estudios han mostrado que las hormonas sexuales modulan el impacto del apoE en el metabolismo de las lipoproteínas, de tal modo, que la expresión de alteraciones en los lípidos es más frecuente en hombres que en mujeres y que, cuando estos ocurren en mujeres, son más frecuentes en la posmenopáusicas (31).

Sin embargo, nuestros datos no sólo muestran diferencias de sexo en la concentración de lípidos en cada genotipo, sino, en la isoforma apoE que los expresa; por ejemplo, como se mencionó antes, los resultados muestran que en las niñas, para colesterol total y c-LDL, el efecto protector está en el alelo E2, pero, para triacilglicéridos, c-VLDL y c-HDL, el efecto protector está en el alelo E4. Es posible que la discrepancia encontrada aquí con respecto a los estudios de población descritos, se deba a dos razones; en ellos, no se hicieron distribuciones simultáneas por grupos de edad y sexo o los grupos estudiados incluían sólo poblaciones adultas, o sólo poblaciones jóvenes, estas últimas con edades fisiológicamente más homogéneas, en las cuales posiblemente no había cambios hormonales importantes, como son el inicio y final de la pubertad. Por el contrario, el presente estudio incluye escolares en edades prepuberales (8 a 10 años) y escolares en el inicio y final de la pubertad (11 a 18 años), en quienes la producción de hormonas sexuales es el evento fisiológico más importante de esa etapa de la vida. Estos cambios fisiológicos podrían explicar, en parte, por qué los resultados analizados por sexo muestran diferencias en la influencia del genotipo apoE en los lípidos sanguíneos. Estos datos son concordantes con lo descrito por Garcés *et al.* (32), en cuanto a la influencia del sexo en una población de niños prepúberes (6 a 7 años). El estudio de Garcés mostró que el porcentaje en el que cambian los lípidos sanguíneos (colesterol total y c-LDL) fue diferente entre niños y niñas y dependió del genotipo. Además de esto, el mismo estudio sugirió una asociación entre la hormona androgénica de la suprarrenal, el sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S), y el efecto que tiene el polimorfismo apoE sobre

los lípidos sanguíneos. Esta asociación mostró que el DHEA-S mejoró el efecto hipolipemiante del alelo E2 y disminuyó el efecto hiperlipémico del E4 (32). Esta relación entre el DHEA-S y el genotipo podría explicar, de alguna manera, por qué en las niñas de este estudio el alelo E4 presentaba los niveles de colesterol total y c-LDL más bajos.

La DHEA y el DHEA-S son andrógenos débiles pero muy abundantes; además, son los principales andrógenos en las niñas y se ha demostrado que aumentan con la edad en hombres y mujeres, y declinan en ambos sexos hacia la tercera década (33). Estas variaciones podrían determinar su influencia sobre los lípidos en las diferentes etapas de la vida de las mujeres, incluidas las niñas de nuestra población de estudio.

Además de la producción de hormonas sexuales suprarrenales, niños y niñas entre los 10 y 11 años (con algunas diferencias de sexo), comienzan la maduración gonadal y la producción de hormonas sexuales gonadales a partir del colesterol. Como consecuencia de la diferencia cronológica en la maduración sexual, los niveles de hormonas sexuales gonadales y la DHEA podrían explicar la variación en la influencia del polimorfismo de la apoE con la edad sobre los niveles sanguíneos de lípidos de esta población, específicamente en las niñas. Al respecto, se ha demostrado que la apoE determina los niveles de testosterona y DHEA, posiblemente, modulando el aporte de colesterol para la síntesis de estas hormonas (34). Otra variable importante y determinante en el nivel de lípidos y hormonas es el IMC. Varios estudios han demostrado que esta variable conserva una relación directa con el colesterol total e una inversa con las HDL (35). En este trabajo, las niñas entre 11 y 18 años tienen un índice de masa corporal significativamente mayor que los niños de la misma edad y también el colesterol total, lo que prueba esta relación. Sin embargo, la estratificación de índice de masa corporal por genotipos (datos no mostrados) no arroja resultados claros que pudieran aportar a la discusión. Todos estos hechos, edad, género, índice de masa corporal, diferencias en la

producción de hormonas sexuales y el efecto de la apoE en la captación de colesterol por las células, podrían explicar en parte las diferencias entre niños y niñas aquí descritas y, sobre todo, entre los grupos de edad de las niñas. Sin embargo, se requiere de más estudios que precisen el aporte de cada una de estas variables de confusión que complica el análisis de la influencia del genotipo apoE en los lípidos plasmáticos.

Indudablemente, la influencia del sexo y la edad en la modulación de los lípidos por las isoformas de la apoE, está demostrada en ésta y en otras poblaciones, y estos hallazgos sugieren, más no prueban, un papel importante de las hormonas sexuales en las diferencias de expresión de los lípidos relacionadas con el genotipo de la apoE. Dado que este trabajo no accedió a los niveles hormonales de la población de estudio para corroborar dicha influencia, el análisis de los resultados es limitado y sólo sugestivo, pero plantea la necesidad de hacer estudios que relacionen estos parámetros en la población, para fundamentar un manejo futuro, individual, por sexo y edad, de las enfermedades relacionadas con los lípidos plasmáticos.

En conclusión, los datos del estudio sugieren una asociación entre los niveles de lípidos plasmáticos de los escolares estudiados y los polimorfismos de la apoE. Esta asociación es influenciada por el sexo y la edad, y esto es más notorio en las niñas mayores de 10 años, en quienes se inicia un cambio fisiológico importante como es la pubertad.

Además, el estudio sugiere una influencia racial en la distribución alélica y genotípica de la apoE que requiere de profundización.

Agradecimientos

A los colegios públicos y privados que apoyaron la realización del trabajo, a los padres y niños participantes.

Conflicto de interés

Los autores manifiestan que no existen conflictos de intereses en la elaboración y ejecución de este proyecto.

Financiación

Universidad del Quindío, código 318.

Referencias

1. **Hixson JE.** Apolipoprotein E polymorphism affect atherosclerosis in young males. Pathobiological determinants of atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. *Arterioscler Thromb.* 1991;11:1237-44.
2. **Heeren J, Beisiegel U, Grewal T.** Apolipoprotein E recycling: Implications for dyslipidemia and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:442-8.
3. **Bennet AM, Di Angelantonio E, Ye Z, Wensley F, Dahlin A, Ahlbom A, et al.** Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA.* 2007;298:1300-11.
4. **Dong LM, Wilson C, Wardell MR, Simmons T, Mahley R, Weisgraber KH, et al.** Human apolipoprotein E: Role of arginine 61 in mediating the lipoprotein preferences of the E3 and E4 isoforms. *J Biol Chem.* 1994;269:22358-65.
5. **Ministerio de la Protección Social, Organización Panamericana de la Salud.** Situación de Salud Colombia. Indicadores básicos 2007. p. 24. Fecha de consulta: 13 de septiembre de 2008. Disponible en: <http://www.minproteccion-social.gov.co/vBecontent/NewsDetail.asp?ID=15895&IDCompany=3>
6. **Instituto Seccional de Salud del Quindío.** Indicadores básicos en salud. SIVIGILA. Bogotá D.C.: INS; 2005.
7. **Uscátegui RM, Álvares MC, Leguado I, Soler W, Martínez I, Arias R, et al.** Factores de riesgo cardiovascular en niños de 6 a 18 años de Medellín, Colombia. *An Pediat (Barc).* 2004;58:411-7.
8. **Gracia B, de Plata C, Pradilla A, Leiva J.** Factores de riesgo para enfermedades de mayor prevalencia en el Valle del Cauca útiles para el desarrollo de estrategias de prevención. *Colomb Med.* 2003;34:47-55.
9. **Poveda E, Callas N, Baracaldo C, Castillo C, Hernández P, Guerra M.** Evaluación de las concentraciones de lípidos y apoproteínas A-I y B-100 en un grupo de escolares de cinco departamentos del centro-oriente de Colombia. *Biomédica.* 2007;27:385-99.
10. **Song Y, Stampfer MJ, Liu S.** Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med.* 2004;141:137-47.
11. **Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS.** Estimation of the concentration of c-LDL in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18:499-502.
12. **Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults.** Executive summary of the Third Report of National Cholesterol

- Education Program (NCEP). Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult treatment Panel III). *JAMA*. 2001;285:2486-96.
13. **Scherr C, Magalhães CK, Malheiros W.** Lipid profile analysis in school children. *Arq Bras Cardiol*. 2007;89:65-70.
 14. **Castelli W, Fernández-Cruz A.** Recomendaciones de ILIB para el diagnóstico de las dislipidemias en Latinoamérica. *Cardiovas Risk Fact* (edición en español). 1994;3(Suppl.1):10-27.
 15. **Kavey RE, Daniels SR, Lauer RM, Atkins DL, Hayman LL, Tauber K.** American Heart Association guidelines for primary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease beginning in childhood. *J Pediatr*. 2003; 142:368-72.
 16. **Ford ES, Mokdad AH, Ajani UA.** Trends in risk factors for cardiovascular disease among children and adolescents in the United States. *Pediatrics*. 2004;114:1534-44.
 17. **Kavey RE, Daniels SR, Lauer RM, Atkins DL, Hayman LL, Taubert K.** American Heart Association guidelines for primary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease beginning in childhood. *Circulation*. 2003;107:1562-6.
 18. **Moreno A, Torres AL, Cartagena AE, Herrera MH.** Determinación de la asociación del polimorfismo de la apolipoproteína E (Apo E) relacionada con la presencia de placa aterosclerótica coronaria. *NOVA*. 2006;4:1-116.
 19. **Torres AL, Guerra-Muñoz M, Segre A, Wagner J, Alvarado M.** Modulación de los niveles de lípidos y lipoproteínas por el polimorfismo de la apolipoproteína E en individuos sanos de Bogotá D.C. *NOVA*. 2005; 3:1-120.
 20. **Callas N, Poveda E, Baracaldo C, Hernández P, Castillo C, Guerra M.** Polimorfismo genético de la apolipoproteína E en un grupo de escolares del centro-oriente colombiano: comparación con las concentraciones plasmáticas de lípidos y apolipoproteínas. *Biomédica*. 2007;27:526-36
 21. **Celaya J, Rodríguez A, Michelle P, Arends A.** Estudios de polimorfismos del gen (APOE) de la apolipoproteína-E (Apo E) y su relación con niveles elevados de colesterol total, lipoproteínas y triglicéridos séricos en niños de edad escolar. *Rev Soc Med Quir Hosp Emerg Perez de León*. 2007;38(Suppl.1):19-26.
 22. **Shin MH, Kim HN, Cui LH, Kweon SS, Park KS, Heo H, et al.** The effect of apolipoprotein E polymorphism on lipid levels in Korean adults. *J Korean Med Sci*. 2005;20:361-6.
 23. **Liberopoulos E, Miltiados G, Hatzivassiliou M, Ayrton N, Bairaktari E, Cariolou M, et al.** Apolipoprotein E polymorphism in northwestern Greece: Frequency and effect on lipid parameters. *Ann Clin Lab Sci*. 2004; 34:347-54.
 24. **Medina-Urrutia AX, Cardoso-Saldana GC, Zamora-González J, Liria YK, Posadas-Romero C.** Apolipoprotein E polymorphism is related to plasma lipids and apolipoprotein in Mexican adolescents. *Hum Biol*. 2004;76:605-14.
 25. **Gamboa R, Hernández-Pacheco G, Hesiquio R, Zúñiga J, Masso F, Montano LF, et al.** Apolipoprotein E polymorphism in the Indian and Mestizo populations of Mexico. *Hum Biol*. 2000;72:975-81.
 26. **Lehtimäki T, Moilanen T, Viikari J, Herblom HK, Ehnholm C, Riiñemaa T, et al.** Apolipoprotein E phenotypes in Finnish youths: a cross-sectional and 6-year follow-up study. *J Lipid Res*. 1990;31:487-95.
 27. **Parson JJ.** Antioqueño colonization in western Colombia. Berkeley: University of California Press; 1949.
 28. **Jiménez I, Mora O, López G, Jiménez ME, Zuluaga L, Isaza R, et al.** Idiopathic epilepsy with generalized tonic clonic seizures in Antioquia, Colombia: Is the joint Amerindian and Negroid racial admixture the cause of its high prevalence? *Biol Res*. 1996;29:297-304.
 29. **Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Johnson S, Ordovas JM, Schaefer MM, Castelli WP, et al.** Effects of gender and menopausal status on the association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoprotein levels. Results from the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:1105-13.
 30. **Ortega H, Castilla P, Gómez-Coronado D, Garcés C, Benavente M, Rodríguez-Artalejo F, et al.** Influence of apolipoprotein E genotype on fat-soluble plasma antioxidants in Spanish children. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:624-32.
 31. **Zofkova I, Zajickova K, Hill M, Horinek A.** Apolipoprotein E gene determines serum testosterone and dehydroepiandrosterone levels in postmenopausal women. *Eur J Endocrinol*. 2002;147:503-6.
 32. **Garcés C, Benavente M, Cano B, Viturro E, Ortega H, Horcajada C, et al.** Effects of dehydroepiandrosterone-sulfate on the Apo E genotype influence on plasma lipid levels in prepuberal children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:3997-4000.
 33. **Vermeulen A.** Dehydroepiandrosterone sulfate and ageing. *Ann NY Acad Sci*. 1995;774:121-7.
 34. **Thorngate FE, Strockbine PA, Erickson SK, Williams DL.** Altered adrenal gland cholesterol metabolism in the apoE-deficient Mouse. *J Lipid Res*. 2002;43:1920-6.
 35. **Agirbasli M, Ciliv G, Cakir S, Srinivasan S, Berenson GS, Ozme S.** Body mass index and lipid levels in children from Ankara, Turkey versus Bogalusa, Louisiana. *Prev Med*. 2005;41:843-5.

ARTÍCULO ORIGINAL

Impacto de un botadero a cielo abierto en el desarrollo de síntomas respiratorios y en costos familiares de atención en salud de niños entre 1 y 5 años en Cali, Colombia

Sandra Lorena Girón, Julio César Mateus, Fabián Méndez

Grupo Epidemiología y Salud Poblacional, Escuela de Salud Pública, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Introducción. La exposición a agentes contaminantes provenientes de los sitios de disposición final de residuos sólidos, tiene efectos potencialmente negativos en la salud de la población que vive en su área de influencia.

Objetivos. Determinar los efectos del botadero municipal a cielo abierto en Cali, conocido como el botadero de Navarro, en el desarrollo de síntomas respiratorios en niños entre 1 y 5 años de edad y en los costos familiares relacionados con la atención de estos síntomas.

Materiales y métodos. Se ensambló una cohorte de niños expuestos y no expuestos al botadero y se les hizo seguimiento durante 6 meses. El desarrollo de síntomas respiratorios y los costos relacionados con la atención en salud se evaluaron mensualmente con entrevistas al adulto responsable del cuidado del niño. Se hizo un análisis logístico longitudinal para determinar el efecto independiente del botadero en el desarrollo de síntomas respiratorios. Mediante técnicas estadísticas no paramétricas de *bootstrap*, se determinaron las diferencias promedio de costos entre las familias de los niños expuestos y no expuestos.

Resultados. La exposición al botadero se asoció a una probabilidad más alta de desarrollar síntomas respiratorios (OR=1,37, IC95% 1,17-1,60) y a mayores costos familiares relacionados con el desarrollo de esos síntomas en niños (diferencia promedio: Col\$ 24.038,5; IC95% 6.211,0-39.650,4).

Conclusiones. La exposición al botadero tiene efectos negativos sobre la salud respiratoria infantil y sobre los costos familiares relacionados con la atención de los síntomas.

Palabras clave: disposición de residuos sólidos, salud del niño, costos de la atención en salud, evaluación en salud, estudios de cohortes, Colombia.

Impact of an open waste disposal site on the occurrence of respiratory symptoms and on health care costs of children

Introduction. Exposure to contaminants of waste disposal sites potentially has negative health effects on population living in close vicinity. However, the impact to the community in terms of illness and health care costs have not been documented in Colombia.

Objective. To determine the effects of an open waste disposal site on the occurrence of respiratory symptoms in children 1-5 year old and on associated household care costs in Cali, Colombia.

Material and methods. A cohort of 863 1-5 year old children was assembled—409 exposed to the site and 454 living more distant. Over a 6-month period, measurement of respiratory symptoms and estimates of associated costs were undertaken once a month by interviewing the mother or another adult responsible of child health. A longitudinal logistical analysis was used to determine the independent effect of the disposal site on the occurrence of respiratory symptoms. Differences in average costs between families of exposed and unexposed children were estimated by non-parametric bootstrap techniques.

Results. Exposure to the disposal site was associated with a larger probability of respiratory symptoms (odds ratio=1.37, 95%CI 1.17-1.60) and with higher household medical costs due to respiratory symptoms were on the average US\$ 10.19 higher (95% US\$ 2.63 - 16,82).

Conclusion. Living in neighborhoods close to garbage disposal sites has negative effects on the respiratory health of children and results in increased family costs related to treatment of associated respiratory symptoms.

Key words: refuse disposal, child health (public health), health care costs, health evaluation, cohort studies, Colombia.

La exposición a los contaminantes de los rellenos sanitarios y de los botaderos a cielo abierto, se ha asociado con el desarrollo de diversos efectos negativos en salud que incluyen fatiga, somnolencia, alergias, estrés psicológico e, incluso, malformaciones congénitas y algunos tipos de cáncer, los cuales son más evidentes en grupos de población vulnerable, como adultos mayores y niños (1-3).

En los niños, la proximidad a los sitios de disposición final de residuos sólidos y la consecuente exposición a sustancias orgánicas e inorgánicas, se han asociado a un riesgo más alto de síntomas respiratorios como rinorrea, tos, sibilancias y dolor de garganta, además de irritación ocular y dolor de cabeza (2,4). Más aun, se ha sugerido que la mayor frecuencia de síntomas respiratorios tiene consecuencias, no sólo en la salud de los niños, sino también en la economía familiar, de los servicios de salud y de la sociedad en general (5-11). La presentación de una enfermedad en una familia genera costos directos e indirectos, que afectan negativamente la economía del hogar. Por lo tanto, el establecimiento de las consecuencias económicas de los eventos en salud relacionados con la exposición a los sitios de disposición de residuos ayudaría a evaluar de manera integral sus posibles efectos.

En Cali, una de las ciudades más grandes de Colombia, desde 1967 funciona el botadero de Navarro como sitio actual de disposición final de residuos sólidos, alrededor del cual se ha generado un amplio crecimiento urbano con conflictos debidos a la percepción comunitaria sobre los posibles efectos negativos del botadero sobre la salud de la población. En este estudio evaluamos el impacto de la exposición

a este botadero en el desarrollo de síntomas respiratorios en niños que viven en su área de influencia y en los costos familiares relacionados con la atención de dichos síntomas.

Materiales y métodos

Tipo de estudio

Se realizó un estudio de cohortes prospectivo en niños entre 1 y 5 años de edad. Los niños se reclutaron en sus casas y sus madres se entrevistaron en la captación y cada mes durante un periodo de seis meses o hasta que se perdieron del seguimiento, es decir, cuando fuera imposible encontrar la madre en la dirección y teléfonos disponibles. El Comité de Ética Institucional de la Universidad del Valle revisó y aprobó el protocolo de investigación.

Exposición de interés

El estudio se llevó a cabo en Cali en el área del botadero municipal de la ciudad que recibe, además, los residuos sólidos de otros municipios del departamento del Valle. Se conformaron dos grupos de niños, uno considerado expuesto y otro no expuesto. El estado de exposición se definió con base en la distancia al botadero de Navarro (menos de 3 km para el grupo expuesto), las condiciones meteorológicas y topográficas (que hicieran probable la dispersión de agentes contaminantes a la zona expuesta) y la permanencia en el área durante el día (80% del tiempo o más). Como no expuestos se seleccionaron los niños que permanecieran 80% del tiempo o más en una zona con baja probabilidad de exposición a las emisiones del botadero de Navarro (más de 3 km y en ubicación opuesta a la dirección predominante del viento) y similares condiciones socioeconómicas. Se incluyeron 409 niños expuestos y 454 no expuestos para el seguimiento.

Síntomas de enfermedad

Se determinó la presencia de uno o más de los siguientes síntomas respiratorios: tos, rinorrea, dolor de garganta, fiebre, eritema y edema ocular, prurito en garganta y oídos, dolor de

Correspondencia:

Sandra Lorena Girón, Escuela de Salud Pública, Universidad del Valle, San Fernando, calle 4B No. 36-140, edificio 118, Cali, Colombia.

Teléfono: (572) 554 2476; fax: (572) 557 0425
sandragiron@fundacionfes.org

Recibido: 19/09/08; aceptado: 19/03/09

cabeza y oídos, disfonía, estornudos, sibilancias y dificultad para respirar.

Variables evaluadas

Para controlar por posibles variables de confusión, se midieron: las características socio-demográficas de la madre y el padre (edad, escolaridad, ocupación, estado civil, ingreso familiar y afiliación a seguridad social); las características demográficas del niño (sexo y edad); los antecedentes de salud del niño (inmunizaciones, lactancia, enfermedades previas); las características de la vivienda (hacinamiento, acceso a servicios públicos y material de las paredes, piso y techos) y de contaminación en el domicilio (hábito de fumar, combustible para cocinar, tenencia de animales en la vivienda y presencia de humedad y hongos en paredes o techo).

Determinación de costos

Como costos familiares directos relacionados con los síntomas respiratorios del niño, se midieron los gastos por consultas, transporte, medicamentos prescritos y remedios caseros. De otra parte, los costos indirectos comprendieron los gastos relacionados con el valor del tiempo dedicado por el cuidador a la atención del niño.

Recolección y administración de los datos

Se diseñó un cuestionario que fue probado y ajustado antes de su aplicación. El cuestionario lo diligenciaron auxiliares de enfermería con experiencia en aplicación de encuestas, bajo la supervisión de un coordinador de trabajo de campo. Las madres de los niños seleccionados se contactaron en la vivienda y, previa obtención del consentimiento informado, se les aplicó el cuestionario de línea de base y se acordaron las citas para las encuestas mensuales de seguimiento. Los cuestionarios se digitaron en Microsoft Access® y se exportaron al programa Stata v.9.0 para su análisis.

Análisis estadístico

Las variables resultado de interés fueron la presencia/ausencia de algún síntoma respiratorio independientemente de su gravedad y el reporte de síntomas respiratorios bajos en el niño

(dificultad respiratoria o sibilancias) durante el último mes.

Se evaluó, en primera instancia, si al momento de la captación había diferencias entre la zona expuesta y la zona no expuesta en la prevalencia de los síntomas respiratorios y se ajustó por potenciales variables de confusión en un modelo de regresión logística múltiple. Para la construcción del modelo final, se seleccionaron las variables con la estrategia de construcción de modelos de *stepwise* hacia atrás con una probabilidad de retiro de 0,25 (12).

Luego, se comparó la incidencia de síntomas respiratorios entre las zonas del estudio durante el seguimiento. Para estos análisis, dado que la enfermedad respiratoria es un evento recurrente, se utilizaron modelos estadísticos que tienen en cuenta la correlación entre los datos. Además, se evaluó la presentación de cronicidad, es decir, agregación por individuo en la presentación de síntomas con el tiempo, ajustando un modelo Poisson longitudinal de efectos aleatorios, en el que un parámetro adicional sigma (σ) estima el incremento de la dispersión de los datos, lo cual permite diferenciar la distribución de Poisson de una Gamma-Poisson (13).

Para el análisis de costos se realizó un análisis exploratorio de los costos familiares directos, indirectos y totales. Para establecer si había diferencias entre las familias expuestas y las de la zona no expuesta, se estimaron y compararon los promedios de costos. Dado que la distribución de estos costos era muy sesgada, los intervalos de confianza de esas diferencias se estimaron utilizando técnicas no paramétricas de *bootstrap*, con iteraciones de 1.000 muestras (14,15). De manera similar, las diferencias se ajustaron utilizando modelos de regresión lineal con técnicas de *bootstrap*.

Resultados

Descripción de la población

Se incluyeron 863 niños, 409 expuestos y 454 no expuestos. De los 863 incluidos, 797 (92,4%) se encontraron para la visita 1 posterior a la captación, 766 (88,8%) para la visita 2, 734

(85,1%) para la visita 3, 708 (82,0%) para la visita 4 y 656 (76,0%) para la visita 5.

Las características sociodemográficas de los niños incluidos se presentan en el cuadro 1. Se observó que los niños expuestos eran de mayor edad, sus padres tenían mayor escolaridad y estaban, principalmente, afiliados al régimen de afiliación en salud de mayor cobertura, en comparación con los niños de la zona no expuesta.

Análisis de la línea de base

Al momento de la captación, se observó una mayor prevalencia de eritema ocular en los niños expuestos (19,3%) comparados con los no expuestos (14,4%), es decir que la probabilidad de presentar este síntoma fue 42% mayor en los niños expuestos que en los no expuestos ($p=0,005$). Además, se encontró una mayor prevalencia de prurito ocular en los expuestos (17,6%) que en los no expuestos (12,8%) ($p=0,05$).

El modelo logístico múltiple mostró asociación entre la exposición al botadero de Navarro y la presencia de síntomas respiratorios (*odds ratio*, OR=1,56; IC95% 1,07-2,26). También, se observaron asociaciones estadísticamente significativas con características sociodemográficas de la madre, como ser mayor de 21 años (OR=1,81; IC95% 1,12-2,92), y con características de la vivienda, como la presencia de humedad (OR=1,58; IC95% 1,06-2,38) y paredes hechas en materiales diferentes al ladrillo (OR=1,64; IC95% 1,03-2,59).

El análisis logístico múltiple también mostró asociación significativa entre la exposición al botadero y la presencia de síntomas respiratorios bajos al momento de la captación. De esta manera, la probabilidad de presentar síntomas respiratorios bajos fue 60% mayor en niños expuestos que en no expuestos (OR=1,59; IC95% 1,01-2,33).

Análisis de seguimiento

Durante los seis meses de seguimiento se observaron mayores riesgos de presencia de tos, prurito ocular, en la garganta y en los oídos, dolor de cabeza y de garganta en los niños expuestos, en comparación con los no expuestos.

Los modelos logísticos múltiples para datos correlacionados mostraron mayores tasas de incidencia de síntomas respiratorios en niños expuestos al botadero (OR=1,37; IC95% 1,17-1,60), en los menores de 3 años (OR=1,24; IC95% 1,06-1,45), en quienes se reportó la presencia de humedad en la vivienda (OR=1,72; IC95% 1,43-2,06) y en aquéllos de familias con ingresos menores de Col\$ 400.000 (US\$ 172,4) (OR=1,59; IC95% 1,36-1,85) (cuadro 2).

Además, el modelo múltiple para la presencia de síntomas respiratorios bajos mostró mayores tasas de incidencia en los niños expuestos. Sin embargo, esta asociación no fue estadísticamente significativa (cuadro 3). De igual manera, se observaron mayores tasas de incidencia en los niños con reporte de humedad en la vivienda (OR=1,30; IC95% 1,00-1,69) (cuadro 3).

El modelo múltiple de Poisson mostró mayor agregación de síntomas en los niños expuestos (*incidence rate ratio*, IRR=1,17; IC95% 1,07-1,29), en aquellos menores de 3 años (IRR=1,11; IC95% 1,01-1,21) y en aquéllos con humedad en la vivienda (IRR=1,31, IC95% 1,19-1,46). Además, se observó que la probabilidad de recurrencia de síntomas en un niño durante los seis meses de seguimiento fue 36% (IC95% 0,34-0,43) mayor en niños expuestos que en los no expuestos.

Costos familiares

Se observaron mayores costos directos relacionados con la atención de los síntomas respiratorios evaluados en las familias de los niños expuestos ($p<0,05$), los cuales fueron 43% mayores en medicamentos, 50% mayores en transporte y 42% mayores en el total de los costos directos, en comparación con las familias de niños no expuestos. De manera similar, los costos indirectos fueron 46% mayores en las familias de los niños expuestos ($p<0,05$). Consecuentemente, se observaron costos totales 45% mayores en familias de los niños expuestos ($p<0,05$).

El modelo lineal múltiple mostró mayores costos en familias de niños expuestos, en aquéllas de niños menores de 3 años, y en aquéllas que

Cuadro 1. Características socio-demográficas de los niños incluidos en la cohorte expuestos y no expuestos al Botadero de Navarro en Cali, Colombia, 2007.

Característica	Expuestos al botadero			
	Sí		No	
	n ¹	%	n ¹	%
Sexo				
Femenino	194	47,43	236	51,98
Masculino	215	52,57	218	48,02
Edad (años)				
1	84	20,54	76	16,74
2	90	22,00	104	22,91
3	61	14,91	85	18,72
4	89	21,76	95	20,93
5	85	20,78	94	20,70
Edad de la madre *				
16-20	25	6,11	58	12,78
21-25	89	21,76	134	29,52
26-30	117	28,61	106	23,35
31-35	98	23,96	82	18,06
≥36	80	19,56	74	16,30
Escolaridad de la madre*				
Ninguna/primaria	50	12,41	75	16,89
Secundaria	248	61,54	260	58,56
Técnica /universitaria	105	26,05	109	24,55
Edad del padre *				
17-20	10	2,44	14	3,08
21-25	40	9,78	100	22,03
26-30	83	20,29	80	17,62
31-35	98	23,96	78	17,18
≥36	178	43,52	182	40,09
Escolaridad del padre *				
Ninguna/primaria	52	14,02	97	26,72
Secundaria	243	65,50	212	58,40
Técnica /universitaria	76	20,49	54	14,88
Ocupación de la madre				
Trabajo	133	32,92	153	34,23
Hogar	264	65,35	264	59,06
Estudio	5	1,24	15	3,36
Busca empleo	2	0,50	15	3,36
Ocupación del padre				
Trabajo	357	94,69	353	96,19
Hogar	6	1,59	2	0,54
Estudio	1	0,27	1	0,27
Busca empleo	13	3,45	11	3,00
Afiliación en salud del niño *				
Contributivo	249	60,88	184	40,53
Subsidiado	58	14,18	151	33,26
No afiliado	102	24,94	119	26,21

¹ Las variaciones en los totales se debe a datos faltantes.

* p<0,05

Cuadro 2. Factores de riesgo de desarrollar síntomas respiratorios en niños entre 1 y 5 años de edad expuestos al Botadero de Navarro en Cali ⁽¹⁾.

Variables	OR crudo	IC _{95%}	OR ajustado	IC _{95%}
Expuesto al botadero				
No	1		1	
Sí	1,17	1,00 ; 1,36 **	1,37	1,17 ; 1,60 **
Edad (años)				
≥3	1		1	
<3	1,23	1,05 ; 1,44 **	1,24	1,06 ; 1,45 **
Humedad en la vivienda				
No	1		1	
Sí	1,72	1,43 ; 2,07 **	1,72	1,43 ; 2,06 **
Ingreso familiar				
>US\$ 172,4 (Col\$ 400,000)	1		1	
≤US\$ 172,4 (Col\$ 400,000)	1,59	1,37 ; 1,86 **	1,59	1,36 ; 1,85 **

¹ Análisis de datos con base en un modelo logístico longitudinal para datos repetidos en el tiempo (GEE)

** p<0,05 US\$ 1=Col\$ 2.320

Cuadro 3. Factores de riesgo de desarrollar síntomas respiratorios bajos en niños entre 1 y 5 años de edad expuestos al Botadero de Navarro en Cali ⁽¹⁾.

Variables	OR crudo	IC _{95%}	OR ajustado	IC _{95%}
Expuesto al botadero				
No	1		1	
Sí	1,14	0,91 ; 1,43	1,23	0,97 ; 1,55 *
Edad (años)				
≥3	1		1	
<3	1,12	0,89 ; 1,42	1,14	0,90 ; 1,43
Humedad en la vivienda				
No	1		1	
Sí	1,32	1,03 ; 1,69 **	1,30	1,00 ; 1,69 *
Material de las paredes de la vivienda				
Ladrillo	1		1	
Madera / Barro / Otro	1,35	1,01 ; 1,80 **	1,30	0,96 ; 1,76 *

¹ Análisis de datos con base en un modelo logístico longitudinal para datos repetidos en el tiempo (GEE).

** p<0,05 * p<0,10

reportaron la presencia de eritema ocular y de síntomas respiratorios bajos (cuadro 4). En contraste, se observaron menores costos en las familias cuyos padres tienen primaria como mayor nivel de escolaridad o no tienen ningún grado de estudio.

Se exploró la presencia de una posible modificación de efecto entre los costos totales promedio y las variables independientes, mediada por el tipo de afiliación en salud al sistema colombiano. Se observó que, entre los niños no afiliados al sistema, las familias de los expuestos tuvieron

mayores costos relacionados con la atención de síntomas, en comparación con las de los no expuestos; sin embargo, esta interacción no fue estadísticamente significativa.

Discusión

En este estudio se encontró que la exposición a un botadero a cielo abierto se asoció a un mayor riesgo de presentar síntomas respiratorios en niños, tanto al momento de la captación como durante el seguimiento. Específicamente, en la captación, 19,3%, 17,6% y 19,8% de los niños expuestos reportaron la presencia de eritema

Cuadro 4. Diferencias en costos familiares totales (en pesos colombianos) relacionados con la atención de síntomas respiratorios en niños expuestos y no expuestos al Botadero de Navarro en Cali.

Variable	Diferencia promedio cruda	IC _{95%}	Diferencia promedio ajustada	IC _{95%} (a)
Expuesto al botadero				
No				
Sí	30.809,9	11.896,5-47.085,4 **	24.038,5	6.211,0-39.650,4 **
Edad (años)				
≥3				
<3	21.021,4	3.340,5-38.043,8 **	20.811,0	43.30,3-36.580,1 **
Escolaridad del padre				
Técnica /universitaria				
Secundaria	-7.564,7	-30.412,2-13.448,5	-13.400,4	-32.501,8-6.214,6
Ninguna /primaria	-23.604,2	-48.603,7- -955,6 **	-24.241,4	-44.820,8- -3.157,1 **
Afiliación en salud				
Contributivo				
Subsidiado	-5.913,8	-26.003,6-16.760,1	-65,0	-18.974,9-20.895,6
No afiliado	-17.829,1	-37.050,92-542,3 **	-14.859,6	-31.510,1-2.225,5
Ingreso familiar				
>US\$ 172,4 (Col\$ 400.000)				
≤US\$ 172,4 (Col\$ 400.000)	-1.110,0	-17.290,3-17.283,6	954,2	-15.623,7-17.170,1
Eritema ocular				
No				
Sí	79.433,5	48.194,0-11.9356,3 **	65.661,0	35.602,5-100.693,9 **
Síntomas respiratorios bajos				
No				
Sí	73.561,4	48.973,8 ; 109.937,4 **	59.453,2	33.135,9-92.353,4 **

(a)Intervalo calculado con técnicas no paramétricas de bootstrap

** p<0,05 * 0,05<p<010 US\$1=\$2.320

y prurito ocular y síntomas respiratorios bajos, mientras que 14,4%, 12,8% y 15,9% de los niños no expuestos reportaron tales síntomas. Además, durante el seguimiento se observaron riesgos significativamente mayores en el desarrollo de tos, prurito nasal, en la garganta y en los oídos, dolor de cabeza y de garganta en niños expuestos. También, se observó que los niños expuestos tienen mayor probabilidad de agregación y recurrencia de síntomas respiratorios, en comparación con los niños no expuestos.

Estos mayores riesgos de síntomas respiratorios son coherentes con los efectos que generan los contaminantes emitidos por los rellenos sanitarios y por los botaderos a cielo abierto en general y en particular, por los que se han reportado en el botadero de Navarro de Cali, tales como metano, compuestos orgánicos volátiles y PM10 (16-20).

Además de los mayores riesgos debidos a la exposición al botadero, la presencia de humedad

en las viviendas incrementó la probabilidad de desarrollar síntomas respiratorios en general y síntomas respiratorios bajos en particular. Como otros autores lo han reportado, la exposición a moho y humedad se relaciona con una mayor frecuencia de síntomas respiratorios, tales como sibilancias, asma y rinoconjuntivitis (21,22). De esta manera, la presencia de humedad incrementa el nivel de bacterias, polvo y microbios en el ambiente dentro del domicilio, lo cual produce una respuesta alérgica de las vías respiratorias altas y bajas (23).

En relación con las características sociodemográficas, en este estudio se observó una mayor probabilidad de presentar síntomas respiratorios a menor edad de la madre y del niño. En particular, los niños de madres menores de 21 años tuvieron 81% más de riesgo de presentar síntomas respiratorios bajos al momento de la captación, en comparación con niños de madres mayores de dicha edad. Este mayor riesgo

podría explicarse por la menor experiencia de las madres más jóvenes respecto al cuidado de los niños, en comparación con las de mayor edad (24,25). También es posible que este hallazgo muestre tendencia hacia un mayor reporte de síntomas respiratorios en madres mayores que en las menores.

Además, los niños menores de 3 años tuvieron una mayor probabilidad de desarrollar síntomas respiratorios durante el seguimiento, en comparación con los niños mayores. Este hallazgo es coherente con otros reportes que describen mayores riesgos de asma posnatal y alergias en niños menores de 3 años generados por la exposición a contaminantes ambientales, como NO₂, SO₂ y material sólido (26-28). Además, las características anatómicas y fisiológicas de los menores de 3 años se relacionan con una mayor susceptibilidad del epitelio de las vías respiratorias, lo cual resalta la importancia del efecto que la exposición a agentes ambientales puede tener sobre la salud respiratoria infantil en el primer año de vida.

Los hallazgos de este estudio también mostraron que un menor nivel de ingreso y la existencia de materiales frágiles en la vivienda incrementan el riesgo de presentar síntomas respiratorios en general y de síntomas respiratorios bajos en particular. El ingreso familiar y los materiales de las paredes reflejan el efecto de las condiciones socioeconómicas de la familia y otras características relacionadas, como el menor nivel educativo y las dificultades de acceso a los servicios de salud, las cuales incrementan el riesgo de enfermedades en los niños.

En este estudio se midieron las diferencias de costos debidas a la presencia de síntomas respiratorios en niños de familias expuestas y no expuestas al botadero de Navarro en Cali. Se encontró que las familias expuestas tuvieron costos en promedio 45% mayores que aquellas no expuestas; así, vivir en el área de influencia del botadero de Navarro incrementó los costos familiares relacionados con la presencia de síntomas respiratorios en niños.

Además, los costos fueron mayores en familias de niños menores de 3 años y en aquellas con

niños que presentaron síntomas respiratorios bajos y eritema ocular. Estos mayores costos podrían sugerir más acciones de cuidado en salud orientadas a solucionar los síntomas en los niños de menor edad y podría resaltar la gravedad impuesta por el eritema ocular y los síntomas respiratorios bajos, como sibilancias y dificultad respiratoria, los cuales estimulan la búsqueda de atención en salud para la resolución de estos síntomas (29).

Como se esperaba, se observaron menores costos en familias de padres sin ningún nivel educativo y en aquellas con primaria como su mayor nivel; así, estas familias asumieron costos que en promedio fueron de Col\$ 24.241,4 (US\$ 10,36) menores, comparadas con familias cuyo padre tenía mayor nivel educativo. Esta diferencia podría estar relacionada con la menor capacidad económica de las familias para responder a la presencia de síntomas respiratorios en sus niños, en comparación con familias de mejores condiciones socioeconómicas.

Debilidades y fortalezas

Una de las debilidades de este estudio es la medición de los síntomas respiratorios y de los costos familiares mediante entrevista, lo cual podría guiar a un reporte aumentado en la población expuesta. En relación con este punto, se ha descrito que las encuestas realizadas en población residente cerca de los sitios de riesgo local reconocido, tienden a mostrar incremento en el autorreporte de resultados y síntomas en salud, como dolor de cabeza, somnolencia, síntomas respiratorios, condiciones psicológicas y problemas gastrointestinales (30-33). Aunque no es posible descartar un mayor reporte en la población expuesta, otros autores han usado registros médicos que confirman la presencia de algunos síntomas y no muestran la presencia de un reporte aumentado o disminuido (34).

Otra debilidad de este estudio es que, aunque se hicieron mediciones ambientales, no se tomaron en forma simultánea a la medición de los síntomas respiratorios y tampoco hubo medición individual de la exposición a los contaminantes. Además, el estudio caracterizó el estado de exposición a partir del tiempo de permanencia en el área y del

lugar de residencia. Aunque esto podría guiar a posibles sesgos, es probable que el error en la clasificación sea no diferencial, con lo cual los efectos podrían guiar a la subestimación en las asociaciones encontradas y, por tanto, las asociaciones positivas encontradas podrían ser de mayor magnitud a las reportadas. Además, las mediciones de contaminación por fuera del domicilio en el área expuesta y en la no expuesta ayudaron a confirmar el estado de exposición e hicieron evidente la relación directa entre la contaminación dentro y fuera del domicilio (35).

Entre las fortalezas del estudio se encuentra el diseño de cohorte prospectivo, el cual permitió incorporar la dinámica de cambio en los síntomas respiratorios estudiados, durante el seguimiento a seis meses. Este diseño y la medición repetida de los síntomas respiratorios ayudaron a incrementar el poder estadístico del estudio. Además, debido a que para establecer los efectos de la disposición final de residuos no es posible realizar un estudio experimental, el diseño de cohorte es la mejor forma de establecer la presencia de estos efectos, con un mayor nivel de confiabilidad en las asociaciones encontradas.

La selección de las áreas expuestas y no expuestas, comparables en sus características socioeconómicas, permitió el control de potenciales factores de confusión. Además, los efectos observados del botadero de Navarro sobre los niños expuestos y el hecho de que la población del área expuesta tenga mejores condiciones socioeconómicas, dan mayor soporte a las asociaciones encontradas y resaltan la importancia que podría llegar a tener la exposición a un botadero a cielo abierto en poblaciones con menores condiciones económicas.

Igualmente, este estudio midió y ajustó por potenciales factores de confusión, tales como características sociodemográficas de padres y niños, características de las viviendas y condiciones de salud relacionadas en los niños. Estas mediciones otorgan mayor validez a las asociaciones encontradas y superan las dificultades de varios estudios orientados a establecer efectos del manejo de residuos sobre la salud (36).

Aunque la medición de síntomas respiratorios se obtuvo mediante entrevista a las madres, sólo se midieron aquéllos recomendados por otros autores como los más reconocibles por los padres y, por tanto, menos susceptibles a minimización en este tipo de medición (37).

Otra fortaleza de este estudio es el bajo nivel de pérdidas ocurridas durante el seguimiento, lo cual ayudó a minimizar la posibilidad de un sesgo de selección.

De acuerdo con el diseño del estudio, los datos se analizaron teniendo en cuenta la posible correlación entre mediciones repetidas durante los seis meses de seguimiento. Igualmente, se aplicaron técnicas no paramétricas de *bootstrap* para analizar los datos de costos, los cuales presentaron distribuciones sesgadas, sin tener que hacer transformaciones de los datos.

Este estudio evidencia los efectos de un botadero a cielo abierto sobre el desarrollo de síntomas respiratorios en niños y sobre los costos familiares relacionados con la solución de estos síntomas; además, resalta la importancia de los efectos de la disposición final de residuos sobre la salud de las poblaciones del área de influencia. Esta información puede ser un insumo clave en las decisiones relacionadas con la planeación, manejo y regulación respecto a la disposición final de residuos, tanto en Colombia como en otros países.

Agradecimientos

Los autores agradecen la participación de la población de las zonas expuestas y no expuestas por su colaboración durante el desarrollo del estudio y el trabajo cuidadoso realizado por el equipo de recolección de datos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses en la realización de esta investigación.

Financiación

Este estudio fue financiado con recursos del Programa Nacional de Ciencia y Tecnología de la Salud del Instituto Nacional para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología Francisco José

de Caldas-Colciencias y de la Universidad del Valle, Convenio No. RC. 412-2004. Código del proyecto No. 1106-04-16318.

Referencias

- Fielder HM, Poon-King CM, Palmer SR, Moss N, Coleman G.** Assessment of impact on health of residents living near the Nant-y-Gwyddon landfill site: retrospective analysis. *BMJ*. 2000;320:19-22.
- Vrijheid M.** Health effects of residence near hazardous waste landfill sites: a review of epidemiologic literature. *Environ Health Perspect*. 2000;108 (Suppl.1):101-12.
- Elliott P, Briggs D, Morris S, de Hoogh C, Hurt C, Jensen TK, et al.** Risk of adverse birth outcomes in populations living near landfill sites. *BMJ*. 2001;323:363-8.
- Paigen B, Goldman LR, Highland JH, Magnant MM, Steegman AT.** Prevalence of health problems in children living near Love Canal. *Haz Waste Haz Mat*. 1985;2: 23-43.
- Carabin H, Gyorkos TW, Soto JC, Penrod J, Joseph L, Collet JP.** Estimation of direct and indirect costs because of common infections in toddlers attending day care centers. *Pediatrics*. 1999;103:556-64.
- Elden LM, Coyte PC.** Socioeconomic impact of otitis media in North America. *J Otolaryngol*. 1998;27 (Suppl. 2): 9-16.
- Frank TL, Cropper JA, Hazell ML, Frank PI, Hannaford PC.** Childhood asthma: healthcare resource utilization in those with and without a diagnosis of the condition. *Respir Med*. 2004;98:454-63.
- Anand VK.** Epidemiology and economic impact of rhinosinusitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2004;193 (Suppl.):3-5.
- Austin JB, Selvaraj S, Russell G.** Childhood asthma in the Highlands of Scotland - morbidity and school absence. *Scott Med J*. 2004;49:18-21.
- Crystal-Peters J, Neslusan CA, Smith MW, Togias A.** Health care costs of allergic rhinitis-associated conditions vary with allergy season. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2002;89:457-62.
- Stevens CA, Turner D, Kuehni CE, Couriel JM, Silverman M.** The economic impact of preschool asthma and wheeze. *Eur Respir J*. 2003;21:1000-6.
- Hosmer DW, Lemeshow S.** Applied logistic regression. New York, NY: John Wiley & Sons; 1989.
- Diggle P, Heagerty P, Liang K-Y, Zeger S.** Analysis of longitudinal data. 2nd edition. New York, NY: Oxford University Press; 2002.
- Barber JA, Thompson SG.** Analysis of cost data in randomized trials: an application of the non-parametric bootstrap. *Stat Med*. 2000;19:3219-36.
- Thompson SG, Barber JA.** How should cost data in pragmatic randomized trials be analyzed? *BMJ*. 2000;320:1197-200.
- Wong TW, Wun YT, Yu TS, Tam W, Wong CM, Wong AH.** Air pollution and general practice consultations for respiratory illnesses. *J Epidemiol Community Health*. 2002;56:949-50.
- Hernández-Cadena L, Téllez-Rojo MM, Sanín-Aguirre LH, Lacasaña-Navarro M, Campos A, Romieu I.** Relación entre consultas a urgencias por enfermedad respiratoria y contaminación atmosférica en Ciudad Juárez, Chihuahua. *Salud Pública Mex*. 2000;42:288-97.
- Maître A, Collot-Fertey D, Anzivino L, Marques M, Hours M, Stoklov M.** Municipal waste incinerators: air and biological monitoring of workers for exposure to particles, metals, and organic compounds. *Occup Environ Med*. 2003;60:563-9.
- Delfino RJ, Gong H, Linn WS, Hu Y, Pellizzari ED.** Respiratory symptoms and peak expiratory flow in children with asthma in relation to volatile organic compounds in exhaled breath and ambient air. *J Expo Anal Environ Epidemiol*. 2003;13:348-63.
- Ballester Díez F, Tenías JM, Pérez-Hoyos S.** Efectos de la contaminación atmosférica sobre la salud una introducción. *Rev Esp Salud Pública*. 1999;73:109-21.
- Simoni M, Lombardi E, Berti G, Rusconi F, La Grutta S, Piffer S, et al.** Mould/dampness exposure at home is associated with respiratory disorders in Italian children and adolescents: the SIDRIA-2 Study. *Occup Environ Med*. 2005;62:616-22.
- Simoni M, Lombardi E, Berti G, Rusconi F, La Grutta S, Piffer S, et al.** Effects of indoor exposures on respiratory and allergic disorders. *Epidemiol Prev*. 2005;29(Suppl.2):57-61.
- Skorge TD, Eagan TM, Eide GE, Gulsvik A, Bakke PS.** Indoor exposures and respiratory symptoms in a Norwegian community sample. *Thorax*. 2005;60:937-42.
- Basu AM, Stephenson R.** Low levels of maternal education and the proximate determinants of childhood mortality: a little learning is not a dangerous thing. *Soc Sci Med*. 2005;60:2011-23.
- Valadez JJ, Hage J, Vargas W.** Understanding the relationship of maternal health behavior change and intervention strategies in a Nicaraguan NGO network. *Soc Sci Med*. 2005;61:1356-68.
- Zmirou D, Gauvin S, Pin I, Momas I, Sahraoui F, Just J, et al.** Traffic related air pollution and incidence of childhood asthma: results of the Vesta case-control study. *J Epidemiol Community Health*. 2004;58:18-23.
- Peden DB.** Development of atopy and asthma: candidate environmental influences and important

- periods of exposure. *Environ Health Perspect.* 2000;108(Suppl.3):475-82.
28. **Pino P, Walter T, Oyarzun M, Villegas R, Romieu I.** Fine particulate matter and wheezing illnesses in the first year of life. *Epidemiology.* 2004;15:702-8.
 29. **Sreeramareddy CT, Shankar RP, Sreekumaran BV, Subba SH, Joshi HS, Ramachandran U.** Care seeking behaviour for childhood illness- a questionnaire survey in western Nepal. *BMC Int Health Hum Rights.* 2006;6:7.
 30. **Ozonoff D, Colten ME, Cupples A, Heeren T, Schatzkin A, Mangione T, et al.** Health problems reported by residents of a neighborhood contaminated by a hazardous waste facility. *Am J Ind Med.* 1987;11:581-97.
 31. **Dunne MP, Burnett P, Lawton J, Raphael B.** The health effects of chemical waste in an urban community. *Med J Aust.* 1990;152:592-7.
 32. **Miller MS, McGeehin MA.** Reported health outcomes among residents living adjacent to a hazardous waste site, Harris County, Texas, 1992. *Toxicol Ind Health.* 1997;13:311-9.
 33. **Lipscomb JA, Goldman LR, Satin KP, Smith DF, Vance WA, Neutra RR.** A follow-up study of the community near the McColl waste disposal site. *Environ Health Perspect.* 1991;94:15-24.
 34. **Hertzman C, Hayes M, Singer J, Highland J.** Upper Ottawa street landfill site health study. *Environ Health Perspect.* 1987;75:173-95.
 35. **Wheeler BW, Ben-Shlomo Y.** Environmental equity, air quality, socioeconomic status, and respiratory health: a linkage analysis of routine data from the Health Survey for England. *J Epidemiol Community Health.* 2005; 59:948-54.
 36. **Rushton L.** Health hazards and waste management. *Br Med Bull.* 2003;68:183-97.
 37. **Lanata CF, Rudan I, Boschi-Pinto C, Tomaskovic L, Cherian T, Weber M, et al.** Methodological and quality issues in epidemiological studies of acute lower respiratory infections in children in developing countries. *Int J Epidemiol.* 2004;33:1362-72.

ARTÍCULO ORIGINAL

Identificación de algunos genes asociados al proceso de germinación de la conidia al micelio en *Paracoccidioides brasiliensis*

Ana María García^{1,2}, Orville Hernández^{1,3}, Beatriz H. Aristizábal⁴, Luz Elena Cano^{3,5}, Ángela Restrepo³, Juan G. McEwen^{1,6}

¹ Unidad de Biología Celular y Molecular, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia

² Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia

³ Unidad de Micología Médica y Experimental, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia

⁴ Laboratorio de Biología Molecular, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia

⁵ Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

⁶ Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. *Paracoccidioides brasiliensis* es un hongo dimórfico térmico, que a temperatura ambiente se presenta como un moho productor de conidias, mientras que en el huésped se comporta como una levadura de gemación múltiple. Los mecanismos moleculares que rigen la germinación de conidia a micelio aún se desconocen.

Objetivo. Estudiar en *P. brasiliensis* la cinética del proceso de germinación de conidia a micelio y determinar los genes expresados durante este proceso mediante la construcción y el análisis de una librería EST (*Expressed Sequence Tag*).

Materiales y métodos. Para el estudio de la cinética de germinación, se produjeron y aislaron conidias de *P. brasiliensis*. Estas fueron incubadas en cultivos líquidos a 18°C por 24, 48, 72 y 96 horas, y se examinaron por microscopía de luz. A partir de conidias cultivadas por 96 horas, se construyó y caracterizó una librería EST, la cual representaría los genes expresados durante el proceso de germinación.

Resultados. Durante el proceso de germinación de conidia a micelio, se observó 11,7±1,2%, 30±0,6%, 43±1,3% y 66±2,4% de germinación a las 24, 48, 72 y 96 horas de incubación, respectivamente. Además, se obtuvo una librería del proceso de germinación consistente en 129 secuencias agrupadas en cuatro secuencias contiguas y siete secuencias únicas, para un total de 11 posibles genes. Ocho secuencias (72,7%) no habían sido descritas anteriormente en otras librerías informadas para este hongo y podrían representar genes específicos de la germinación de conidia a micelio.

Conclusiones. Éste es el primer reporte en el que se identifican genes no descritos anteriormente, que son expresados durante la germinación de conidia a micelio, proceso de gran importancia en la biología de *P. brasiliensis*.

Palabras clave: *Paracoccidioides*, esporas fúngicas, micelio, germinación.

Identification of genes associated with germination of conidia to form mycelia in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*

Introduction. *Paracoccidioides brasiliensis* is a thermo-dimorphic fungus. At room temperature it grows as a mold that produces conidia, whereas in the vertebrate host it grows as a multiple-budding yeast. The molecular mechanisms involved in the germination from the conidia to the mycelia process remain unknown.

Objective. The kinetics of conidia to mycelia germination process were studied in the dimorphic fungus *P. brasiliensis*. Gene expression during this process was evaluated by construction and analysis of an EST library.

Materials and methods. For the germination kinetics study, *P. brasiliensis* conidia were isolated as single cell units. Then, they were cultured at 18° C in BHI (brain-heart infusion) broth for 24, 48, 72 and 96 hr. After each period, they were examined by light microscopy. From conidia harvested

at 96 hr, an EST library was constructed; at this stage the gene expression was presumed to be maximal for the germination process.

Results. During the conidia to the mycelia developmental process, the following germination rates were observed: at 24 hr, 11.7±1.2%; at 48 hr, 30±0.6%; at 72 hr, 43±1.3%; and at 96 hr, 66±2.4%. At the 96 hour stage, an EST library was constructed. It consisted of 129 sequences grouped in 4 contigs and 7 singlets for a total of 11 possible genes. Eight of the sequences had not been described previously in other EST libraries of this fungus.

Conclusions. New genes were identified that were expressed during the conidia to the mycelia germination process and may represent genes specific to the germination process.

Key words: *Paracoccidioides*; spores; fungal; mycelium, germination.

La paracoccidioidomicosis, enfermedad infecciosa endémica de áreas tropicales y subtropicales de Centroamérica y Suramérica, es causada por el hongo dimórfico térmico *Paracoccidioides brasiliensis* (1,2). La paracoccidioidomicosis es una enfermedad crónica que afecta especialmente a hombres adultos, trabajadores del campo. La enfermedad se desarrolla cuando las partículas infecciosas (conidias o fragmentos de micelio) que se alojan en los alvéolos pulmonares del huésped, realizan el proceso de transición hacia levadura, como respuesta para la supervivencia en los tejidos (3,4).

En cultivos a 37°C y en los tejidos mismos, *P. brasiliensis* se encuentra en forma de levadura, estructura que se reproduce por gemación múltiple que le confiere el aspecto típico de un timón de barco (2). A temperaturas entre 18°C y 24°C, el hongo se desarrolla como un moho provisto de micelios delgados, ramificados y tabicados que, en medios de cultivo pobres en carbohidratos, producen diversos tipos de microconidias (2 a 5 µm), que se consideran las partículas infecciosas (4). La conidia es una estructura en reposo que, cuando encuentra un medio propicio, comienza su proceso de germinación a micelio, si se encuentra en el medio ambiente o a temperaturas menores de 26°C, o inicia la transición a levadura, si entra en contacto con un hospedero mamífero o si es cultivada a 36°C (2).

La transición de micelio a levadura ha sido estudiada por diversos investigadores, y se ha logrado establecer una escala de estadios morfológicos de esta transición y permitir su cuantificación (5-8). De esta manera, el desarrollo de levaduras a partir del micelio se da desde el primer día del cambio térmico y el desarrollo de levaduras de gemación múltiple se presenta después de 5 días (8) y se alcanza el 50% de la transición a las 48 horas de iniciado el proceso (5). De igual manera, se ha estudiado la transición de levadura a micelio (5-7) y se han evaluado los cambios morfológicos que ocurren durante este proceso, los que muestran elongación de las células en gemación con muerte y desintegración de las células madre y conversión a micelio de 50% a 60% de las células, a las 48 horas del cambio térmico.

De igual manera, la transición de conidia a levadura ha sido ampliamente estudiada por diversos autores, tanto en ensayos *in vivo* (9-11) como *ex vivo* (12-15); éstos han demostrado que, en promedio, el 50% de esta transición se logra después de 48 horas de incubación a 36°C y llega hasta el 80% a las 72 horas. Sin embargo, es poco lo que se conoce sobre el proceso de germinación de conidia a micelio. Restrepo *et al.* (16) reportaron por primera vez el proceso de germinación *in vitro* y demostraron que la elongación de las hifas ocurría después de 60 horas de incubación a 25°C. Posteriormente, Restrepo *et al.* (Restrepo BI, McEwen JG, Salazar ME, Restrepo A. The mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: X Congress of the International Society for Human and Animal Mycology-ISHAM; 1988. p. 143-8) confirmaron el desarrollo del proceso de germinación, indicando

Correspondencia:

Ana María García, Unidad de Biología Celular y Molecular, Corporación para Investigaciones Biológicas, Carrera 72A N°. 78B-141, Medellín, Colombia.

Fax: (574) 4415514.

agarcia@cib.org.co

Recibido: 07/11/08; aceptado:26/03/09

que a 25°C y en 96 horas, se producían los tubos germinales, los que posteriormente progresaban hasta llegar a elementos de micelios.

Con respecto a la evaluación de los mecanismos moleculares y de la expresión de genes en los diferentes estadios morfológicos, se han realizado varios estudios utilizando estrategias, tales como la construcción de librerías EST (*Expressed Sequence Tag*) y los microarreglos, con los que se ha logrado recopilar un gran número de genes que se expresan durante los estadios de micelio y levadura (5,17,18), así como genes que presentan expresión diferencial durante la transición de micelio a levadura (6,19). Estos estudios han abierto las puertas al conocimiento de los mecanismos genéticos que rigen la diferenciación morfológica de *P. brasiliensis*; sin embargo, los procesos moleculares involucrados en los cambios morfológicos de las conidias y los genes involucrados en su transición a levadura y germinación a micelio, han sido muy poco estudiados. No obstante, a partir de ARNm obtenido a las 48 horas del proceso de transición, fue posible construir una pequeña librería EST, compuesta por 79 posibles secuencias, de las cuales, 39 no fueron encontradas en otras librerías de *P. brasiliensis* y que, por lo tanto, parecen ser específicas de la transición de conidia a levadura, ya que no habían sido descritas previamente en otras librerías obtenidas a partir de este hongo (García AM, *et al.* En prensa, Medical Mycology).

De esta manera, en este trabajo se describe la cinética de la germinación de conidia a micelio, así como la construcción y análisis de una librería EST obtenida a partir del ARNm extraído a las 96 horas de tal proceso de germinación.

Materiales y métodos

Aislamiento de *P. brasiliensis* y mantenimiento del hongo

Se utilizó la cepa de *P. brasiliensis* ATCC N°60855, depositada en la *American Type Culture Collection*, provenientes de la colección de la Corporación para Investigaciones Biológicas, la cual es productora de conidias (20). La cepa fue mantenida en su fase micelial en medio sólido

Mycosel® (BD, Sparks, MD USA) y en medio sintético McVeight Morton modificado (SMVM) (21) a 18°C por dos a tres semanas.

Producción y purificación de conidias de *P. brasiliensis*

Para la producción de las conidias se utilizó el protocolo previamente descrito por Restrepo *et al.* (20) en el cual la cepa es mantenida en su fase de micelio en medio sólido para hongos SMVM (21) a 18°C durante dos a tres semanas para, posteriormente, transferir el correspondiente crecimiento de micelios a medio SMVM líquido e incubarlo a 18°C en agitación constante (150 rpm) por dos semanas. El crecimiento obtenido era homogenizado por licuado (*Waring blender*) y transferido a medios de cultivo pobres en carbohidratos (agar agua), con incubación a 18°C por un período mínimo de tres meses, tiempo necesario para la esporulación del hongo (20).

Para la obtención de las conidias, se usó la estrategia de purificación con lana de vidrio, la cual fue utilizada, tanto para realizar la cinética de la germinación como para obtener el ARNm destinado a la construcción de las librerías.

Para la purificación con lana de vidrio, se lavaron las cajas con solución salina 0,85% más Tween 20 al 0,01%; la suspensión se transfirió a un Erlenmeyer con perlas de vidrio y se puso en agitación a 250 rpm por 45 minutos a temperatura ambiente (18°C), con el fin de fragmentar el micelio y liberar las conidias. Posteriormente, la purificación se realizó pasando la suspensión de conidias por jeringas rellenas con lana de vidrio, en la cual los rastros de micelios quedaban atrapados, obteniéndose sólo las partículas más pequeñas correspondiente a las conidias (20).

Los sedimentos obtenidos con este protocolo, se lavaron dos veces con PBS y se centrifugaron a 1.500g a 4°C por 30 minutos para, finalmente, resuspenderlos en 1 ml de PBS del correspondiente lavado con conidias. Con ellas se preparó una dilución 1:10, con la cual se hizo recuento del número de conidias en hemocitómetro y la prueba de viabilidad por la técnica de bromuro de etidio-diacetato de fluoresceína (BE-DF) (22).

Determinación de la cinética de germinación de conidia a micelio de *P. brasiliensis*

Esta cinética se realizó en microplatos de cultivo celular (Linbro® *Tissue culture multi-well plate* ICN: 7636405) con medio BHI (*Brain Heart Infusion* BD, USA), líquido con suplemento de glucosa al 1% y asparagina al 0,2%, platos que se inocularon con 25.000 conidias por pozo, con incubación a 18°C y agitación constante por 24, 48, 72 y 96 horas. En cada uno de los tiempos señalados, se realizó observación microscópica directa de los platos y se determinó la tasa de germinación basada en los cambios morfológicos descritos previamente, para evaluar la geminación con base en: i) la producción de tubo germinal, ii) la elongación de las hifas y iii) la producción de micelio (Restrepo BI, McEwen JG, Salazar ME, Restrepo A. The mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: X Congress of the International Society for Human and Animal Mycology - ISHAM; 1988. p.143-8) (6).

Obtención de ARN total

El ARN total se obtuvo después de exponer las conidias a inducción térmica de 18°C por 96 horas, rompiendo las células por maceración con nitrógeno líquido y con posterior extracción mediante la técnica del Trizol®, de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Invitrogen Life Technologies, Pasley, CA., U.S.A, Cat: 15596-026).

Amplificación de los ácidos nucleicos y obtención de ADNc

El ARN obtenido de las conidias se purificó utilizando el juego de reactivos PicoPure® (Arcturus Mountain View, CA. USA. Cat. Kit 0202). Posteriormente, a partir de este ARN total purificado, se amplificó el ARNm utilizando el juego de reactivos RiboAmp® (Arcturus, Mountain View CA, USA. Cat. Kit 0201). El ARNm así amplificado fue transcrito a ADNc utilizando Superscript® (juego de reactivos Superscript® cloning Kit-Invitrogen Life Technologies, Pasley, CA., USA, Cat. 18248-013) y siguiendo las indicaciones del fabricante.

Construcción de la librería EST

Una vez obtenido el ADNc, éste se clonó utilizando el juego de reactivos TOPO TA (Cloning® kit

for sequencing, Invitrogen, Life Technologies, Pasley, CA., USA, Cat. K450030) y siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, el material se transformó en la cepa de *Escherichia coli* DH5 α por electroporación. Las células transformadas se cultivaron en caldo de Luria sólido con 100 μ g/ml de ampicilina, IPTG (20 μ g/ml) y Xgal (100 μ g/ml), para confirmar la pérdida de la α -complementación. Las colonias blancas así obtenidas se aislaron individualmente y se cultivaron a 37°C toda la noche en placas de 96 pozos con caldo de Luria líquido más 15% de glicerol y 100 μ g/ml de ampicilina para, posteriormente, ser almacenadas a -80°C.

Secuenciación de plásmidos

Para obtener el material destinado a secuenciación, se realizó una *miniprep* en placa de 96 pozos, según el protocolo descrito por Marra et al. (23). La secuenciación de los fragmentos insertados en los plásmidos así obtenidos, se realizó utilizando Big Dye®, versión 3.0 (Applied Biosystems Foster City, California USA), con el iniciador M13R, el que se utilizó como plantilla para los plásmidos ya extraídos, llevándolos a un secuenciador automático de fluorescencia ABI 3100 (ABI PRISM®), por el Grupo de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil.

Análisis de las librerías

El análisis y ensamblaje de las secuencias de la librería EST se realizó mediante un *pipeline* programado por el Grupo de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil, mediante el cual se editaban las secuencias automáticamente, limpiándolas de las secuencias no deseadas, como son las secuencias del vector, ARNr de hongos y secuencias correspondientes a bacterias. Posteriormente, el programa agrupó las secuencias (*clustering*) para obtener las secuencias contiguas (*contigs*) y las secuencias únicas (*singlets*). El *pipeline* se construyó por medio de los programas Phrap (24) and Cap3 (25). Una vez depurada la información de las secuencias obtenidas a partir de la librería, aquéllas se evaluaron contra diferentes bases

de datos, buscando la similitud con secuencias de genes y proteínas previamente reportadas. Para este análisis se utilizaron los programas BlastN y BlastX con las bases de datos de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), EMB -Fungal EST (<http://www.ebi.ac.uk/blast2/nucleotide.html>) y la base de los EST de levaduras publicados por Goldman *et al.* (<http://143.107.203.68/pbver2/default.html>) (5).

La validez de la identidad de las secuencias se categorizó con base en el valor de E (probabilidad de error) obtenido en los resultados del Blast. Se obtuvo, también, el porcentaje de secuencias según su categoría funcional. Las categorías funcionales establecidas fueron: respuesta al estrés, señalización intracelular, metabolismo, estructura, proteína hipotética conservada y proteína hipotética. Se evaluó, además, el porcentaje de secuencias presentes en las librerías EST de Goldman y Felipe en 2003, mediante la la base de datos Fungi-EST del EMBL, con el fin de determinar aquéllas que, por no estar presentes en estas librerías, podían considerarse secuencias específicas del proceso de germinación de conidia a micelio (5,17,26).

Resultados

Cinética de la germinación

Durante el seguimiento de la cinética de la germinación, se observó que $11,7 \pm 1,2\%$ de las conidias habían producido tubos germinales o hifas cortas a las 24 horas de incubación a 18°C . Posteriormente, después de las 48 horas, la proporción de células germinadas aumentaba a $30 \pm 0,6\%$, anotándose un crecimiento paralelo en la longitud de las hifas; fue, entonces, que las primeras hifas ramificadas se hicieron evidentes, aunque en baja proporción. A las 72 horas, el $43 \pm 1,3\%$ de las conidias presentaban ya germinación, con un aumento en la presencia de hifas ramificadas. Finalmente, a las 96 horas, el $66 \pm 2,4$ de las conidias había germinado y se observaban hifas largas ramificadas (figura 1).

Construcción y análisis de la librería

A partir del ARNm de conidias cultivadas a 18°C por 96 horas, se obtuvo una librería compuesta por 198 colonias, las que se conservaron a -80°C . Después de la extracción de plásmidos, la secuenciación de los insertos y del paso de las secuencias obtenidas por el *pipeline*, se obtuvieron 129 secuencias, las cuales

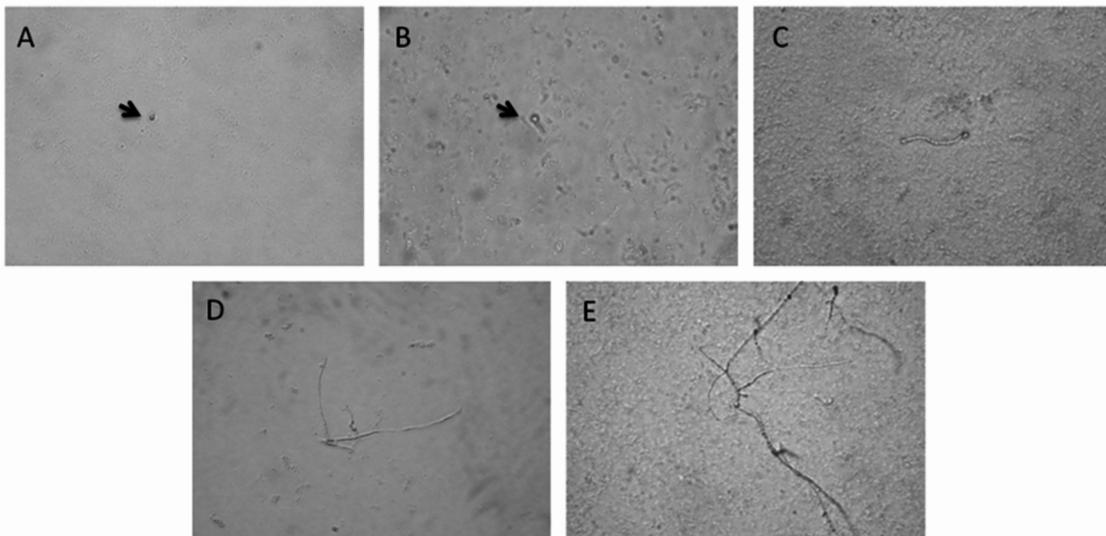


Figura 1. Diferenciación morfológica de la germinación de conidia a micelio en *P. brasiliensis* por microscopía de luz (40X). A) 0 horas de cultivo. B) 24 horas de cultivo, se observan tubos germinales. C) 48 horas de cultivo, aumento de la longitud de los tubos germinales. D y E) 72 y 96 horas de cultivo se observan hifas ramificadas.

se agruparon en siete secuencias contiguas y siete secuencias únicas, para un total de 14 posibles secuencias codificantes para proteínas relacionadas con la germinación de conidia a micelio. Durante el análisis Blast, se descartaron cuatro secuencias adicionales, dada su alta similitud con secuencias ribosómicas y mitocondriales (secuencias contiguas 1, 3 y 4), dejando 11 posibles genes, 4 secuencias contiguas y 5 secuencias únicas que correspondieron a proteína hipotética o proteína hipotética conservada (códigos de acceso en GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las características más importantes de las secuencias contiguas y las secuencias únicas se describen en el cuadro 1.

Al comparar la librería de germinación de conidia a micelio con las librerías EST obtenidas por Goldman *et al.* (5) y Felipe *et al.* (17), se encontró que 4 de las 11 posibles secuencias estaban presentes en estas librerías, 3 de ellas en la descrita por Goldman *et al.* y una en ambas (cuadro 2). Además, al comparar nuestros resultados con los obtenidos por otros investigadores, como Nunes *et al.* (6), Tavares *et al.* (27), Bailao *et al.* (28) y Bastos *et al.* (19), no fue posible encontrar similitudes en las secuencias descritas por ellos y las nuestras.

Se evidenció, asimismo, nueva información al analizar las secuencias completas reportadas en GenBank halladas por el análisis BLAST, que

poseían homología con los clones de la librería. Este análisis se hizo nuevamente por BLAST en el NCBI. De esta manera, la proteína hipotética de *Podospora anserina* correspondiente al *contig* 02, presentó similitud con una proteína RcaA de respuesta al daño del ADN (*DNA damage response protein RcaA*), la proteína hipotética de *Aspergillus nidulans* correspondiente al *contig* 06 presentó una similitud significativa con una proteína putativa formadora de filamentos, Tpr/p270 (*Filament-forming protein putative, Tpr/p270*) y la proteína hipotética conservada de *Aspergillus fumigatus* correspondiente al *singlet* 02 presentó gran similitud con la proteína ribosómica S15 (cuadro 3)

Discusión

La transición de conidia a levadura ha sido bien documentada por diversos autores; no así el proceso de germinación de conidia a micelio que sólo fue estudiado por Restrepo *et al.* (Restrepo BI, McEwen JG, Salazar ME, Restrepo A. The mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: X Congress of the International Society for Human and Animal Mycology - ISHAM; 1988. p. 143-8) al describirlo por primera vez. Los resultados de este primer estudio se correlacionan adecuadamente con los obtenidos en este documento, en el cual se presentaron tiempos similares de evolución a los descritos previamente.

Cuadro 1. Caracterización de las secuencias expresadas durante la germinación de conidia a micelio en *P. brasiliensis*.

Conglomerado	Función	Posible proteína	Análisis BLAST			
			Organismo	I	E	BLAST
Contig 02	Desconocida	PHC	<i>Podospora anserina</i>	39	4e-06	X
Contig 05	Desconocida	PHC	<i>Kluyveromyces lactis</i>	100	3e-22	X
Contig 06	Desconocida	PHC	<i>Aspergillus nidulans</i>	39	2e-21	X
Contig 07	Desconocida	PH	-	-	-	-
Singlet 01	Desconocida	PH	-	-	-	-
Singlet 02	Desconocida	PHC	<i>Aspergillus fumigatus</i>	72	1e-03	X
Singlet 03	Desconocida	PH	-	-	-	-
Singlet 04	Desconocida	PH	-	-	-	-
Singlet 05	Desconocida	PH	-	-	-	-
Singlet 06	Desconocida	PH	-	-	-	-
Singlet 07	Desconocida	PH	-	-	-	-

I: porcentaje de identidad; E: probabilidad de error; PHC: proteína hipotética; PH: proteína hipotética conservada. La caracterización de las secuencias se realizó usando el análisis BLAST en la base de datos nr en el NCBI del GeneBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Cuadro 2. Secuencias de la librería de *P. brasiliensis* durante el proceso de germinación de conidia a micelio que comparten similitud con las descritas en las bibliotecas de micelios y levadura descritas por Goldman *et al.* en 2003 y Felipe *et al.* en 2003.

Conglomerado	Función	Posible proteína	BLAST en EMBL- Fungi EST		
			I	E	Biblioteca en la que se identificó
Singlet 06	Desconocida	PH	93	8.5e-20	Goldman, 2003
Singlet 07	Desconocida	PH	97	6.7e-30	Goldman, 2003
Singlet 02	Desconocida	PHC	95	3.4e-51	Goldman, 2003
Singlet 05	Desconocida	PH	98	8.5e-28	Goldman, 2003
			96	1.3e-26	Felipe, 2003

I: porcentaje de identidad; E: probabilidad de error; PHC: proteína hipotética; PH: proteína hipotética conservada. La caracterización de las secuencias se realizó usando el análisis BLAST en la base de datos "Fungi-EST data bases" del EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/blast2/nucleotide.html>).

Cuadro 3. Secuencias informativas de la librería de *P. brasiliensis* durante el proceso de germinación de conidia a micelio.

Conglomerado	Función	Posible proteína	Análisis BLAST		
			Organismo	I	E
PCH de <i>Podospora anserina</i> (Contig 02)	Ciclo celular	Proteína de respuesta al daño RcaA	<i>Neosartorya fischeri</i>	48	1e-165
PHC de <i>Aspergillus nidulans</i> (Contig 06)	Estructural	Proteína formadora de filamentos-(Tpr/p270), putativa	<i>Neosartorya fischeri</i>	64	0.0
PHC de <i>Aspergillus fumigatus</i> (Singlet 02)	Síntesis proteica	Proteína ribosómica S15, putativa	<i>Neosartorya fischeri</i>	54	3e-60

I: porcentaje de identidad; E: probabilidad de error. La caracterización de las secuencias se realizó usando el análisis BLAST en la base de datos nr en el NCBI del GeneBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

El fenómeno de transición de levadura a micelio también se ha estudiado pero, al igual que en el caso de la germinación de conidia a micelio, no tan exhaustivamente. Se han descrito algunas características de este proceso en el cual, a las 48 horas, 50% a 60% de las levaduras han producido ya tubos germinales o primordios de hifas, señal clara del cambio morfológico (5-7,29). Esta transición ocurre de una manera más rápida a lo observado en la de conidia a micelio, en donde sólo se logra un 66% de germinación a las 96 horas.

Con respecto a los genes que estuvieran relacionados con el proceso de germinación de conidia a micelio, nada se ha descrito hasta el momento, ya que el interés siempre se ha centrado en la expresión de genes durante la transición de conidia a levadura, dada su importancia en el proceso patogénico, mientras que los mecanismos relacionados con la permanencia

del hongo en la naturaleza se encuentran sin estudiar. Ésta es la primera vez que se describen secuencias génicas posiblemente relacionadas con el proceso de germinación de conidia a micelio en *P. brasiliensis*.

De las secuencias descritas en esta librería, tres se encontraban presentes en la de levaduras descrita por Goldman *et al.* (5) y una estaba presente en las de Felipe *et al.* (17) y Goldman *et al.* (5), lo que demuestra su participación en los estadios morfológicos de micelio, de levadura o de ambos. Las siete secuencias restantes no habían sido descritas anteriormente, por lo cual pueden considerarse como secuencias específicas del proceso de germinación de conidia a micelio. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que estas secuencias podrían corresponder a regiones génicas diferentes ya descritas, pero que no detectan secuencias similares dentro las librerías EST dada su naturaleza, ya que las EST

corresponden, usualmente, sólo a secuencias parciales de los genes, hecho que debe ser verificado con análisis adicionales.

Además, cuatro secuencias se clasificaron como proteínas hipotéticas conservadas (posibles proteínas descritas en otros organismos, pero de función desconocida) y siete fueron proteínas hipotéticas (no descritas previamente en otros organismos). Asimismo, no se encontró ninguna similitud entre estos resultados y los obtenidos en otros estudios (6, 19,27,28).

Un análisis posterior de estos genes mostró algunos dominios que confieren función conocida a tres de las secuencias halladas. El *contig* 02 presentó dominios con homología con una proteína RcaA, de respuesta al daño del ADN (*DNA damage response protein-RcaA*). Esta proteína ha sido descrita en *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *Neosartorya fischeri* (30) y *Pyrenophora tritici-repentis* (<http://kr.expasy.org/uniprot/B2WAW4>). En levaduras, las proteínas que regulan la respuesta al daño del ADN, tal como lo hace RcaA, también se necesitan para mantener la longitud de los telómeros, cumpliendo así funciones protectoras para la integridad del ADN (31). Su implicación en el proceso de germinación no es claro, por lo que serían necesarios nuevos estudios para definir su importancia.

El *contig* 06 presentó importante similitud con una proteína putativa formadora de filamentos, *Tpr/p270* (*filament-forming protein putative, Tpr/p270*). Esta proteína ha sido descrita en *A. clavatus*, *A. fumigatus* y *N. fischeri* (<http://kr.expasy.org/cgi-bin/sprot-search-de?%22Filamentforming%20protein%20putative%20Tpr%2Fp270%22>). Ésta hace parte de los poros de la membrana nuclear y parece estar involucrada de diversas maneras con el ensamblaje nuclear, la importación y el transporte de proteínas del citoplasma al núcleo (32). Su función como transportadora de proteínas del citoplasma al núcleo puede reflejar la fase final de los procesos de transducción de señales, en los que los factores de transcripción se encargan de llevar a la expresión de nuevas proteínas necesarias para el cambio morfológico que representa la germinación.

El *singlet* 02, además de haber sido descrito por Goldman *et al.* (5) en su librería de levaduras, presentó gran similitud con la proteína ribosómica S15. La proteína S15 es un componente característico de los ribosomas de eucariotas 80S y se ubica en la subunidad 40, muy cerca del sitio donde se posiciona el codón del ARNm durante la traducción, lo que señala una interacción directa en este proceso (33). Esta proteína se ha descrito en *Ajellomyces capsulata*, *Botryotinia fuckeliana*, *Chaetomium globosum* y *Magnaporthe grisea* (<http://kr.expasy.org/cgi-bin/sprot-search-de?ribosomal%20S15%20fungus>), y tiene una función básica, ya que está presente en todos los estadios de desarrollo durante la síntesis proteica. Sin embargo, puede tener una mayor expresión durante la geminación, al ser inducida por la presión del cambio morfológico que lleva a la creación de nuevas estructuras.

Aunque éste es el primer estudio que reporta genes relacionados con la germinación de conidia a micelio, la información obtenida es limitada por diversas causas. Una de ellas es el tiempo requerido para la producción de las conidias del hongo, proceso que toma un mínimo de tres meses; además, el número de conidias obtenidas durante este proceso es limitado y, en el mejor de los casos, no supera los cuatro a cinco millones por caja. Otra es el gran número de conidias que se necesitan para obtener cantidades adecuadas del ARN destinado a la construcción de las librerías (no menos de 250 millones de conidias). Además, debe tenerse en cuenta que las conidias son propágulas en estado de reposo, con un metabolismo basal caracterizado por mínima expresión génica, posible causa de la poca obtención de ARN. Además, el bajo número de clones y posibles genes, bien pudieran representar aquellos genes que son específicos y están involucrados en el proceso de germinación. Sin embargo, es muy posible que esta librería no represente todas las funciones celulares involucradas en tal proceso, siendo mucho lo que falta por conocer de él.

De esta manera, se hace necesario el desarrollo de nuevos estudios en busca de otros genes relacionados con tal proceso, tales como la

construcción de nuevas librerías y la continuación del estudio de los genes hallados en este trabajo, incluyendo la valoración de la expresión de dichos genes en los diferentes estadios morfológicos, así como la evaluación de su función utilizando sistemas de ARN de interferencia (ARNi) o ARN antisentido que regulen en el hongo la expresión de estos genes.

Agradecimientos

A todos en la Corporación para Investigaciones Biológicas que, de alguna manera, colaboraron en este trabajo. A Gustavo Goldman y a su grupo de trabajo del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil, por su colaboración en la secuenciación y análisis de la librería.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Financiación

Este trabajo fue financiado por Colciencias, proyecto aprobado No. 415 22130412669 con contrato No. 476-2002, y por el Centro para Investigación y Desarrollo-CIDI de la Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, registro 7918. Ana María García recibió apoyo del Programa de Apoyo a Doctorados Nacionales de Colciencias y de la Asociación Colombiana de Infectología, Capítulo de Antioquia.

Referencias

1. **Brummer E, Castaneda E, Restrepo A.** Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev.* 1993;6:89-117.
2. **Restrepo A, Tobon AM.** Chapter 266. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Mandell GL, Bennetts JE, Dollin, R, editors. Principles and practice of infectious diseases. 6th edition. Philadelphia, P.A: Elsevier; 2005. p. 3062-8.
3. **Camilo J, Tabares AM, Gómez BL, Aristizábal BE, Cock AM, Restrepo A.** The oral route in the pathogenesis of paracoccidioidomycosis: an experimental study in BALB/c mice infected with *P. brasiliensis* conidia. *Mycopathologia.* 2001;151:57-62.
4. **McEwen JG, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A.** Effect of murine polymorphonuclear leukocytes on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 1987;36:603-8.
5. **Goldman GH, dos Reis E, Duarte DC, de Souza LA, Quiapin AC, Vitorelli PM, et al.** Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryot Cell.* 2003;2:34-48.
6. **Nunes LR, Costa de Oliveira R, Leite DB, da Silva VS, dos Reis E, da Silva ME, et al.** Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot Cell.* 2005;4:2115-28.
7. **Queiroz-Telles F.** *Paracoccidioides brasiliensis: Ultrastructural findings*. In: Franco LC, Restrepo A, Del Negro G, editors. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, FL: CRC Press; 1994. p. 27-48.
8. **Salazar ME, Restrepo A.** Morphogenesis of the mycelium-to-yeast transformation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia.* 1985;23:7-11.
9. **Aristizábal BH, Clemons KV, Stevens DA, Restrepo A.** Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females. *Infect Immun.* 1998;66:5587-91.
10. **Cock AM, Cano LE, Vélez D, Aristizábal BH, Trujillo J, Restrepo A.** Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable *Paracoccidioides brasiliensis* propagules. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2000;42:59-66.
11. **McEwen JG, Bedoya V, Patino MM, Salazar ME, Restrepo A.** Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol.* 1987;25:165-75.
12. **Cano LE, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A.** An evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitation of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol.* 1986;24:467-75.
13. **Cano LE, Gómez B, Brummer E, Restrepo A, Stevens DA.** Inhibitory effect of deferoxamine or macrophage activation on transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia ingested by macrophages: reversal by holotransferrin. *Infect Immun.* 1994;62:1494-6.
14. **González A, Aristizábal BH, Gómez EC, Restrepo A, Cano LE.** Short report: Inhibition by tumor necrosis factor-alpha-activated macrophages of the transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells through a mechanism independent of nitric oxide. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71:828-30.
15. **González A, de Gregori W, Vélez D, Restrepo A, Cano LE.** Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect Immun.* 2000;68:2546-52.
16. **Restrepo BI, McEwen JG, Salazar ME, Restrepo A.** Morphological development of the conidia produced by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *J Med Vet Mycol.* 1986;24:337-9.

17. **Felipe MS, Andrade RV, Petrofeza SS, Maranhao AQ, Torres FA, Albuquerque P, et al.** Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast*. 2003;20:263-71.
18. **Felipe MS, Torres FA, Maranhao AQ, Silva-Pereira I, Pocas-Fonseca MJ, Campos EG, et al.** Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;45:369-81.
19. **Bastos KP, Bailao AM, Borges CL, Faria FP, Felipe MS, Silva MG, et al.** The transcriptome analysis of early morphogenesis in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelium reveals novel and induced genes potentially associated to the dimorphic process. *BMC Microbiol*. 007;7:29.
20. **Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Patiño MM.** A technique to collect and dislodge conidia produced by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *J Med Vet Mycol*. 1986;24:247-50.
21. **Restrepo A, Jiménez BE.** Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *J Clin Microbiol*. 1980;12:279-81.
22. **Calich VL, Purchio A, Paula CR.** A new fluorescent viability test for fungi cells. *Mycopathologia*. 1979;66:175-7.
23. **Marra MA, Kucaba TA, Hillier LW, Waterston RH.** High-throughput plasmid DNA purification for 3 cents per sample. *Nucleic Acids Res*. 1999;27:e37.
24. **Ewing B, Green P.** Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res*. 1998;8:186-94.
25. **Huang X, Madan A.** CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res*. 1999;9:868-77.
26. **White O, Kerlavage AR.** TDB: new databases for biological discovery. *Methods Enzymol*. 1996;266:27-40.
27. **Tavares AH, Silva SS, Dantas A, Campos EG, Andrade RV, Maranhao AQ, et al.** Early transcriptional response of *Paracoccidioides brasiliensis* upon internalization by murine macrophages. *Microbes Infect*. 2007;9:583-90.
28. **Bailao AM, Shrank A, Borges CL, Parente JA, Dutra V, Felipe MS, et al.** The transcriptional profile of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells is influenced by human plasma. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007;51:43-57.
29. **Ramírez JR.** *Paracoccidioides brasiliensis*: conversion of yeastlike forms into mycelia in submerged culture. *J Bacteriol*. 1971;105:523-6.
30. **Fedorova ND, Khaldi N, Joardar VS, Maiti R, Amedeo P, Anderson MJ, et al.** Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet*. 2008;4:e1000046.
31. **Hand RA, Jia N, Bard M, Craven RJ.** Saccharomyces cerevisiae Dap1p, a novel DNA damage response protein related to the mammalian membrane-associated progesterone receptor. *Eukaryot Cell*. 2003;2:306-17.
32. **Gant TM, Wilson KL.** Nuclear assembly. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1997;13:669-95.
33. **Tranque P, Hu MC, Edelman GM, Mauro VP.** rRNA complementarity within mRNAs: a possible basis for mRNA-ribosome interactions and translational control. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:12238-43.

ARTÍCULO ORIGINAL

Caracterización preliminar de los sitios de cría de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) en el municipio de Leticia, Amazonas, Colombia

José Joaquín Carvajal¹, Ligia Inés Moncada², Mauricio Humberto Rodríguez³, Ligia del Pilar Pérez⁴, Víctor Alberto Olano⁵

¹ Maestría en Estudios Amazónicos, Universidad Nacional de Colombia, Leticia, Colombia

² Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

³ The Manhiça Health Research Center, Maputo, Mozambique, África

⁴ Secretaría de Salud Departamental del Amazonas, Leticia, Colombia

⁵ Grupo de Entomología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. Dada la importancia de *Aedes albopictus* en la salud pública, es necesario caracterizar los criaderos para establecer medidas de control.

Objetivo. Caracterizar en función de los parámetros físico-químicos y grupos de organismos presentes, los criaderos de los estadios inmaduros de *Ae. albopictus* en Leticia, Amazonas.

Materiales y métodos. Se inspeccionaron 154 viviendas en el área urbana en diciembre 2002 y enero 2003, para buscar criaderos de *Ae. albopictus* y otros dípteros con estadios acuáticos inmaduros. En los criaderos con resultados positivos se tomaron datos físico-químicos cualitativos y cuantitativos: exposición al sol, ubicación, tamaño, material, conductividad, turbidez, oxígeno disuelto, temperatura y presencia de macroinvertebrados y plancton. Los resultados se compararon mediante análisis descriptivos, análisis de componentes principales, dendrogramas de clasificación e índices de diversidad.

Resultados. Se encontraron 21 criaderos con larvas de dípteros, 13 con *Ae. albopictus*; 92% de ellos estaban ubicados en el peridomicilio, en recipientes pequeños o medianos, dispuestos en la sombra, con baja turbidez y conductividad, bajos índices de diversidad para macroinvertebrados y altos para organismos productores de plancton. En el análisis de componentes principales, se encontró correlación significativa con ácaros, oligoquetos y hemípteros (macroinvertebrados), y con bacilarofíceas, clorofíceas y cianofíceas (plancton). En presencia de otros culícidos, las larvas de *Ae. albopictus* fueron escasas.

Conclusión. En este estudio se encontró que las hembras de *Ae. albopictus* depositan sus huevos en depósitos de agua recién establecidos con disponibilidad suficiente de recurso, baja conductividad y turbidez, y menor competencia intraespecífica e interespecífica.

Palabras clave: *Aedes*, vectores de enfermedades, control vectorial, plancton, Colombia.

Characterization of *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera:Culicidae) larval habitats near the Amazon River in Colombia

Introduction. Because the role of *Aedes albopictus* as an incriminated vector of several viral pathogens, its control is important to human health. To establish appropriate control methods, characterization of the larval habitats is a necessary first step.

Objective. Habitats of the immature stages of *Ae. albopictus* were characterized with respect to physical-chemical parameters and by floral and faunal arrays present.

Materials and methods. Leticia is located at the southernmost tip of Colombia on the banks of the Amazon River. In the urban area, 154 houses were inspected in December 2002 and January 2003. Physical-chemical data were collected, including exposure to sunlight, location, container size and material, water conductivity, and dissolved oxygen. Macroinvertebrates and plankton samples were taken at each positive larval site. The results were compared using descriptive analysis, principal component analysis, classification dendrograms, and diversity indexes.

Results. Twenty-one habitats were found positive for Diptera, and 13 were positive for *Ae. albopictus* larvae. Most of the positive habitats (92%) were located near the houses--they were small or medium size receptacles located in the shade. This water generally had low conductivity and low turbidity, although high values of these parameters were also identified. The habitats had low diversity indexes for macroinvertebrates and high diversity indexes for plankton. In the principal component analysis, significant correlation was found with mites, oligochaetes and hemipterans (the macroinvertebrates) and with bacillariophyceae, chlorophyceae and cyanophyceae (the algal forms).

Conclusion. In Leticia, females of *Ae. albopictus* were found in newly established habitats with sufficient availability of resources, low conductivity, and turbidity, lower intra-and interspecific competition.

Key words: *Aedes*, disease vectors, vector control, plankton, Colombia.

El mosquito *Aedes (Stegomyia) albopictus* fue identificado por primera vez en Suramérica en el estado de São Paulo, Brasil en 1986 (1), y en Colombia en la Leticia, Amazonas, en 1998 (2). Posteriormente, se registró en Buenaventura (Valle del Cauca) en el 2001 (3) y en el 2007 en Cali (Valle del Cauca) (4).

Este mosquito es importante en salud pública por ser vector de los diferentes serotipos del virus del dengue en el sudeste asiático (5). En las Américas, además de este virus, potencialmente podría transmitir los virus de la fiebre amarilla y de la encefalitis equina venezolana, entre otros (5,6). No obstante, hasta el presente no se le ha incriminado en la transmisión de agentes patógenos de importancia en salud pública en las Américas, aunque se han encontrado larvas de este mosquito infectadas con el virus del dengue (5-7) y adultos naturalmente infectados con el virus La Crosse (1) y el virus del oeste del Nilo (8). Méndez *et al.* (9) hicieron el primer reporte de infección natural de *Ae. albopictus* con los serotipos Den-1 y Den-2, en Colombia, de especímenes procedentes del municipio de Buenaventura, departamento del Valle del Cauca.

La presencia de *Ae. albopictus* vuelve más compleja la problemática del dengue, debido a

la dificultad de control por su rápida colonización en áreas peridomésticas, lo cual constituye una amenaza porque podría ser la unión entre los ciclos de transmisión de la fiebre amarilla selvática y urbana (5).

Como componente de la vigilancia en salud pública, el sistema de vigilancia entomológica permite determinar los cambios en la distribución geográfica de los vectores, medir las variaciones de las poblaciones de formas inmaduras y adultas, identificar áreas con alta infestación, caracterizar sus sitios de cría y detectar la introducción de especies no nativas o la urbanización de especies silvestres, conocimiento básico para la toma de decisiones con el propósito de tomar medidas de control integrado y selectivo de vectores (10).

La caracterización de los criaderos acuáticos, hábitats de *Ae. albopictus* en sus fases inmaduras, permite identificar las características bióticas y abióticas, y las interrelaciones entre ellas en un hábitat particular, brindando una visión más amplia de la dinámica e importancia de los factores que intervienen en estos ecosistemas. Este conocimiento permite el entendimiento de su comportamiento biológico desde un enfoque ecosistémico, para proponer soluciones de manejo más eficientes para su control en el área de estudio.

En el presente trabajo se caracterizaron los criaderos de *Ae. albopictus* en función de los parámetros físico-químicos y grupos de organismos presentes, en la zona urbana del municipio de Leticia (Amazonas), durante los meses de diciembre de 2002 y enero de 2003.

Correspondencia:

José Joaquín Carvajal, Maestría en Estudios Amazónicos, Universidad Nacional de Colombia, sede Leticia, Leticia, Colombia

Teléfono: (578) 592 7996, extensión: 109; fax (578) 592 7996, extensión 201.

jjcarvajalc@unal.edu.co

Recibido: 04/11/08; aceptado:31/03/09

Materiales y métodos

El área de estudio fue el casco urbano de Leticia, ciudad localizada a 04°12'55" sur y 69°56'26" oeste, con una altitud de 82 m.s.n.m. y una temperatura promedio de 27°C. Tiene una extensión de 3.695 km² y alrededor de 3.654 viviendas, con una población aproximada de 27.916 habitantes. Limita por el norte con Tarapacá, por el sur con la república de Perú, por el oeste con el municipio de Puerto Nariño y por el oriente constituye una sola área geográfica con la ciudad de Tabatinga, Brasil. El régimen de precipitación es monomodal; la temporada seca se presenta generalmente entre los meses de julio y septiembre y la lluviosa entre octubre y junio (11).

El muestreo se realizó en el período comprendido entre diciembre de 2002 y enero de 2003. Se muestrearon aleatoriamente 154 viviendas, con un error del 5% y una frecuencia esperada del índice de infestación de viviendas promedio (IIV) de 9,57% (12). Las casas muestreadas se seleccionaron aleatoriamente mediante el programa Excel 2002 de acuerdo con una numeración preestablecida de las manzanas de la localidad. Se inspeccionaron el intradomicilio, el peridomicilio y el extradomicilio, en busca de criaderos potenciales con larvas, pupas o exuvias de *Ae. albopictus* o de otros dípteros. En este trabajo, se tomó peridomicilio como el área comprendida desde el límite de la construcción hasta los 10 m y, el extradomicilio, a partir de los 10 m.

Toma de muestras

Una vez localizado el criadero, se registró el tamaño según el volumen aproximado tomando área superficial y profundidad (menos de 1 L: pequeño; de 1 a 10 L: mediano, y más de 10 L: grande), bajo los siguientes criterios: textura, material, color, ubicación en el domicilio (intradomiciliario, peridomiciliario o extradomiciliario) y el tipo de exposición al sol (directa, parcial o sombra).

Se tomó una muestra de agua de 50 ml, aproximadamente, teniendo la precaución de no agitarla, con el fin de tomar el registro de

turbidez, mediante un turbidímetro digital Hanna. Además, se tomaron registros del criadero de pH, conductividad (mS/cm), oxígeno disuelto (mg/L), temperatura del agua (°C), temperatura ambiental (°C, mediante un termómetro manual) utilizando un conductímetro YSI 30, un oxímetro YSI 55 y un pHmetro WTW 330i/SET, los cuales registraban también la temperatura del criadero.

Para tomar las muestras de agua del criadero, se utilizó un cucharón de peltre esmaltado blanco de 250 ml de capacidad y una pipeta plástica graduada con pera de caucho para los criaderos que, por su tamaño, no permitieran su medición, y así, estimar la cantidad aproximada de macroinvertebrados. La muestra se filtró en una red de poros de 0,01 cm², para recolectar las larvas del mosquito y otros macroinvertebrados asociados. Las muestras se conservaron en alcohol al 70%, en frascos de 100 ml. Los macroinvertebrados recolectados de cada muestra se trasladaron a cajas de Petri con alcohol al 70% para la determinación y cuantificación en esteroscopio Wild Heerbrugg o en microscopio Olympus CX31.

La muestra de plancton se tomó directamente y se envasó en un frasco de 100 ml, en una proporción 1:1 con *transeau* (agua destilada-alcohol etílico-formol, en proporción 6:3:1). En el laboratorio, las muestras de plancton se agitaron 50 veces, aproximadamente; se tomaron 5 ml de cada muestra y se colocaron en piscinas de sedimentación por 10 horas (2 horas/ml). Posteriormente, se identificaron y cuantificaron evaluando la abundancia por cada campo en un microscopio óptico invertido Olympus CK22 ULWCD 0.30. Para la identificación del material biológico, se utilizaron las claves de Berrios y Sielfeld (13), McAlpine *et al.* (14), Merritt y Cummins (15), Milligan (16), Peckarsky *et al.* (17), Ospina (Ospina RT. Aspectos taxonómicos Chironomidae (Diptera). En: Memorias, Seminario Invertebrados Acuáticos y su Utilización en Estudios Ambientales. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia y Sociedad Colombiana de Entomología; 1995), Thorp y Covich (18), y La Casse y Yamaguti (19).

Análisis de datos

Los individuos de cada criadero se clasificaron por morfotipos hasta familia, género o especie, cuando fue posible. Se calcularon las abundancias relativas a partir de los datos extrapolados a una medida de volumen estándar. Los criaderos se clasificaron para el análisis en cuatro tipos, según presencia o ausencia de *Ae. albopictus* y otros dípteros. Se compararon los tipos de criaderos en relación con la composición, las abundancias relativas, la diversidad mediante los índices de Shannon-Wiener (diversidad), Simpson (dominancia), de uniformidad (*equitativity*) y de riqueza de especies.

Se aplicaron dos modelos estadísticos para análisis multivariado: un análisis de conglomerados basado en distancias euclidianas y el algoritmo UPGMA (*unweighed pair group method with arithmetic mean*), y un análisis de componentes principales con base en una matriz de datos de abundancia de morfotipos para cada clase de criadero, mediante el coeficiente de correlación ρ de Pearson. Para el análisis del componente biológico, los datos se transformaron a logaritmo natural. Se utilizaron los paquetes estadísticos PAST, v1.73, Biodiversity Pro y Estimates Win800.

Resultados

En las 154 viviendas inspeccionadas se encontraron 21 criaderos con larvas de dípteros, 13 (62%) de ellos con *Ae. albopictus*. Estas larvas se distribuyeron por criadero, en la siguiente forma: A, exclusivamente con larvas de *Ae. albopictus*; AC, larvas de *Ae. albopictus* y larvas de *Chironominae* sp. y *Culex quinquefasciatus* o *Limatus durhamii*; C, larvas de *Chironominae* sp. y *Cx. quinquefasciatus* o *Li. durhamii*; y NA, exuvias de pupas o larvas de culícidos diferentes a *Ae. albopictus*. La distribución general de los criaderos según las larvas encontradas en ellos fue: 3A (14%), 10AC (48%), 5C (24%) y 3NA (14%).

El 95% de las especies se encontraron en 17 de los 21 criaderos, lo que indica que las especies encontradas se distribuyeron ampliamente en todo el municipio. El 92% de los criaderos positivos para *Ae. albopictus* estaban ubicados

en el peridomicilio, 77% eran latas y botellas, y 15%, tanques bajos y una cáscara de coco.

Parámetros físico-químicos cualitativos

En las cuatro clases de criaderos, se encontraron recipientes plásticos (23%) y metálicos (53%), principalmente inservibles, y en los criaderos A, se encontró una cáscara de coco, tanques bajos y albercas. El blanco fue el color el más frecuente. En relación con la exposición al sol, se observó que los criaderos A y AC estaban en su mayoría a la sombra o con un área muy pequeña expuesta al sol; sin embargo, se encontraron dos criaderos AC que estaban expuestos directamente a los rayos del sol. Los C tenían un área grande expuesta al sol y los NA estaban expuestos totalmente a los rayos del sol.

Parámetros físico-químicos cuantitativos

Ae. albopictus se encontró más frecuentemente en criaderos de tamaño pequeño y mediano, con oxígeno disuelto relativamente abundante, turbidez y conductividad bajas, pero toleraba baja concentración de oxígeno disuelto, y conductividad y turbidez altas (cuadro 1). En el análisis de componentes principales, los criaderos C se diferencian de los demás, principalmente, por su conductividad y volumen. La turbidez fue mayor en los criaderos AC y C (figura 1a). Además, como se muestra en el dendrograma (figura 1b), los criaderos A y AC están agrupados y cercanos, y se separan claramente de los criaderos C y NA. Los criaderos NA y A son de tamaño pequeño y se diferencian claramente en sus valores de conductividad; los A presentaron valores bajos y los NA, valores altos. En este estudio no se encontraron diferencias evidentes entre las clases de criaderos en la temperatura y el pH.

Macroinvertebrados

La especie más abundante fue *Ae. albopictus*, que se encontró en 62% de los criaderos, seguida por *Chironominae* sp. con 45,5%. En 23,8% de los criaderos estas dos especies se encontraron juntas, en 19% estaban *Ae. albopictus*, *Chironominae* sp., *Cx. quinquefasciatus* o *Li. durhamii*, en 14,2% había sólo larvas de *Ae.*

Cuadro 1. Valores máximos y mínimos de las condiciones abióticas registradas en cada tipo de criadero.

Variable	A		AC		C		NA	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
Volumen (L)	0,338	1,445	0,484	253,65	1,125	1680	2,7	24,64
T (°C) criadero	28,3	30,4	25	34,3	26,1	31,3	25,9	32,9
T ambiental (°C) registrada in situ	25	28,7	24	28,9	26,3	29,2	25,5	26,6
Saturación de O2 (%)	29	65	5,6	66,4	0,17	46,5	6,5	79,1
Oxígeno disuelto (mg/L)	2,19	5,1	0,44	4,61	0,26	3,43	0,53	5,79
Turbidez (FTU)	11	308	4	461	0	461	6	175
Conductividad mS/cm)	51,6	118,8	15,17	291,3	70,9	459	79,8	239,5
pH	7,15	8,46	6,39	8,82	5,66	7,24	6,53	7,88

A, exclusivamente con larvas de *Ae. albopictus*; AC, larvas de *Ae. albopictus* y larvas de *Chironominae* sp. y *Culex quinquefasciatus* o *Limatus durhamii*; C, larvas de *Chironominae* sp. y *Cx. quinquefasciatus* o *Li. durhamii*; y NA, exuvias de pupas o larvas de culicidos diferentes a *Ae. albopictus*.

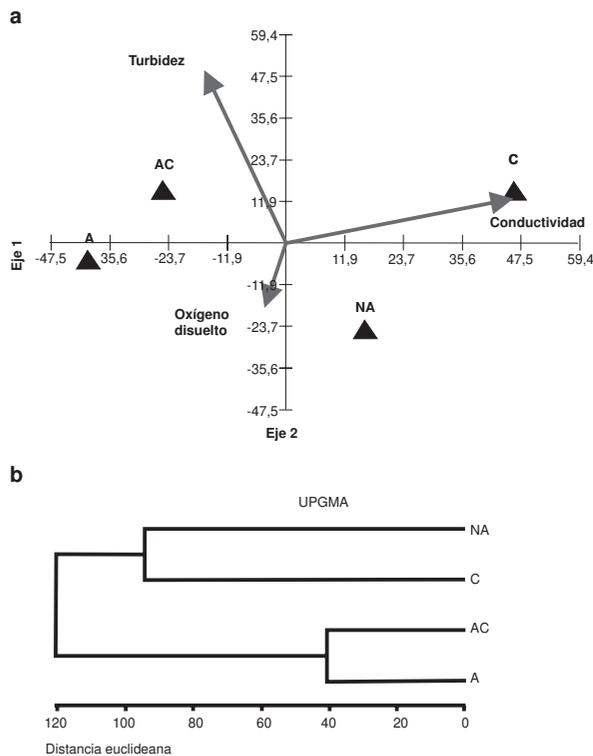


Figura 1. (a) Análisis de componentes principales a partir de parámetros físico-químicos cuantitativos. (b) Dendrograma de clasificación a partir de parámetros físico-químicos cuantitativos.

A, exclusivamente con larvas de *Ae. albopictus*; AC, larvas de *Ae. albopictus* y larvas de *Chironominae* sp. y *Culex quinquefasciatus* o *Limatus durhamii*; C, larvas de *Chironominae* sp. y *Cx. quinquefasciatus* o *Li. durhamii*; y NA, exuvias de pupas o larvas de culicidos diferentes a *Ae. albopictus*.

albopictus y en 4,8% *Ae. albopictus* se presentó junto con *Li. durhamii*. Es de anotar que *Li. durhamii* presentó la mayor abundancia cuando se asoció con larvas de *Ae. albopictus*.

En el cuadro 2 se presentan las abundancias relativas de macroinvertebrados por clases de criaderos. En los criaderos AC, se encontró la mayor riqueza de especies y la mayor abundancia la mostraron *Cx. quinquefasciatus*, *Naididae*, *Ae. albopictus* y *Chironominae* sp., respectivamente. Los criaderos NA no presentaron macroinvertebrados asociados.

Con el fin de esclarecer las estrategias de establecimiento del mosquito, se usaron índices ecológicos de diversidad que permiten visualizar de una manera más clara el papel de los morfotipos presentes en cada clase de criadero. En los criaderos A, los valores de diversidad y riqueza son bajos, lo que puede reflejar que son depósitos recién establecidos, mientras que los AC presentaban los valores mayores de riqueza, diversidad de Shannon-Wiener y uniformidad (*equitativity*), y el valor más bajo de dominancia (cuadro 3).

De acuerdo con el análisis de componentes principales, las poblaciones de *Ae. albopictus* se caracterizaron por estar correlacionadas significativamente con poblaciones de ácaros ($\rho=0,881$, $\alpha=0,05$), oligoquetos ($\rho =0,836$, $\alpha =0,05$) y hemípteros ($\rho =0,874$, $\alpha =0,05$), y no se

Cuadro 2. Abundancias relativas de macroinvertebrados presentes por tipos de criaderos.

MORFOESPECIE	A (%)	AC (%)	C (%)	
Macroinvertebrados				
Neuroptera	0	0,1	0	
Mollusca	0	0,4	2,4	
Psychodidae	0	0,6	0	
Hemiptera	1,0	0,3	0	
Coleoptera	0,7	0,9	0,5	
Collembola	0	3,5	0	
<i>Limatus durhamii</i>	0	8,0	0	
<i>Chironominae</i> sp.	0	11,1	83,7	
Acari	22,7	4,6	10,6	
<i>Ae. albopictus</i>	22,8	11,2	0	
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	0	48,0	2,8	
Naididae	52,9	11,3	0	
Total	100	100	100	
Plancton				
MORFOESPECIE	A (%)	AC (%)	C (%)	NA (%)
Copepoda	1,3	8,4	0	7,1
Rhizopoda	5,0	6,1	25,9	7,1
Bacillaryophyceae	32,7	0	0	0
Branchipoda	0	2,3	0	0
Chlorophyceae	3,8	0,0	14,8	0
Cyanophyceae	54,1	64,9	40,7	64,3
Rotifera	3,1	18,3	18,5	21,4
TOTAL	100	100	100	100

A, exclusivamente con larvas de *Ae. albopictus*; AC, larvas de *Ae. albopictus* y larvas de *Chironominae* sp. y *Culex quinquefasciatus* o *Limatus durhamii*; C, larvas de *Chironominae* sp. y *Cx. quinquefasciatus* o *Li. durhamii*; y NA, exuvias de pupas o larvas de culicidos diferentes a *Ae. albopictus*.

Cuadro 3. Índices de diversidad por clases de criaderos a partir de las abundancias relativas de macroinvertebrados.

Tipo de criadero	A	AC	C
Riqueza de especies (S)	9	17	8
Uniformidad (<i>equitvity</i>) (E)	0,53	0,61	0,34
Índice de Simpson (D _{Sp})	0,38	0,28	0,70
Índice de Shannon (H')	1,17	1,72	0,71

A, exclusivamente con larvas de *Ae. albopictus*; AC, larvas de *Ae. albopictus* y larvas de *Chironominae* sp. y *Culex quinquefasciatus* o *Limatus durhamii*; C, larvas de *Chironominae* sp. y *Cx. quinquefasciatus* o *Li. durhamii*; y NA, exuvias de pupas o larvas de culicidos diferentes a *Ae. albopictus*.

encontraron correlaciones significativas con las poblaciones de otras larvas de *Chironominae* sp. ($\rho = -0,165$, $\alpha = 0,05$), *Cx. quinquefasciatus* ($\rho = 0,093$, $\alpha = 0,05$) y *Li. durhamii* ($\rho = -0,016$, $\alpha = 0,05$) (figura 2a). Los criaderos AC se relacionaron más con depósitos de alta diversidad y riqueza de especies que los criaderos C, en los que

habían moluscos y colémbolos en los márgenes del criadero como raspadores y recolectores (figura 2b).

Los criaderos C presentaron los valores más altos de dominancia, por la presencia de poblaciones de *Chironominae* sp. (cuadro 3), pero no hubo una composición de macroinvertebrados que definiera esta clase de criaderos, como lo revela el valor de uniformidad (*equitvity*). El dendrograma de clasificación en la figura 2b muestra las agrupaciones existentes entre los criaderos con larvas de *Ae. albopictus* y el componente de macroinvertebrados. Asimismo, los criaderos NA que no presentaron macroinvertebrados están más relacionados con los criaderos C.

Plancton

Entre los organismos registrados en los criaderos con *Ae. albopictus*, se encontraron correlaciones significativas con bacilarofíceas ($\rho = 0,888$,

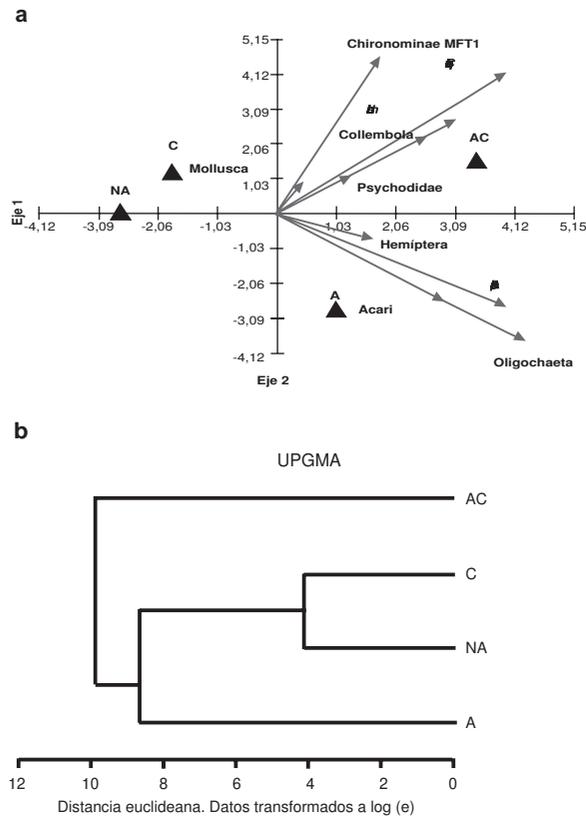


Figura 2. (a) Análisis de componentes principales a partir de la composición de macroinvertebrados presentes por clases de criaderos (el 99,1 % de la variación es explicada en los dos primeros componentes). (b) Dendrograma de clasificación a partir de la composición de macroinvertebrados presentes por clases de criaderos.

A, exclusivamente con larvas de *Ae. albopictus*; AC, larvas de *Ae. albopictus* y larvas de *Chironominae* sp. y *Culex quinquefasciatus* o *Limatus durhamii*; C, larvas de *Chironominae* sp. y *Cx. quinquefasciatus* o *Li. durhamii*; y NA, exuvias de pupas o larvas de culícidos diferentes a *Ae. albopictus*.

Cuadro 4. Índices de diversidad por clases de criaderos a partir de las abundancias relativas del plancton.

Tipo de criadero	A	AC	C	NA
Riqueza de especies (S)	14	9	6	9
Uniformidad (<i>equitivy</i>) (E)	0,77	0,75	0,91	0,92
Índice de Simpson (D _{Sp})	0,16	0,27	0,21	0,14

A, exclusivamente con larvas de *Ae. albopictus*; AC, larvas de *Ae. albopictus* y larvas de *Chironominae* sp. y *Culex quinquefasciatus* o *Limatus durhamii*; C, larvas de *Chironominae* sp. y *Cx. quinquefasciatus* o *Li. durhamii*; y NA, exuvias de pupas o larvas de culícidos diferentes a *Ae. albopictus*.

$\alpha=0,06$), clorofíceas ($\rho =0,539$, $\alpha=0,05$) y cianofíceas ($\rho =0,487$, $\alpha=0,05$). La presencia de hojarasca en los criaderos AC aumenta la disponibilidad de alimento e incrementa las poblaciones de trozadores, filtradores, detritívoros y predadores, representados principalmente por poblaciones de rotíferos y copépodos. En los criaderos NA se presentó la proporción más alta de tecamebas (rizópodos), que son indicadores de aguas muy eutróficas.

En el cuadro 2 se muestran las abundancias relativas de plancton por clases de criaderos, donde las cianofíceas fueron las más abundantes en todos los criaderos. En el cuadro 4 se muestran los valores de riqueza, uniformidad (*equitivy*) y los índices de dominancia de Simpson y de diversidad de Shannon-Wiener; en los criaderos positivos para *Ae. albopictus*, hay mayor riqueza de especies y menor índice de uniformidad, característicos de los criaderos recién establecidos, en los que la cantidad de individuos y la presencia de especies productoras fue mayor. Debido a la competencia por espacio y recursos, aumenta la tasa de extinción en el hábitat, en los criaderos AC y C. Los valores de dominancia en todos los criaderos fueron bajos, debido principalmente a que la mayoría de sus componentes fueron productores.

Según el análisis de componentes principales, los criaderos A se caracterizaron por presentar abundancia en poblaciones de cianofíceas, otros organismos productores y diatomeas (bacillarofíceas), que no toleran niveles altos de nutrientes, lo cual puede ser sustentado por los bajos valores de conductividad registrados. Los criaderos AC se relacionaron con poblaciones de consumidores primarios y secundarios, como son rotíferos, copépodos y cladóceros (figura 3a). En el dendrograma de clasificación se observa la agrupación de los criaderos C y NA, separado de los criaderos AC y, por último, de los criaderos A (figura 3b).

Discusión

Al igual que lo reportado por otros autores en diferentes partes del mundo, los criaderos de *Ae. albopictus* en Leticia se encontraron más frecuentemente en el peridomicilio (20), eran

de tamaño mediano o pequeño, de plástico o metal (21,22) y presentaban conductividad baja; estos valores dan un indicio de que los criaderos tienen una productividad y una diversidad altas, debido a las altas concentraciones de oxígeno disuelto y la baja toxicidad. Por otra parte, aunque la turbidez promedio fue baja, se registraron criaderos con valores más altos a los que se han reportado en otros estudios (23). La mayoría estaban a la sombra o parcialmente expuestos al sol (24), pero dos de ellos que eran de clase AC tenían exposición directa al sol (25,26). Esta preferencia se puede explicar porque, a pesar de que los huevos de *Ae. albopictus* son resistentes a la desecación, es probable que en los criaderos pequeños y

metálicos la temperatura se incremente a niveles que impidan la supervivencia y el desarrollo de las larvas; además, la densidad aumenta al disminuir el agua y, por ende, hay un incremento en la competencia por recurso y una mayor depredación (27-29).

La supervivencia de las larvas se puede afectar también por sustancias disueltas que se encuentren en el agua lluvia, por metabolitos tóxicos de organismos en los depósitos o por algas presentes en el criadero (30-32), pero para la supervivencia de *Ae. albopictus* en un criadero el factor más importante parece ser la ausencia de competidores y depredadores. Por otro lado, la presencia de oligoquetos (naididos) en los criaderos A, es un indicador de la abundancia y diversidad de especies productoras y la baja presencia de consumidores, como depredadores, raspadores o recolectores, característicos de ambientes acuáticos más complejos y con mayor tiempo de establecimiento (31). En los criaderos NA hubo una escasa abundancia de consumidores, como rotíferos y copépodos, que puede estar relacionada con la poca materia en partículas, pero, se encontraron tecamebas (rizópodos), las cuales pueden presentarse por el aumento de bacterias.

Los parámetros bióticos y abióticos hallados muestran que las larvas de *Ae. albopictus* colonizan aguas recién estancadas, donde la competencia interespecífica no es alta y hay suficiente disponibilidad de recurso. A medida de que los criaderos se vuelven eutróficos, lo cual se refleja con la disminución del oxígeno disuelto, se establecen otras poblaciones de dípteros, lo que origina los criaderos AC, y la abundancia de larvas de *Ae. albopictus* disminuye. Esta preferencia de colonización por aguas recién estancadas es una ventaja potencial sobre las poblaciones de otros culicidos que se instauren posteriormente, porque pueden explotar los recursos de alimento y no ser afectadas por la contaminación del medio (33,34).

Al excluir el volumen del criadero entre las variables por correlacionar, los criaderos AC y A se relacionaron más estrechamente que los criaderos C y NA. La separación entre los

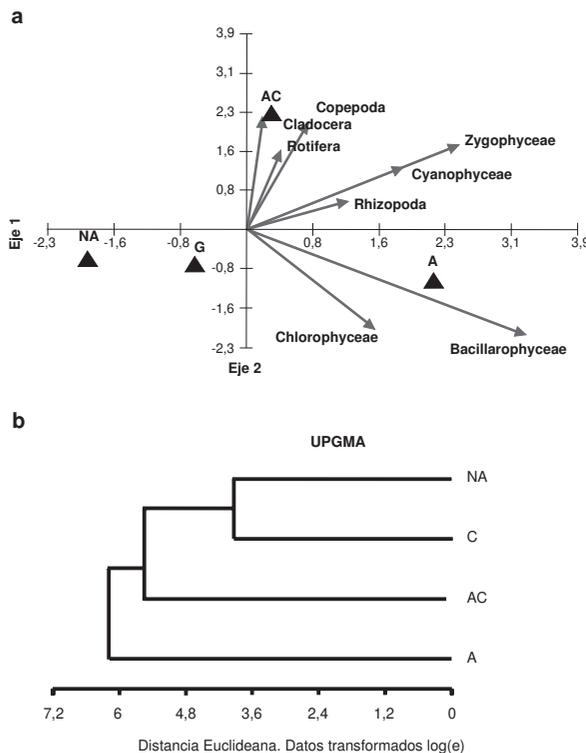


Figura 3. (a) Análisis de componentes principales a partir de la composición de plancton presente por clases de criaderos. (b) Dendrograma de clasificación a partir de la composición de plancton presente. A, exclusivamente con larvas de *Ae. albopictus*; AC, larvas de *Ae. albopictus* y larvas de *Chironominae* sp. y *Culex quinquefasciatus* o *Limatus durhamii*; C, larvas de *Chironominae* sp. y *Cx. quinquefasciatus* o *Li. durhamii*; y NA, exhuvias de pupas o larvas de culicidos diferentes a *Ae. albopictus*.

criaderos C y NA puede deberse a que estos tienen un mayor tiempo de establecimiento y, por tanto, mayor eutrofización.

Entonces, la posible sucesión de las poblaciones presentes en los criaderos la podemos definir así: las poblaciones de *Ae. albopictus* colonizan los depósitos recién establecidos, este hecho se correlaciona con los valores altos de índice de infestación de depósitos en las épocas de mayor pluviosidad (12); posteriormente, se establecen quironómidos y otros culícidos, que generan competencia por recursos, la presencia de predadores o sustancias y plancton tóxicos en el criadero, las cuales posiblemente reducen las poblaciones de *Ae. albopictus* hasta que desaparecen.

Sin embargo, al analizar los criaderos por los morfotipos presentes para determinar el nivel de competencia, se encontró que, en presencia de quironómidos, las poblaciones de *Ae. albopictus* no se redujeron considerablemente, lo que significa que el recurso por el que compiten posiblemente no es el mismo, mientras que, en presencia de larvas de otros culícidos, las de *Ae. albopictus* no fueron abundantes, posiblemente por competencia o por depredación, ya que las larvas de *Li. durhami*, especies de las familias Veliidae y Gerridae y algunos copépodos se han reportado como depredadores y, las larvas de ácaros, como parásitos de *Ae. albopictus* (35-38).

Uno de los modelos que se puede aplicar a este tipo de hábitats acuáticos con poblaciones locales conectadas entre sí por eventos de migración, es la "teoría de la dinámica de las metapoblaciones". Una metapoblación, por lo tanto, puede definirse como una "población de poblaciones": un grupo de poblaciones locales conectadas por migraciones, en las que los principales procesos de población involucrados son las migraciones, las colonizaciones y las extinciones (39).

En Leticia, las poblaciones locales se conectarían a través de la dispersión de un pequeño número de hembras migrantes que colonizan nuevos hábitats en depósitos recién establecidos o se juntan con poblaciones preexistentes. Además,

en este modelo la estructura espacial es importante por la discontinuidad que existe entre ellos, ya que diferentes grupos de individuos de la misma especie pueden crecer en unidades de hábitat aisladas y, por lo tanto, las dinámicas de población son casi independientes. Entonces, la persistencia de una metapoblación, a largo plazo, depende de la existencia de varias poblaciones relativamente próximas, que garanticen el flujo de individuos y la disponibilidad de hábitats. Sin embargo, para corroborar esta hipótesis se necesitan nuevos estudios.

Agradecimientos

A la Secretaría de Salud Departamental del Amazonas, a la Universidad Nacional de Colombia y a la población de Leticia, por su apoyo para la realización de este estudio.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no existe conflicto de intereses sobre los resultados presentados en este artículo.

Financiación

Este trabajo lo financiaron la Universidad Nacional de Colombia y la Secretaría de Salud Departamental del Amazonas.

Referencias

1. **Forattini OP.** Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* no Brasil. Rev Saúde Pública. 1986;20:244-5.
2. **Vélez ID, Quiñones M, Suárez M, Olano V, Murcia LM, Correa E, et al.** Presencia de *Aedes albopictus* en Leticia, Amazonas, Colombia. Biomédica. 1998;18:192-8.
3. **Suárez M.** *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera, Culicidae) en Buenaventura, Colombia. Inf Quinc Epidemiol Nac. 2001;6:221-4.
4. **Cuéllar-Jiménez ME, Velásquez-Escobar OL, González-Obando R, Morales-Reichman CA.** Detección de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) en la ciudad de Cali, Valle del Cauca, Colombia. Biomédica. 2007;27:273-9.
5. **Gratz NG.** Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. Med Vet Entomol. 2004;18:215-27.
6. **Serufo JC, Montes de Oca HM, Tavares VA, Souza AM, Rosa RV, Jamal MC, et al.** Isolation of dengue virus type 1 from larvae of *Aedes albopictus* in Campos Altos City, State of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1993;83:503-4.

7. **Ibañez-Bernal S, Briceño B, Mutebi SP, Argot E, Rodríguez G, Martínez-Campos C, et al.** First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, México. *Med Vet Entomol.* 1997;11:305-9.
8. **Holick J, Kile A, Ferraro W, Delaney R, Iwaseczko M.** Discovery of *Aedes albopictus* infected with West Nile Virus in Southeastern Pennsylvania. *J Am Mosq Control Assoc.* 2002;18:131.
9. **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.
10. **Olano V.** Vigilancia entomológica: un componente en salud pública. *Inf Quinc Epidemiol Nac.* 1999;4:273-4.
11. **Instituto Geográfico Agustín Codazzi.** Atlas Básico de Colombia. Bogotá, D.C.; División de Difusión Geográfica; 1989.
12. **Secretaría de Salud Departamental.** 2001–2003. Informes de levantamiento de índice aélico en el municipio de Leticia. Leticia: Gobernación del Amazonas; 2004.
13. **Berrios V, Sielfeld W.** Superclase crustácea, crustáceos continentales. Programa de Biodiversidad, Universidad Arturo Prat Iquique, Chile. Fecha de consulta: 12 de julio de 2005. Disponible en: <http://www.insectos.cl/pdf/CRUSTACEA.pdf>.
14. **McAlpine J, Peterson B, Shewell G, Teskey H, Vockeroth J.** Manual of *Nearctic Diptera*. Quebec: Canadian Government Publishing Centre; 1993.
15. **Merritt RW, Cummins KW.** An introduction to the aquatic insects of North America. Third edition. Dubuque, Iowa: Kendall/Hunt Publishing Company; 1996.
16. **Milligan M.** Identification manual for the aquatic Oligochaeta of Florida. Sarasota, Florida: Freshwater Oligochaetes; 1997.
17. **Peckarsky BL, Fraissinet PR, Penton MA, Conklin DJ.** Freshwater macroinvertebrates of northeastern North America. Ithaca, New York: Cornell University Press; 1990.
18. **Thorp J, Covich A.** Ecology and classification of North American Freshwater Invertebrates. 2nd edition. San Francisco: Academic Press; 2001.
19. **La Casse WJ, Yamaguti S.** *Mosquito fauna of Japan and Korea*. Washington, D.C.: USAF School of Aviation Medicine Air University; 1950.
20. **Chareonviriyaphap T, Akwatanakul P, Nettanomsak S, Huntamai S.** Larval habitats and distribution patterns of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes albopictus* (Skuse), in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2003;34:529-35.
21. **Simard F, Nchoutpouen E, Toto JC, Fontenille D.** Geographic distribution and breeding site preference of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Cameroon, Central Africa. *J Med Entomol.* 2005;42:726-31.
22. **Foratini OP, Kakitani I, Mureb MA, De Rezende L.** Produtividade de criadouro de *Aedes albopictus* em ambiente urbano. *Rev Saúde Pública.* 1997;31:545-55.
23. **Sehgal SS, Pillot MK.** Preliminary studies on the chemical nature of mosquito-breeding waters in Dehli. *Bull World Health Organ.* 1970;42:647-50.
24. **Carrieri M, Bacchi M, Bellini R, Maini S.** On the competition occurring between *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in Italy. *Environ Entomol.* 2003;32:1313-21.
25. **Devi NP, Janhari RH.** Mosquito species associated within some western Himalayas phytogeographic zones in the Garhwal region of India. *J Insect Sci.* 2007;7:1-10.
26. **Alto B, Juliano S.** Precipitation and temperature effects on populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): implications for range expansion. *J Med Entomol.* 2001;38:646-56.
27. **Sota T, Mogi M.** Survival time and resistance to desiccation of diapauses and non-diapause eggs of temperate *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes. *Entomol Exp Appl.* 1992;63:151-61.
28. **Sunahara T, Mogi M.** Variability of intra and interspecific competitions of bamboo stump mosquito larvae over small and large spatial scales. *Oikos.* 2002;97:87-96.
29. **Calado D, Navarro MA.** Avaliação da influência da temperatura sobre o desenvolvimento de *Aedes albopictus*. *Rev Saúde Pública.* 2002;36:173-9.
30. **Estrada-Franco J, Craig G Jr.** Biología, relaciones con enfermedades y control de *Aedes albopictus* (Cuaderno técnico No. 42). Washington D. C.: Organización Panamericana de la Salud; 1995.
31. **Learner MA, Lockhead G, Hughes BD.** A review of the biology of British Naididae (Oligochaeta) with emphasis on the lotic environment. *Freshwater Biol.* 1978;8:357-75.
32. **Marten G.** The potential of mosquito-indigestible phytoplankton for mosquito control. *J Am Mosquito Control Assoc.* 1987;3:105-6.
33. **Sunahara T, Ishizaka K, Mogi M.** Habitat size: determining the opportunity for encounters between mosquito larvae and aquatic predators. *J Vector Ecol.* 2002;27:8-20.
34. **Roldán G.** Fundamentos de limnología neotropical. Colección Ciencia y Tecnología Universidad de Antioquia. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia; 1992.
35. **Sunahara T, Mogi M.** Priority effects of bamboo-stump mosquito larvae: Influences of water exchange and leaf litter input. *Ecol Entomol.* 2002;27:346-54.

36. **Lopes J.** Ecologia de mosquitos (Diptera, Culicidae) em criadouros naturais e artificiais de area rural do norte do Paraná, Brasil. VIII. Influência das larvas predadoras (*Toxorhynchites sp.*, *Limatus durhamii* e *Culex bigoti*) sobre a população de larvas de *Culex quinquefasciatus* e *Culex eduardoi*. Rev Bras Zool. 1999;16:821-6.
37. **Smith B, McIver S.** The patterns of mosquito emergence (Diptera: Culicidae; *Aedes* spp.); their influence on host selection by parasitic mites (Acari: Arrenuridae: *Arrenurus* spp.). Can J Zool. 1984;62:1106-13.
38. **Nam VS, Yen NT, Holynska M, Reid JW, Kay BH.** National progress in dengue vector control in Vietnam: Survey for *Mesocyclops* (Copepoda), *Micronecta* (Corixidae), and fish as biological control agents. Am J Trop Med Hyg. 2000;62:5-10.
39. **Marini O, Parentoni R.** La teoría de las metapoblaciones. Nuevos principios de la biología de la conservación. Ciencia Hoy. 2001;11:7-8.

ARTÍCULO ORIGINAL

Brote de rabia urbana transmitida por perros en el distrito de Santa Marta, Colombia, 2006-2008

Andrés Páez^{1,2}, Gloria Rey¹, Carlos Agudelo¹, Álvaro Dulce³, Edgar Parra⁴,
Hernando Díaz-Granados⁵, Damaris Heredia³, Luis Polo³

¹ Laboratorio de Virología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

² Departamento de Ciencias Básicas, Universidad de La Salle, Bogotá, D.C., Colombia

³ Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Laboratorio de Patología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

⁵ Secretaría de Salud del Distrito de Santa Marta, Santa Marta, Colombia

Instituciones donde se realizó el estudio:

Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., y Secretaría de Salud de Santa Marta, Santa Marta, Colombia

Introducción. En el distrito de Santa Marta ocurrió un brote de rabia urbana entre abril de 2006 y enero de 2008, con cuatro casos fatales en humanos y 28 en perros.

Objetivos. Describir el brote, las técnicas de diagnóstico de laboratorio y las acciones de control de foco empleadas. Medir el impacto de la vacunación antirrábica canina en términos de seroconversión de anticuerpos neutralizantes. Discutir el significado epidemiológico y las implicaciones en salud pública.

Materiales y métodos. Los casos se diagnosticaron por inmunofluorescencia directa, prueba biológica en ratón e inmunohistoquímica. La tipificación viral se hizo por inmunofluorescencia indirecta. Las acciones de control consistieron en un censo canino, vacunación y tratamientos antirrábicos a la población expuesta, vacunación canina y felina, y educación comunitaria. La seroconversión fue investigada por medio de la prueba ELISA de captura.

Resultados. La variante antigénica 1 se caracterizó en todos los casos. Se observó seropositividad en 77% de los perros vacunados y protección serológica contra la rabia, en 47%. No se observaron diferencias de la respuesta humoral entre sexos de los perros, pero sí existieron diferencias de los porcentajes de perros protegidos entre las comunas del distrito.

Conclusiones. Este brote de rabia ha sido el de mayor magnitud en una ciudad colombiana, según los datos oficiales. Fue causado por perros, lo cual reitera la amenaza que aún representa la rabia urbana para la salud pública, a pesar de la existencia de vacunas eficientes.

El control del brote se logró 20 meses después del primer caso en perros y 14 meses después de haberse iniciado la primera vacunación masiva en animales. Es necesario implementar y mantener acciones para el control de la rabia urbana y evitar su impacto en los humanos.

Palabras clave: rabia, virus de la rabia, Lyssavirus, zoonosis, vigilancia epidemiológica, Colombia.

Outbreak of urban rabies transmitted by dogs in Santa Marta, northern Colombia.

Introduction. An urban rabies outbreak occurred in the District of Santa Marta between April 2006 and January 2008, which resulted in the deaths of 4 humans and 28 dogs.

Objectives. Three objectives were entertained—first, the diagnostic laboratory techniques were described as well as the rabies control actions taken; second, the impact of anti-rabies dog vaccination was assessed in terms of neutralizing antibody seroconversion; and third, the epidemiological significance and public health implications of the outbreak were examined.

Materials and methods. Rabies diagnosis was achieved by direct immunofluorescence, inoculation of mice and immunohistochemistry. Typing of the virus was achieved by indirect immunofluorescence. Control activities included a dog population census, vaccination and treatments for persons exposed to rabies, mass vaccination of dogs and cats, and initiation of a community education program. Seroconversion was investigated by capture ELISA.

Results. Antigenic variant 1 was detected in all cases. Of vaccinated dogs, 77% were seropositive,

and 47% were seroprotected against rabies. No differences were found in the humoral response between dog gender; however significant differences in dog seroprotection were discovered between localized communities in Santa Marta.

Conclusions. The 2006-2008 urban rabies outbreak was the largest reported in a city in Colombia. It was caused by rabid dogs, and demonstrated that these animals are still a threat for human health despite the existence of efficient rabies vaccines. The control of the outbreak was achieved 20 months after the first rabies case in dogs, and 14 months after the initiation of the first mass vaccination of animals. The necessity of implementation and maintenance of rabies control strategies is underlined for minimizing human risk.

Key words: rabies, rabies virus, Lyssavirus, zoonoses, epidemiologic surveillance, Colombia.

La rabia es una zoonosis causada por virus neurotrópicos del género *Lyssavirus*, familia *Rhabdoviridae*, orden *Mononegavirales* (1). El virión rábico contiene ARN de cadena sencilla y sentido negativo no segmentado, y codifica cinco proteínas estructurales (2,3).

La rabia es una enfermedad terminal, principalmente de animales; en humanos es un reflejo del grado de contacto con animales infectados. La infección con el virus rábico ocurre en dos formas epidemiológicas diferentes: a) la rabia urbana, con el perro como principal reservorio y transmisor de la enfermedad a los humanos, y b) la rabia silvestre, con especies de los órdenes Carnívora y Quiróptera como principales reservorios y transmisores de la enfermedad, y especies depredadoras como los felinos que actúan como transmisores, principalmente a humanos. Eventualmente, puede ocurrir la transmisión de la rabia entre los dos ciclos epidemiológicos (4-11), lo que resalta el riesgo que presenta para los humanos la enfermedad en cualquier especie animal.

La rabia es endémica en sus dos formas epidemiológicas en la mayoría de países latinoamericanos, incluida Colombia. Actualmente, la transmisión del virus de la rabia representa una gran amenaza para la salud de la población colombiana. Durante el periodo 1992-2008, se registraron en el país 69 casos fatales de rabia en humanos y 1.107 en perros (Datos sin publicar).

Correspondencia:

Andrés Páez, Laboratorio de Virología, Instituto Nacional de Salud, Avenida Calle 26 N° 51-20, CAN, Bogotá, D.C., Colombia.

Telefax: (571) 220 0928

apaezm@ins.gov.co

Recibido: 22/10/08; aceptado:06/04/09

Laboratorio de Rabia, Grupo de Virología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C.). El 95% de estos casos se concentraron en tres regiones del país y el 5% restante se distribuyeron como casos aislados en 15 departamentos de diversas partes del país (12-17).

Las tres regiones mencionadas son: en la región central, el altiplano cundiboyacense (departamentos de Boyacá y Cundinamarca), en la región oriental, el departamento de Arauca y, en la región Caribe, los departamentos de Atlántico, Bolívar, Cesar, Córdoba, Magdalena y Sucre. La transmisión del virus de la rabia urbana en el altiplano cundiboyacense y en Arauca se controló con vacunación (último caso confirmado en abril de 2007), mientras que en la región Caribe sigue siendo un grave problema de salud pública, específicamente en el departamento del Magdalena.

Desde abril de 2006 y con el último caso a finales de enero de 2008, se confirmó la presentación de un brote de rabia urbana transmitida por perros en el distrito de Santa Marta, Colombia, con un registro de 4 humanos y 28 perros muertos (figura 1) (cuadro 1), según los datos oficiales del Ministerio de la Protección Social de Colombia (18). En el presente artículo se describe en detalle el brote, las técnicas diagnósticas utilizadas, los procedimientos para la tipificación viral y las acciones realizadas de control de foco.

Materiales y métodos

Descripción sociocultural y geográfica de las zonas de riesgo

Se hicieron visitas e inspecciones a las zonas en donde ocurrieron los casos fatales de rabia

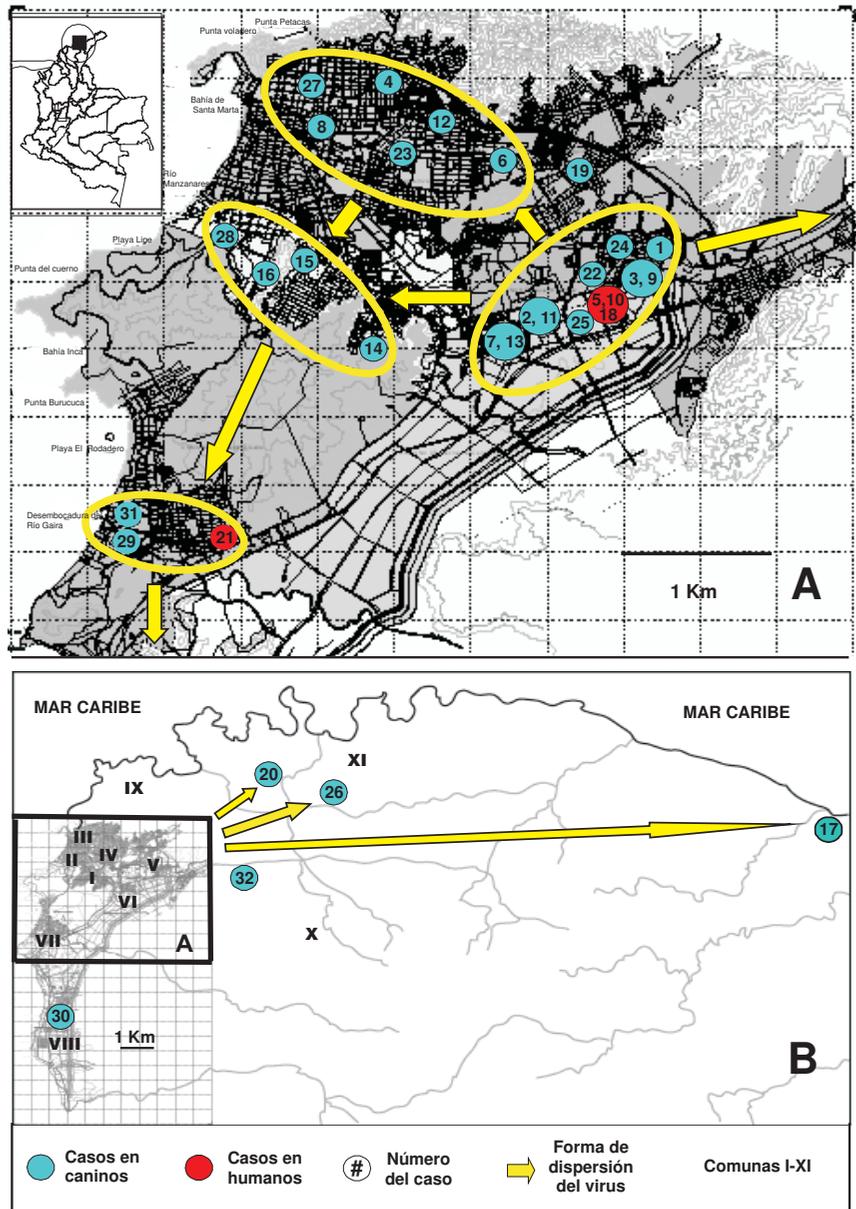


Figura 1. Ubicación y dinámica de dispersión de los casos de rabia en el distrito de Santa Marta, Colombia, 2006-2008. Mapas urbano (A) y rural (B) del distrito de Santa Marta, Colombia, donde se muestra la localización geográfica de los casos de rabia en humanos (puntos rojos) y perros (puntos azules). Los números dentro de los círculos corresponden al número de los casos según el cuadro 1. Las áreas encerradas y las flechas amarillas muestran la manera cómo se dispersó la transmisión viral. Los números romanos corresponden a las comunas del distrito.

en humanos y perros. Dichas visitas tuvieron dos objetivos principales: primero, la investigación de campo y el estudio epidemiológico por medio de la descripción de las zonas y de las comunidades afectadas por la transmisión del

virus de la rabia y la toma de testimonios de amigos y familiares de las víctimas humanas: segundo, la caracterización y control del foco por medio de la vacunación de perros y humanos que hubiesen tenido contacto con casos positivos, y

Cuadro 1. Casos confirmados de rabia en perros y humanos en Santa Marta 2006-2008.

Caso	Especie	Fecha de muerte	Semana epidemiológica	Método diagnóstico	Variante antigénica
1	Canina	17-04-06	16	IFD – PB	1
2	Canina	15- 06-06	24	IFD – PB	1
3	Canina	^a (...)	^a (...)	^b Nexo	^a (...)
4	Canina	12-10-06	41	IFD – PB	1
5	Humana	07-11-06	45	IHQ	^a (...)
6	Canina	16-11-06	46	IFD – PB	1
7	Canina	16-11-06	46	IFD – PB	1
8	Canina	17-11-06	46	IFD – PB	1
9	Canina	20-11-06	46	IFD – PB	1
10	Humana	25-11-06	47	IHQ – IFD – PB	1
11	Canina	02-12-06	48	IFD – PB	1
12	Canina	04-12-06	49	IFD – PB	1
13	Canina	08-12-06	49	IFD – PB	1
14	Canina	10-12-06	50	IFD – PB	1
15	Canina	11-12-06	50	IFD – PB	1
16	Canina	30-12-06	52	IFD – PB	1
17	Canina	12-01-07	2	IFD – PB	1
18	Humana	16-01-07	3	IHQ – IFD – PB	1
19	Canina	16-01-07	3	IFD – PB	1
20	Canina	23-01-07	4	IFD – PB	1
21	Humana	27-01-07	4	IHQ – IFD – PB	1
22	Canina	31-01-07	5	IFD – PB	1
23	Canina	06-02-07	6	IFD – PB	1
24	Canina	13-02-07	7	IFD – PB	1
25	Canina	13-02-07	7	IFD – PB	1
26	Canina	24-02-07	8	IFD – PB	1
27	Canina	07-03-07	10	IFD – PB	1
28	Canina	03-05-07	18	IFD – PB	1
29	Canina	22-05-07	21	IFD – PB	1
30	Canina	30-09-07	40	IFD – PB	1
31	Canina	27-10-07	43	IFD – PB	1
32	Canina	28-01-08	5	IFD - PB	1

^a (...): no determinado.

^b Nexo: perro confirmado positivo por nexo epidemiológico causante de las dos primeras víctimas humanas.

IFD: inmunofluorescencia directa; PB: prueba biológica; IHQ: inmunohistoquímica

las estrategias de información y educación a la comunidad.

Descripción de los casos de rabia en humanos

La descripción de los casos de rabia en humanos se obtuvo mediante visita al lugar de residencia de las personas infectadas y la toma de los testimonios de familiares y vecinos. Para la descripción de cada caso se tuvo en cuenta la edad, el sexo, la ubicación anatómica y el grado de la exposición rábica, las fechas de inicio de síntomas y la muerte. Además, en los hospitales y centros de salud se obtuvo la información

de la sintomatología e historia clínica de los pacientes.

Diagnóstico y tipificación antigénica del virus de la rabia

El diagnóstico de los casos probables de rabia se llevó a cabo en los Laboratorios de Virología y Patología del Instituto Nacional de Salud en Bogotá. Las técnicas utilizadas fueron las de inmunofluorescencia directa (IFD) sobre material encefálico fresco (19,20), en la cual los anticuerpos policlonales antirrábicos marcados con fluoresceína reconocen el antígeno viral presente en dicho material y se produce una

señal visible al microscopio de fluorescencia. Para el anterior procedimiento, se utilizó el conjugado antirrábico *Rabies DFA Reagent* (Light Diagnostics, Cat. N° 5100), de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Además, se emplearon las técnicas de histopatología convencional e inmunohistoquímica, utilizando avidina-biotina conjugada con peroxidasa sobre material encefálico fijado en formol neutro al 10%; el anticuerpo primario policlonal se empleó con dilución 1:160 (21). La prueba confirmatoria se hizo por inoculación intracerebral de la suspensión de cerebro en ratones de laboratorio cepa ICR (*Institute of Cancer Research*) (22).

La tipificación antigénica del virus se realizó por inmunofluorescencia indirecta utilizando material encefálico infectado con los virus rábicos de cada caso, un panel de ocho anticuerpos monoclonales producidos en ratón de los *Centers for Disease Control and Prevention*, en Atlanta, Estados Unidos (23), y un anticuerpo secundario IgG anti-ratón producido en cabra conjugado con fluoresceína (Sigma 065H-8874). El patrón general de reactividad (reacción positiva o negativa) de los ocho anticuerpos monoclonales,

en conjunto, arroja como resultado la variante antigénica de los virus aislados en cada uno de los casos.

Vacunación en perros

La vacunación se hizo casa a casa en todo el distrito de Santa Marta, previo consentimiento de los propietarios de los animales. El método de vacunación fue por inoculación subcutánea en la parte alta del cuello de los animales. Se utilizó la vacuna antirrábica producida en la línea celular VERO por la Empresa Colombiana de Productos Veterinarias, S.A., lotes RAB165 y RAB167. Se realizaron jornadas masivas de vacunación entre noviembre de 2006 y febrero de 2007, y, posteriormente, en octubre de 2007, así como programas continuos de vacunación dirigidos a inmunizar cachorros mayores de tres meses de edad (figura 2).

Medición del nivel de anticuerpos antirrábicos neutralizantes en los perros vacunados

Después de haber pasado un periodo de entre cuatro y seis meses después de la vacunación masiva de perros, se hizo la toma de sangre de una muestra de 252 perros (147 machos y 105

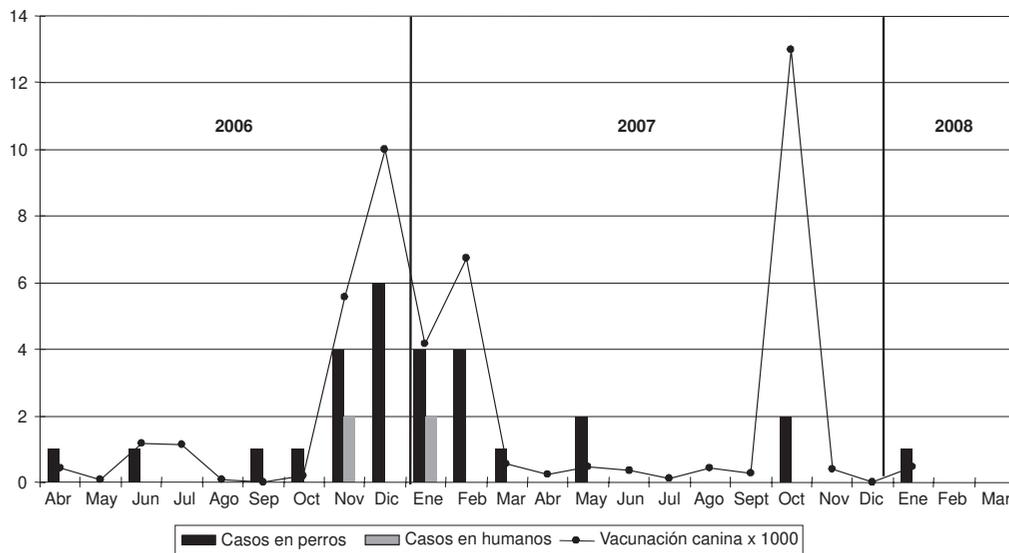


Figura 2. Cronología de casos de rabia en perros y humanos, y de la vacunación canina en el distrito de Santa Marta, Colombia, 2006-2008. Diagrama de barras que muestra cronológicamente la secuencia de casos de rabia en perros y en humanos, además del número de perros vacunados por mes en el distrito de Santa Marta, Colombia, 2006-2008 (marzo). El total de perros según censo de 2007 es de 25.925.

hembras) con edades entre 1 y 13 años, que habían sido vacunados en las 11 comunas de la ciudad.

El tamaño de la muestra se calculó según la fórmula de Wayne–Daniel, con lo cual se obtuvo una población a muestrear de 224 perros:

$$n = N \times Z^2 \times p \times (1-p)$$

$$d^2 (N-1) + Z^2 p (1-p)$$

donde, N es la población total, 49.222; Z, el valor correspondiente al nivel de confianza, 95%; d, la precisión absoluta, 3%, y p el porcentaje de pérdida de muestras, 10%.

Para tomar la muestra se realizó punción de la vena cefálica y se extrajeron 5 a 7 ml de sangre en tubos *vacutainer*. Las muestras se centrifugaron por 15 minutos a 5.000g. Los sueros se separaron y almacenaron a -20 grados centígrados hasta el momento de la medición del nivel de anticuerpos antirrábicos neutralizantes, lo cual se hizo por ELISA utilizando el estuche Platelia Rabia (Bio-Rad, Cat N° 357-2200, Lote CH-B:4E0181), siguiendo la metodología y precauciones que recomienda el fabricante.

Vacunación en humanos

Se realizaron tratamientos de vacunación antirrábica posterior a la exposición en las personas que habían sufrido agresiones por animales, principalmente perros y gatos, al igual que en las que estuvieron en contacto con los humanos con diagnóstico positivo, tales como familiares, amigos y personal médico, según el grado de exposición. Dichos tratamientos consistieron en cinco dosis intramusculares en el músculo deltoides, acompañadas de la aplicación de suero antirrábico, siguiendo las recomendaciones del “Protocolo y guía de atención a pacientes agredidos” del Ministerio de la Protección Social de Colombia (24). La vacuna antirrábica utilizada fue Verorab® (Sanofi Pasteur), lote 21158-1- exp. 11/12/08.

Control de transmisores y reservorios

Se eliminaron los perros sin dueño que deambulaban por el distrito de Santa Marta y que representaban una potencial amenaza para la salud pública. El procedimiento de eliminación consistió

en la inoculación de una dosis de fenilhidantoína y pentobarbital sódico en la vena safena. El número de perros eliminados entre 2006 y 2007 por mes, se muestra en el cuadro 2.

Educación de la comunidad

Se llevaron a cabo reuniones del Comité Departamental y Distrital de Zoonosis y de los Comités de Vigilancia Epidemiológica, para establecer compromisos y actividades. Se hizo capacitación y actualización en rabia del recurso humano involucrado en la prestación de servicios de salud, como médicos y enfermeras, en instituciones prestadoras de salud del distrito. Se sostuvieron reuniones con líderes comunitarios y capacitaciones de promoción, prevención y control de la rabia de los Comités de Participación y Vigilancia Comunitarias, así como de estudiantes en instituciones de educación secundaria y de medicina y enfermería de los establecimientos de educación superior de Santa Marta. Se difundió a la comunidad información sobre la rabia, mediante comunicados de prensa, programas radiales y elaboración de volantes plegables.

Análisis estadístico de la información

Se creó una base de datos en Office Excel XP, para llevar el registro del proceso de vacunación de cada paciente en tiempo real. Los datos se analizaron con el programa SPSS, versión 13,0, con análisis de diferencia de medias y regresión logística, utilizando pruebas *post hoc*-Scheffé (25), Kolmogorov-Smirnov (26,27) y U de Mann-Whitney (28).

Resultados

Descripción sociocultural y geográfica de las zonas de riesgo

El distrito de Santa Marta está ubicado en la costa norte de Colombia; posee una población de 483.000 habitantes, aproximadamente, y se encuentra dividido en 11 comunas, 8 de las cuales son urbanas (comunidades 1 a 8) y 3 son rurales (comunidades 9 a 11). El distrito es la ciudad capital del departamento de Magdalena.

Los casos de rabia en perros y humanos ocurrieron en todas las comunas urbanas.

Aunque existen diferencias sociodemográficas y culturales significativas dentro de cada una de las mencionadas comunas y entre éstas, se destaca el hecho de que la mayoría de los casos de rabia se presentaron en las zonas más deprimidas, las cuales se caracterizan por deficiencias en la prestación de servicios públicos, ausencia de alcantarillado y de sistemas adecuados de disposición y recolección de basuras, vías

públicas sin pavimentar, alta densidad de población canina, inadecuada tenencia de mascotas, hacinamiento humano, analfabetismo y bajo nivel de vida de los pobladores.

El brote objeto de estudio en el presente artículo tuvo sus primeros casos en perros y en humanos en el barrio Once de Noviembre de la comuna 6 (figura 1). Esta zona es una de las

Cuadro 2. Vacunación antirrábica canina y felina, y eliminación de caninos en el distrito de Santa Marta 2005-2008 (enero).

Fecha	Perros vacunados	(%) Cobertura vacunación canina anual	Perros eliminados	Gatos vacunados	(%) Cobertura vacunación felina anual
Enero	159	a(...)	0	1	a(...)
Febrero	191	a(...)	2	17	a(...)
Marzo	139	a(...)	3	12	a(...)
Abril	1	a(...)	0	0	a(...)
Mayo	26	a(...)	1	2	a(...)
Junio	54	a(...)	1	6	a(...)
Julio	489	a(...)	0	68	a(...)
Agosto	92	a(...)	0	14	a(...)
Septiembre	118	a(...)	2	24	a(...)
Octubre	210	a(...)	0	38	a(...)
Noviembre	5.412	a(...)	2	1.076	a(...)
Diciembre	0	a(...)	0	1.673	a(...)
Total, 2005	6.891	26,6	11	2.931	50
Enero	10	a(...)	2	3	a(...)
Febrero	54	a(...)	3	4	a(...)
Marzo	89	a(...)	4	10	a(...)
Abril	416	a(...)	4	38	a(...)
Mayo	91	a(...)	2	12	a(...)
Junio	1.156	a(...)	6	195	a(...)
Julio	1.137	a(...)	4	93	a(...)
Agosto	74	a(...)	6	6	a(...)
Septiembre	12	a(...)	6	2	a(...)
Octubre	182	a(...)	10	21	a(...)
Noviembre	5.555	a(...)	48	1.133	a(...)
Diciembre	9972	a(...)	33	1.928	a(...)
Total, 2006	18.748	72,3	128	3.445	58,7
Enero	4.146	a(...)	22	810	a(...)
Febrero	6.817	a(...)	13	1.283	a(...)
Marzo	541	a(...)	18	102	a(...)
Abril	236	a(...)	10	36	a(...)
Mayo	477	a(...)	12	104	a(...)
Junio	360	a(...)	0	75	a(...)
Julio	127	a(...)	3	47	a(...)
Agosto	440	a(...)	2	100	a(...)
Septiembre	258	a(...)	5	72	a(...)
Octubre	20.083	a(...)	4	3081	a(...)
Noviembre	3.764	a(...)	11	909	a(...)
Total, 2007	37.249	100	100	6.619	100
Enero 2008	459	a(...)	0	94	a(...)

a (...): no determinado.

más deprimidas del distrito de Santa Marta, con las características mencionadas anteriormente, y un gran porcentaje de sus pobladores son desplazados por la violencia de otras partes del departamento.

Descripción de los casos de rabia humana

Con el propósito de facilitar el seguimiento de los casos, se les asignó un número de acuerdo con el orden cronológico en que fueron captados por el sistema de vigilancia. Los casos de rabia humana correspondieron a los números 5, 10, 18 y 21 (cuadro 1).

Caso 5. Era un paciente de 29 años de edad, de sexo masculino, con inicio de los síntomas el 26 de octubre de 2006 y reporte de haber sufrido una agresión en el labio superior por una perra de raza dálmata el 26 de septiembre del mismo año.

Los síntomas se iniciaron con dolor de garganta, inapetencia, malestar general, fiebre y ansiedad. Posteriormente, presentó agresividad e intento de suicidio y, por último, parálisis de los miembros inferiores, salivación y eyaculación espontánea. El paciente falleció el 5 de noviembre de 2006.

Caso 10. Era un paciente de 14 años de edad, de sexo masculino, con inicio de los síntomas el 20 de noviembre de 2006 y reporte de haber sufrido una escoriación en el pie izquierdo al patear a una perra de raza dálmata en el hocico, aproximadamente, dos meses antes. Se estableció que la perra involucrada en los casos 5 y 10 fue la misma.

Los síntomas se iniciaron con calambres y dolor en la pierna izquierda, fiebre, escalofríos, cefalea y ansiedad, seguidos de sialorrea, hidrofobia, aerofobia y dificultad respiratoria. Finalmente, presentó mirada extraviada, sed, rigidez de nuca, contracturas musculares ocasionales involuntarias, fascies de terror con apertura ocular extrema, midriasis bilateral y parálisis de las cuatro extremidades. El paciente falleció el 25 de noviembre de 2006.

Caso 18. Era un paciente de 20 años de edad, de sexo masculino, con inicio de los síntomas el 5 de enero de 2007 y reporte de haber sufrido

una agresión leve en el brazo derecho por un perro callejero, aproximadamente, tres meses antes.

Los síntomas se iniciaron con dolor abdominal de moderada intensidad, vómito y diarrea. Posteriormente, presentó parálisis total de las cuatro extremidades y convulsiones. El paciente falleció el 16 de enero de 2007.

Caso 21. Era un paciente de 3 años de edad, de sexo masculino, con inicio de los síntomas el 13 de enero de 2007 y con reporte de haber sido agredido por un perro callejero, el cual le causó una herida leve en un brazo, aproximadamente, dos meses antes.

Los síntomas se iniciaron con dificultad para sostenerse en las piernas. Posteriormente, presentó fiebre, convulsiones y agresividad, y finalmente, parálisis de las cuatro extremidades y coma. El paciente falleció el 27 de enero de 2007.

Diagnóstico y tipificación antigénica del virus

Se confirmó *post mórtem* la infección por virus de la rabia en 27 perros, en los cuales se detectó antígeno rábico IFD en tejido encefálico. Además, se confirmó el caso 3 de rabia en perro por nexo epidemiológico (la perra dálmata que ocasionó las dos primeras muertes humanas, casos 5 y 10), para un total de 28 casos confirmados de rabia en perros en el presente estudio.

De igual manera, se confirmó infección por virus de la rabia en cuatro personas, en quienes se detectó antígeno rábico en tejido encefálico por técnicas de inmunohistoquímica e histopatología, en los casos 5, 10, 18 y 21, e IFD y prueba biológica por inoculación en ratones de laboratorio, en los casos 10, 18 y 21 (cuadro 1).

Los cerebros de los casos humanos estudiados por histopatología e inmunohistoquímica mostraban macroscópicamente un importante grado de edema y de congestión, correspondiente a encefalitis de predominio diencefalomesencefálico. El componente inflamatorio fue particularmente importante hacia la región hipotalámica, principalmente, en la franja vecina a la cubierta del

epéndimo del tercer ventrículo y en cortes de la parte superior del mesencéfalo, con presencia de micronódulos gliales tipo Babes, fenómenos de satelitosis y neuronofagia. Los corpúsculos de Negri fueron muy abundantes en todos los niveles y, particularmente, en el lóbulo temporal en el asta de Ammón y el cerebelo. Se observó antígeno viral rábico en notoria proporción en todo el encéfalo. El caso 5 humano presentó moderada hernia simétrica tanto del uncus del hipocampo, como de las amígdalas del cerebelo, e internamente, los núcleos centrales no mostraron alteraciones morfológicas como tampoco en los cortes del tallo cerebral. Se aisló la variante antigénica 1, típica de rabia transmitida por perros, como la única variante presente en el material encefálico de los casos de rabia en 27 perros y 3 humanos. No fue posible aislar los virus del caso humano 5, debido a que el tejido encefálico fue conservado en formol, lo cual imposibilitó el procedimiento.

Vacunación de perros y gatos

Los datos de la vacunación y coberturas de vacunación en perros y gatos, así como los de eliminación de perros en el distrito de Santa Marta en el periodo 2005-2008 (enero), se muestran en el cuadro 2. Las coberturas de la vacunación en perros y gatos corresponden al porcentaje de animales que fueron vacunados en cada mes y año, teniendo como el 100% al número total de animales según el censo 2007, con el cual se estimaron las poblaciones caninas y felinas del distrito de Santa Marta en 25.925 y 5.871, respectivamente.

En 2005, el número de perros y gatos vacunados fue de 6.891 y 2.931, correspondientes a coberturas anuales de vacunación de 26,6% y 50%, respectivamente. Entre enero y abril de 2006 (antes del registro del primer caso de rabia canina), se vacunaron 569 perros y 55 gatos que corresponden a coberturas de vacunación de 2,2% y 0,4%, respectivamente. Los programas de vacunación masiva de perros y gatos tuvieron lugar en noviembre de 2006 y febrero de 2007, con 26.490 dosis aplicadas a perros y 5.154 aplicadas a gatos, que corresponden a coberturas de vacunación superiores al

100% en perros y 88% en gatos. Una segunda campaña de vacunación masiva tuvo lugar en octubre y noviembre de 2007, con 23.847 dosis aplicadas a perros y 3.990 aplicadas a gatos, que corresponden a coberturas de vacunación de 92% en perros y 68% en gatos.

Medición del nivel de anticuerpos antirrábicos neutralizantes en los perros vacunados

Se comprobó seropositividad en 77% de los perros de la muestra. Sin embargo, sólo se detectó seroconversión de anticuerpos neutralizantes contra la rabia superior o igual a 0,5 UI/ml en suero (tomado como indicativo de una adecuada respuesta humoral a la vacunación y de protección serológica contra la enfermedad) en 47%. La distribución de los valores de concentración de los anticuerpos antirrábicos no se ajustó a una curva normal según la prueba Kolmogorov-Smirnov; por lo tanto, en el análisis estadístico se utilizaron pruebas no paramétricas (prueba U de Mann-Whitney y prueba *post hoc*-Scheffé) para determinar diferencias de las medianas entre las agrupaciones de perros por sexo y comuna.

Al agrupar los perros seropositivos de la muestra por rangos de concentración de anticuerpos antirrábicos neutralizantes, se obtuvo que el mayor porcentaje de perros (29%) estuvo entre 0,1 y 0,49 UI/ml, seguido del 17% entre 0,5 y 0,99 UI/ml, 14% entre 1,0 y 1,99, 5% entre 2,0 y 2,99 UI/ml y 1% entre 3,0 y 3,99 UI/ml. El 53% de las hembras presentaron protección serológica, mientras que este indicador en machos fue de 43%.

Por regresión logística, esta diferencia no fue significativa ($p=0,112$), como tampoco lo fueron las diferencias de las medianas de los valores de anticuerpos antirrábicos entre machos (0,42 UI/ml) y hembras (0,53 UI/ml) ($p=0,134$ -prueba U de Mann-Whitney), ni entre las comunas del distrito ($p=0,938$, prueba *post hoc*-Scheffé). Por regresión logística, se determinaron diferencias significativas entre los porcentajes de perros con protección serológica entre las comunas del distrito ($p=0,003$) (figura 3). Así, las comunas 1 y 2 presentaron los porcentajes de protección más bajos, 27% y 29% respectivamente, mientras

que las comunas 9 y 10 presentaron los más altos, 70% y 80% respectivamente.

Discusión

Se describe el brote de rabia urbana de mayor magnitud reportado en ciudades de Colombia, según los datos oficiales del Ministerio de la Protección Social de Colombia, y las acciones de control de foco utilizadas. Cuatro humanos y 28 perros fueron confirmados como positivos para rabia, para los cuales únicamente la variante antigénica 1 fue aislada, lo cual indica que los virus transmitidos tuvieron origen canino.

Estudios previos han demostrado la transmisión en Colombia de las variantes antigénicas 1 de perro, 3 y 5 de murciélagos hematófagos, 4 de murciélagos insectívoros, 8 de zorro y, además, variantes antigénicas no clasificadas que son transmitidas por murciélagos insectívoros (17). En el Magdalena, la variante antigénica 1 ha sido aislada exclusivamente de perros y zorros, y la variante antigénica 3, en gatos y bovinos, lo que demuestra nuevamente el fenómeno de independencia en la transmisión de la rabia entre especies domésticas cercanas entre sí, como son los gatos y los perros, que se ha observado en Colombia y el resto de países en Latinoamérica.

De hecho, durante el periodo que duró el brote descrito en este artículo, ningún gato del distrito

de Santa Marta resultó contagiado con rabia. El brote descrito en este estudio tuvo sus primeros casos en la comuna 6, ubicada en el nororiente del distrito de Santa Marta; posteriormente, la transmisión del virus tuvo lugar en las comunas 3 y 4, ubicadas hacia el noroccidente. Finalmente, la transmisión del virus se trasladó con dirección sur a las comunas 1, 7 y 8, ubicadas en el centro y sur del distrito, respectivamente, y hacia las comunas 10 y 11, ubicadas en áreas rurales (figura 1).

El número real de casos de rabia ocurridos durante el brote se desconoce. Posiblemente existieron casos de rabia, especialmente en perros, que no fueron diagnosticados debido a que no fueron detectados por el sistema de vigilancia epidemiológica local. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que, durante el brote, existieron silencios epidemiológicos de hasta cinco meses (figura 2), en los cuales, a pesar de existir transmisión del virus rábico, ningún perro fue diagnosticado como positivo para infección rábica. Lo anterior resalta la fundamental importancia que tiene el mantener una vigilancia activa y sólida, que cubra todos los sectores en la ciudad, con un mínimo de perros muestreados que corresponda al 0,1% del total de la población canina censada (29), con el fin de ofrecer cifras ajustadas a la realidad en cuanto a la casuística y caracterización de la verdadera magnitud de un brote.

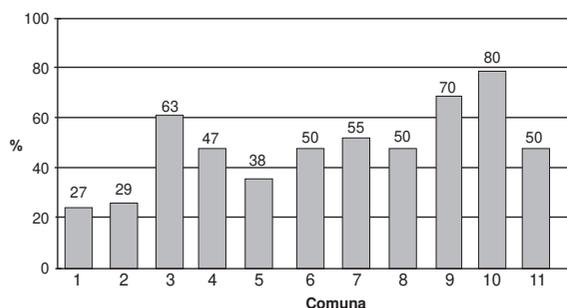


Figura 3. Porcentaje de protección serológica contra la rabia por comunas en el distrito de Santa Marta, Colombia, 2007. Diagrama de barras que muestra los porcentajes de protección serológica contra la rabia como resultado de las campañas de vacunación canina en las 11 comunas del distrito de Santa Marta, Colombia 2007. Las diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,003$ según la prueba de regresión logística).

El estudio del material encefálico de los cuatro casos humanos reveló que la localización anatómica de las lesiones en el cerebro, especialmente el compromiso inflamatorio del hipotálamo, explican algunas manifestaciones neuropsiquiátricas observadas en casos de rabia humana furiosa. En contraste, la rabia humana con paresia o parálitica, la cual es transmitida por murciélagos hematófagos, produce lesiones que se ubican predominantemente en las áreas motoras del tallo cerebral y del segmento medular C1 (30).

En ninguno de los casos humanos del presente estudio, se observó correlación clara entre el lugar anatómico de inoculación del virus rábico y el periodo de incubación de la enfermedad.

Como respuesta a la vacunación, se observó una respuesta inmune humoral antirrábica en 77% de los perros de la muestra estudiada. Únicamente 47% de los perros estudiados presentaron protección serológica contra la rabia, definida por concentraciones de anticuerpos neutralizantes en suero iguales o superiores a 0,5 UI/ml.

Este porcentaje, aunque bajo, podría corresponder a lo esperado en condiciones de campo, si se tienen en cuenta algunos factores moduladores de la respuesta inmune humoral en los perros, como: a) que la población habría recibido la primera dosis de vacuna antirrábica sin haber sido vacunada anteriormente; b) desnutrición y presencia de ectoparásitos y endoparásitos; c) fallas técnicas generadas por entrenamiento insuficiente del personal encargado de la vacunación; d) rompimiento de la cadena de frío de los biológicos, y e) falta de mantenimiento en la vacunación sistemática.

Se ha reportado protección serológica contra la rabia, producto de campañas masivas de vacunación canina, en Brasil, Perú, España, Túnez y Japón, y se encontraron entre 34% y 77% de perros protegidos (con concentración de anticuerpos neutralizantes de 0,5 UI/ml y superiores) (31-34). Existe un solo reporte de protección serológica contra la rabia en casi la totalidad (97%) de los perros vacunados después de una campaña (35).

En el presente estudio no se observaron tendencias de la respuesta inmune humoral de los perros asociada al sexo, pero sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas asociadas a las comunas del distrito. Al respecto, las comunas 1 y 2 presentaron los porcentajes más bajos de protección, 27% y 28%, respectivamente, mientras que las comunas 9 y 10 presentaron los porcentajes más altos de protección, 70% y 80%, respectivamente; se desconocen las causas de estas diferencias (figura 3).

En este artículo se muestra el riesgo que puede llegar a tener la reducción o suspensión de las campañas de vacunación antirrábica sobre la salud pública, principalmente en grandes ciudades, lo anterior teniendo en cuenta que en el 2005, antes de la iniciación del brote, la

cobertura de vacunación en el distrito de Santa Marta fue de sólo 26,6%. Este porcentaje de cobertura de vacunación no resultó útil para prevenir la transmisión del virus de la rabia entre los perros del distrito, y más aun cuando el distrito de Santa Marta presentaba el riesgo de introducción el virus de la rabia transmitida por perros, considerando que por más de una década el departamento del Magdalena ha presentado casos de rabia, con altas tasas de transmisión en los municipios de Ciénaga, Pivijay, la Zona Bananera, Fundación, y Aracataca. En el periodo 2000-2006, estos municipios presentaron 15, 17, 16, 10 y 6 casos confirmados de rabia en perros, todos con la variante antigénica 1 típica de la rabia de origen canino (no se presentan los datos en este estudio. Laboratorio de Virología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C.). El departamento de Magdalena ha sido el único departamento de Colombia con circulación de virus rábico transmitido por perros durante los últimos 10 años.

Por todo lo anterior, se especula que el brote de rabia en el distrito de Santa Marta pudo haberse iniciado por importación del virus desde algún municipio vecino, o por contacto entre perros y zorros infectados con rabia que habitan en cercanías de la Sierra Nevada, hipótesis que es apoyada por los datos de tipificación viral (11).

Nuestro estudio resalta la gran importancia que tiene el mantener adecuadas coberturas de vacunación, que alcancen como mínimo al 80% de los perros, año tras año, aun cuando existan silencios epidemiológicos prolongados, como en el caso del distrito de Santa Marta que fue superior a los 20 años; el último caso de rabia canina en el distrito fue confirmado en 1985.

Los datos de nuestro trabajo muestran, además, el impacto que tienen las campañas de vacunación y revacunación intensivas sobre la reducción en el número de casos de un brote de rabia urbana, como el reportado en el presente trabajo. A este respecto, nuestros datos indican que, a pesar de haber iniciado intensas campañas de vacunación y revacunación canina simultáneas a la presentación de la fase aguda del brote (figura 2), su control definitivo se logró, aproximadamente,

20 meses después de reportado el inicio del brote, y 14 meses después de haberse iniciado las campañas masivas de vacunación. Esto da una idea del periodo tan prolongado en que la población humana permaneció en riesgo y de la complejidad que presenta la eliminación de un brote de rabia en una ciudad, aun cuando el transmisor sea exclusivamente el perro.

De lo anterior se concluye la fundamental importancia que tiene el iniciar oportunamente las intensas campañas de vacunación, en el momento en que ocurre el primer caso de rabia canina, principalmente en un asentamiento urbano en donde perros y humanos se encuentran en permanente contacto. En este sentido, es importante mejorar la capacidad y oportunidad de reacción de los organismos de salud en Colombia en respuesta ante un caso de rabia en las ciudades y municipios.

Dados varios factores, como el que la transmisión del virus de la rabia puede no haber sido interrumpida totalmente en el distrito de Santa Marta en la actualidad y que la cercanía de zorros rabiosos de la Sierra Nevada de Santa Marta favorece un permanente contacto entre éstos y los perros del distrito, además de que el porcentaje de protección serológica contra la rabia se encontró inferior al 50% en la población canina en este estudio, se hace obligatorio mantener campañas anuales de revacunación y hacer mantenimiento continuo de vacunación de cachorros; esto con el fin de incrementar el porcentaje de perros protegidos y reducir el de perros susceptibles, como se ha observado en anteriores estudios (36) y así lograr el control total del brote de rabia urbana. Hacia el futuro, las mencionadas campañas anuales de vacunación y revacunación tendrán que continuar llevándose a cabo mientras la rabia transmitida por perros permanezca endémica en el departamento de Magdalena.

Agradecimientos

Los autores del presente estudio desean agradecer de manera especial a Nasly Goenaga Cárdenas, profesional en epidemiología, adscrita a la Secretaría de Salud Distrital de Santa Marta, por su decidida colaboración y apoyo a

las acciones de prevención y control de foco durante las fases iniciales del brote de rabia.

Conflicto de intereses

Los autores del artículo hacen constar que no existe, de manera directa o indirecta, ningún tipo de conflicto de intereses financieros, académicos o personales que puedan poner en peligro la validez de la investigación.

Financiación

Los recursos económicos necesarios para el trabajo de campo y de laboratorio fueron aportados por el Instituto Nacional de Salud, la Secretaría de Salud del Distrito de Santa Marta y el Ministerio de la Protección Social.

Referencias

1. **Beran GW, Steele JH.** Handbook of zoonoses. Section B: Boca Ratón, FL: CRC Press; 1994. p. 307.
2. **Wunner WH, Larson JK, Dietzchold B, Smith CL.** The molecular biology of rabies virus. *Rev Infect Dis.* 1988;10(Suppl.4):771-84.
3. **Tordo N, Kouknetzoff A.** The rabies virus genome: an overview. *Onderstepoort J Vet Res.* 1993;60:263-9.
4. **Bourhy H, Kissi B, Audry L, Smreczak M, Sadkowska-Todys M, Kulonen K, et al.** Ecology and evolution of rabies virus in Europe. *J Gen Virol.* 1999;80:2545-57.
5. **Guerra MA, Curns AT, Rupprecht CE, Hanlon CA, Krebs JW, Childs JE.** Skunk and raccoon rabies in the eastern United States: temporal and spatial analysis. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:1143-50.
6. **Nel L, Jacobs J, Jaftha J, Meredith C.** Natural spillover of a distinctly Canidae-associated biotype of rabies virus into an expanded wildlife host range in southern Africa. *Virus Genes.* 1997;15:79-82.
7. **Sabeta CT, Bingham J, Nel LH.** Molecular epidemiology of canid rabies in Zimbabwe and South Africa. *Virus Res.* 2003;91:203-11.
8. **Johnson N, Black C, Smith J, Un H, McElhinney LM, Aylan O, et al.** Rabies emergence among foxes in Turkey. *J Wildl Dis.* 2003;39:262-70.
9. **Krebs JW, Williams SM, Smith JS, Rupprecht CE, Childs JE.** Rabies among infrequently reported mammalian carnivores in United States, 1960-2000. *J Wildl Dis.* 2003;39:253-61.
10. **Stankov S.** Typing of field rabies virus strains in FR Yugoslavia by limited sequence analysis and monoclonal antibodies. *Med Pregl.* 2001;54:446-52.
11. **Páez A, Saad C, Núñez C, Boshell J.** Molecular epidemiology of rabies in northern Colombia 1994-2003:

- Evidence for human and fox rabies associated with dogs. *Epidemiol Infect.* 2005;133:529-36.
12. **Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.** Rabia. Serie de notas e informes técnicos. Quinta edición. Bogotá, D.C.: Minsalud-INS: 1995.
 13. **Rico A, Díaz A, Rico E.** Informe de la rabia urbana en Colombia, 1996-2001. Programa de Zoonosis. Bogotá D.C.: Ministerio de Salud: 2001.
 14. **Páez A, Núñez C, García C, Boshell J.** Molecular epidemiology of rabies epizootics in Colombia: evidence for human and dog rabies associated with bats. *J Gen Virol.* 2003;84:795-802.
 15. **Páez A, Núñez C, García C, Boshell J.** Epidemiología molecular de epizootias de rabia en Colombia 1994-2002. Evidencia de rabia humana y canina asociada a quirópteros. *Biomédica.* 2003;23:19-30.
 16. **Hughes GJ, Páez A, Boshell J, Rupprecht CE.** A phylogenetic reconstruction of the epidemiological history of canine rabies virus variants in Colombia. *Infect Gen Evol.* 2004;4:45-51.
 17. **Páez A, Velasco-Villa A, Rey G, Rupprecht C.** Molecular epidemiology of rabies in Colombia 1994-2005 based on partial nucleoprotein gene sequences. *Virus Res.* 2007;130:172-81.
 18. **Ministerio de la Protección Social.** Resolución 002921 de junio 25 de 2007. Declaración de emergencia sanitaria por brote de rabia humana transmitida por caninos y desabastecimiento de vacunas y sueros anti-rábicos en el Distrito de Santa Marta, Colombia. Bogotá, D.C.: Ministerio de la Protección Social; 2007.
 19. **McQueen JL, Lewis AL, Schneider NJ.** Rabies diagnosis by fluorescent antibody. Its evaluation in a public health laboratory. *Am J Public Health.* 1960;50:1743-52.
 20. **Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H.** The mouse inoculation test (Chapter 6), and The fluorescent antibody test (Chapter 7). In: World Health Organization. Laboratory techniques in rabies. Fourth edition. Geneva: World Health Organization; 1996.
 21. **Rodríguez G.** Diagnóstico inmunológico del virus de la rabia en tejido incluido en parafina. *Inf Quinc Epidemiol Nac.* 1997;16:235-6.
 22. **Koprowski H.** Prueba de inoculación en ratones. En: Organización Mundial de la Salud. Técnicas de laboratorio aplicadas a la rabia. Washington D.C.: OPS/OMS; 1956. p. 57-69.
 23. **Dietzschold B, Rupprecht CE, Tollis M, Lafon M, Mattel J, Wiktor TJ, et al.** Antigenic diversity of the glycoprotein and nucleocapsid proteins of rabies and rabies related viruses: implications for epidemiology and control of rabies. *Rev Infect Dis.* 1988;10(Suppl.4):785-98.
 24. **Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.** Rabia. Guía práctica para la atención integral de personas agredidas por un animal potencialmente transmisor de rabia. Serie de notas e informes técnicos No. 4. Sexta edición. Bogotá, D.C.: Ministerio de Salud-INS: 2002.
 25. **Scheffé H.** Statistical inference in the non-parametric case. *Ann Math Statist.* 1943;14:305-32.
 26. **Kolmogorov A.** Confidence limits for an unknown distribution function. *Ann Math Statist.* 1941;12:461-3.
 27. **Smirnov NV.** Table for estimating the goodness of fit of empirical distributions. *Ann Math Statist.* 1948;19:279-81.
 28. **Mann HB, Whitney DR.** On a test of whether one or two random variables is stochastically larger than the other. *Ann Math Statist.* 1947;18:50-60.
 29. **Schneider MC.** Estudo de avaliação sobre área de risco para a raiva no Brasil. Rio de Janeiro, 1990 (Dissertação de Mestrado). Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz; 1990.
 30. **Valderrama J, García I, Figueroa G, Rico E, Sanabria J, Rocha N, et al.** Brotes de rabia humana transmitida por vampiros en los municipios de Bajo y Alto Baudó, departamento del Chocó, Colombia 2004-2005. *Biomédica.* 2006;26:387-96.
 31. **Delgado S, Carmenes P.** Immune response following a vaccination campaign against rabies in dogs from northwestern Spain. *Rev Vet Med.* 1997;31:257-61.
 32. **Shimazaki Y, Inoue S, Takahashi C, Gamoh K, Etosh M, Kamiyama T, et al.** Immune response to Japanese rabies vaccine in domestic dogs. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2003;50:95-8.
 33. **Rigo L, Honer MR.** Titulação de anticorpo contra o vírus de raiva em cães, em Campo Grande, MS na Campanha Anti-rábica de 2003. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39:553-5.
 34. **López R, Díaz A, Condori E.** Susceptibilidad canina a rabia después de una campaña de vacunación en zonas endémicas del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública.* 2007;24:13-9.
 35. **Chomel B, Chappuis G, Bullón F, Cárdenas E, de Beublain TD, Lombard M, et al.** Mass vaccination campaign against rabies: are dogs correctly protected? The Peruvian experience. *Rev Infect Dis.* 1988;10(Suppl.4):697-702.
 36. **Seghaier C, Cliquet F, Hammami S, Aouina T, Aubert M.** Rabies mass vaccination campaigns in Tunisia: are vaccinated dogs correctly immunized? *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61:879-84.

ARTÍCULO ORIGINAL

Supervivencia de pacientes con cáncer de cuello uterino tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología

Constanza Pardo¹, Ricardo Cendales²

¹ Grupo de Vigilancia Epidemiológica del Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, D.C., Colombia.

² Grupo de Radioterapia Oncológica, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, D.C., Colombia.

Introducción. El cáncer de cuello uterino es el de mayor incidencia y la primera causa de mortalidad en las mujeres colombianas. Cerca de 10% de todos los casos del país son tratados en el Instituto Nacional de Cancerología. Se requiere evaluar la experiencia institucional.

Objetivo. Describir la supervivencia global a cinco años de las pacientes con cáncer de cuello uterino tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología durante el 2000.

Materiales y métodos. Análisis de supervivencia que incluyó todas las pacientes con cáncer de cuello uterino que fueron tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología en el 2000. Se emplearon frecuencias y medidas de tendencia central y de dispersión, para resumir las variables categóricas y numéricas, respectivamente. El análisis de supervivencia se realizó mediante el método de Kaplan-Meier y la regresión de Cox.

Resultados. Se trataron 651 pacientes en el 2000. Entre las 455 pacientes elegibles, 303 (66%) estaban vivas al finalizar el período. El tiempo medio de seguimiento para las pacientes que no murieron fue de 3,69 años, con una desviación estándar de 2,58 años. La probabilidad acumulada de supervivencia global a 5 años fue de 58,8% y el tiempo medio de supervivencia fue de 4,53 años. La única variable que afectó significativamente la función de supervivencia en el análisis multivariado de Cox fue el estadio clínico al momento del diagnóstico.

Conclusiones. Los resultados de supervivencia global son similares a los reportados en la literatura. Se recomienda desarrollar estudios en cohortes más grandes para aumentar la potencia del estudio e identificar otros factores de pronóstico.

Palabras clave: análisis de supervivencia, neoplasias del cuello uterino, registros de mortalidad, mortalidad hospitalaria, vigilancia epidemiológica, Colombia.

Survival analysis of cervical cancer patients

Introduction. Uterine cervical cancer is the first cause of incidence and mortality in Colombian women. Nearly 10% of all the cases in the country are treated at the Instituto Nacional de Cancerología. Evaluation of the institutional success rates is suggested.

Objective. Patient survival over a 5 year period was summarized for those admitted for treatment of cervical cancer at the Institute in the year 2000.

Materials and methods. All patients with cervical cancer at the Institute in 2000 were included in the survival analysis. Frequencies, central tendencies and dispersion measures were used to describe categorical and numerical variables. Survival analysis was performed by using Kaplan Meier and the multivariate Cox regression model.

Results. During the study period, 651 patients with cervical cancer were treated. Among the 455 eligible patients, 303 (66%) were alive at the end of the study period. Mean survival time for patients who did not die was 3.69 years, with a standard deviation of 2.58 years. Cumulated five year overall survival probability was 58.8% and mean survival was 4.53 years. The only variable that significantly affected the survival function was the clinical stage at the time of the diagnosis.

Conclusions. Overall survival results are similar to those described in other international institutions. If larger cohort studies were used, the power of the study can be increased in order to identify other factors associated with the prognosis.

Key words: survival analysis, uterine cervical neoplasms, mortality registries, hospital mortality, epidemiologic surveillance, Colombia.

El cáncer de cuello uterino pasó del segundo al primer lugar en incidencia (36,4 por 100.000 habitantes) y en mortalidad (18,2 por 100.000 habitantes) por cáncer entre las mujeres colombianas en 2002. Para Suramérica, las tasas de incidencia y mortalidad para el mismo año fueron de 19,1 y 12,9 por 100.000 habitantes, respectivamente (1). Durante el periodo de 1995 a 1999, fue la primera causa de muerte relacionada con la salud sexual y procreativa de la mujer en Colombia. La tendencia de la mortalidad para el cáncer de cuello uterino en los últimos quince años se ha mantenido sin variación en Colombia, a pesar de que en 1991 se creó el programa nacional para su detección precoz (2) y que, dentro del Sistema General de Seguridad Social, las actividades para el control de esta enfermedad han sido una prioridad en salud pública (3,4).

La supervivencia libre de enfermedad y de recaída local y regional entre pacientes con cáncer de cuello uterino, está determinada principalmente por el estadio clínico y la presencia de compromiso ganglionar, aunque la invasión del estroma y la presencia de invasión vascular o linfática son también factores de pronóstico para pacientes con tumores en estadios tempranos (5). Otros factores de pronóstico menos importantes son el tipo histológico y el grado de diferenciación. La edad, el nivel socioeconómico, la raza y los niveles de hemoglobina pierden su efecto al incluir los demás factores en modelos multivariados, por lo que su papel como factores de pronóstico no está plenamente establecido (6).

La supervivencia en cáncer de cuello uterino ha mostrado variaciones importantes entre los países desarrollados y los países en desarrollo, debido a que en estos últimos los programas de tamización son ineficaces, lo cual se

relaciona con los altos costos operativos que implica la infraestructura, el recurso humano, el tratamiento y el seguimiento de las mujeres con anomalías citológicas (7); por lo tanto, en los países en desarrollo los cánceres de cuello uterino suelen diagnosticarse en estadios avanzados.

En el Instituto Nacional de Cancerología, el cáncer de cuello uterino es la primera causa de consulta por morbilidad, con un promedio de 713 casos por año; la edad media es de 46,5 años y el 98% de los casos se diagnostica por histopatología. En 2004, de los 739 casos hospitalizados por cáncer de cuello uterino, el 22% era *in situ* y el 34,6% fue diagnosticado en estadios I y II (8).

El Instituto Nacional de Cancerología es un centro de referencia del orden nacional y cuenta con un registro institucional de cáncer que permite identificar de manera simple y eficiente los pacientes nuevos; también, cuenta con un sistema de registro de mortalidad institucional. Los registros de base hospitalaria recopilan información sobre todos los casos nuevos de cáncer que ingresan a la institución, pueden usarse para describir la experiencia de cualquier grupo de pacientes con cáncer y permiten hacer seguimiento de la supervivencia en subgrupos específicos de población (9).

El análisis descriptivo de supervivencia es una herramienta útil para la evaluación de la efectividad de la terapia. Sin embargo, para poder hacer estimaciones válidas de la supervivencia, resulta imprescindible incluir el universo de pacientes elegibles, con el fin de no incurrir en sesgos de selección; este universo se puede recopilar a partir de los registros institucionales o de población (10).

En Colombia, no hay estudios recientes publicados en revistas indexadas que describan la supervivencia de las pacientes con cáncer de cuello uterino. A pesar de que el Instituto Nacional de Cancerología es un centro nacional de referencia que ofrece tratamiento, aproximadamente, al 10% de todos los casos de cáncer de cuello uterino en Colombia, no tiene evaluaciones periódicas de supervivencia.

Correspondencia:

Constanza Pardo, Grupo de Vigilancia Epidemiológica del Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología, Calle 1 N° 9-85, Bogotá, D.C., Colombia.

Teléfono: (571) 334 1177, 334 1111, extensión 4108; fax: (571) 334 1353

cpardo@cancer.gov.co, tachapardo@yahoo.com

Recibido: 24/10/08; aceptado:06/04/09

El objetivo de este estudio es describir la supervivencia global a cinco años, de las pacientes con cáncer de cuello uterino que se trataron por primera vez en el Instituto Nacional de Cancerología entre el 1º de enero y el 31 de diciembre de 2000, haciendo uso de los registros institucionales de cáncer y mortalidad.

Materiales y métodos

Se incluyeron todas las pacientes que se hospitalizaron y se trataron por primera vez en el Instituto Nacional de Cancerología en el 2000, con diagnóstico de cáncer de cuello uterino hecho en la institución o por fuera de ella y con confirmación histopatológica del tumor. Se excluyeron las pacientes con antecedentes de procedimientos terapéuticos previos orientados a tratar la enfermedad neoplásica del cuello uterino, pacientes con recidivas tumorales, pacientes con cáncer de cuello uterino como segundo primario y pacientes que hubiesen recibido cualquier componente del tratamiento fuera del Instituto Nacional de Cancerología.

Las fuentes de información fueron la historia clínica, el contacto telefónico con las pacientes o familiares, las bases de datos del registro institucional y de mortalidad, y las bases de mortalidad distrital y nacional consultadas a través de la Secretaría Distrital de Salud. Para la recolección de las variables, se empleó un formato específicamente diseñado para el estudio. El seguimiento se hizo de manera retrospectiva y, para aquellas pacientes que no tenían la última visita actualizada, se inició el proceso de contacto telefónico con el apoyo de una trabajadora social entrenada en el seguimiento de pacientes con cáncer.

Previo a la digitalización, se depuraron los datos mediante la revisión de los formatos diligenciados, con el fin de detectar los espacios en blanco y las inconsistencias y para verificarlos con la historia clínica, si era necesario. Los datos relacionados con el tipo histológico se codificaron con la Clasificación Internacional de Enfermedades para Oncología, segunda edición (CIEO-2). La información diligenciada en el formato se digitó en una base de datos validada en Epi-Info 2002. Se realizaron análisis de consistencia y validez

de la base de datos; los datos inconsistentes se corrigieron a partir de la revisión del formato de recolección y de la historia clínica.

Se calculó la variable “tiempo de observación” a partir de la fecha del primer tratamiento y la fecha del último contacto o la muerte; para aquellas pacientes que por alguna razón no recibieron tratamiento, esta variable se calculó a partir de la fecha del ingreso al Instituto. Aquellos casos en los que no se logró establecer la fecha o la causa de la defunción, se consideraron como casos censurados a la derecha; en consecuencia, su estado fue el correspondiente al del último contacto. Para aquellos casos en los que no se logró establecer la fecha de inicio del tratamiento, se hizo una imputación probabilística del tiempo transcurrido entre la fecha de inicio del tratamiento y la fecha de ingreso a la institución; este tiempo se adicionó al de la fecha de ingreso a la institución y esta fecha se asumió como la fecha de inicio de tratamiento.

Para el análisis de los datos se usó el programa SPSS, versión 13. Se realizaron análisis univariados para todas las variables del estudio. Para las variables categóricas, se calcularon razones y proporciones, mientras que para las variables cuantitativas se presentaron medidas de tendencia central y dispersión. El análisis de supervivencia global se hizo de forma descriptiva con el método de Kaplan-Meier y se empleó la prueba de rango logarítmico para comparar las funciones de supervivencia de aquellas variables que tenían más de una categoría. El análisis multivariado de factores de pronóstico se realizó con un modelo de regresión de Cox. Se verificaron los supuestos de riesgos proporcionales para cada factor y para el modelo global en el modelo definitivo; también, se verificó el ajuste del modelo, la ausencia de colinearidad y la presencia de valores atípicos influyentes. En el modelado se partió de uno jerárquico bien estructurado y se descartaron variables con el método paso a paso hacia atrás con un criterio de permanencia de 0,05.

Resultados

De acuerdo con el registro institucional de cáncer, entre el 1º de enero y el 31 de diciembre de 2000,

se atendieron 651 pacientes con cáncer de cuello uterino en el Instituto Nacional de Cancerología. Se excluyeron del análisis 196 pacientes: una, por no tener confirmación histopatológica; 109, por haber recibido tratamiento previo para el cáncer de cuello uterino antes de ingresar a la institución; 8, porque el cáncer de cuello uterino era un segundo tumor primario y 78, porque no fueron tratadas en la institución. Los resultados se presentan para las 455 pacientes elegibles para el estudio.

De las 455 pacientes elegibles, 152 habían muerto al final del seguimiento y 303 estaban vivas al último control, por lo que se consideraron como casos censurados. Entre las 303 pacientes que estaban vivas en el último control, 153 se habían seguido, al menos, durante cinco años. En conjunto, se logró seguir hasta la muerte o por más de cinco años a 305 (67%) pacientes.

De las 152 pacientes que murieron a causa de la enfermedad, 128 se identificaron a partir del cruce de la base de datos del registro institucional de cáncer y las bases de datos de mortalidad institucional y nacional. El estado vital se actualizó para 131 pacientes a partir de llamadas telefónicas exclusivamente; mediante este mecanismo se identificaron 16 muertes adicionales. No se actualizó el estado vital para 12 de estos casos, dado que no se logró establecer la fecha ni la causa de la defunción;

por lo tanto, se asumió que estaban vivas y, en consecuencia, fueron censurados en el seguimiento inmediatamente anterior.

Características sociodemográficas

La población de pacientes con cáncer de cuello uterino que atiende el Instituto Nacional de Cancerología es vulnerable, con un nivel escolar bajo y afiliación al régimen subsidiado (cuadro 1). Más de 80% de la población procede del distrito capital y de cinco departamentos: Bogotá (34,9%), Cundinamarca (19,1%), Tolima (10,3%), Boyacá (8,5%), Huila (5,7%) y Casanare (4,8%). Sin embargo, en el Instituto Nacional de Cancerología se atienden pacientes de prácticamente todo el país.

Características clínicas

La mayoría de las pacientes tenía tumores de tipo escamocelular; un poco más de la mitad tenía tumores mayores de 5 cm y estadios IIIB o superiores. Un porcentaje importante de las pacientes no tenía información con respecto al grado de diferenciación tumoral (cuadro 2).

Características del tratamiento

El 53,2% de las pacientes fue tratada con radio-terapia exclusivamente; este porcentaje fue mayor para los estadios más avanzados. El 23% de las pacientes se trataron con cirugía exclusivamente; este porcentaje fue mayor en

Cuadro 1. Características sociodemográficas de las pacientes con cáncer de cuello uterino tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología, 2000.

Variable	Niveles de la variable	n	%
Nivel educativo máximo alcanzado	Primaria completa o incompleta	277	60,9
	Secundaria completa o incompleta	84	18,5
	Universitaria completa o incompleta	9	2,0
	Ninguno	67	14,7
	Sin información	18	4,0
Régimen de afiliación	Subsidiado	210	46,2
	Vinculado	197	43,3
	Contributivo	43	9,5
	Otro	5	1,1
Edad al inicio del tratamiento	De 20 hasta 35 años	83	18,2
	>35 hasta 50 años	209	45,9
	>50 hasta 65 años	120	26,4
	Mayores de 65 años	43	9,5

Cuadro 2. Características clínicas de las pacientes con cáncer de cuello uterino tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología, 2000.

Variable	Niveles de la variable	n	%
Tipo histológico	Escamocelulares	415	91,2
	Adenocarcinomas	26	5,7
	Oros tipos histológicos	14	3,1
Estadio tumoral	<i>In situ</i>	93	20,4
	IA	2	0,4
	IB	55	12,1
	IIA	7	1,5
	IIB	74	16,3
	IIIB	202	44,4
	IVA	10	2,2
	IVB	8	1,8
Grado de diferenciación	Sin información	4	0,9
	Bien diferenciado	40	8,8
	Moderadamente diferenciado	81	17,8
	Mal diferenciado	29	6,4
	Indiferenciado	3	0,7
Tamaño tumoral	Sin información	302	66,4
	Tumor clínicamente indetectable	105	23,1
	Tumores entre 1 y 2 cm	2	0,4
	Tumores mayores de 2 cm hasta 5 cm	82	18,0
	Tumores entre 5 y 20 cm	244	53,6
	Sin información	22	4,8

los estadios tempranos. Las dos combinaciones más frecuentes de tratamiento fueron la radioterapia y la quimioterapia (13%), las cuales se emplearon con mayor frecuencia en pacientes en estadio IIB y IIIB. La cirugía y la radioterapia (8,1%) se emplearon con mayor frecuencia en pacientes en estadio IB. Vale la pena destacar cinco pacientes con cánceres en estadio II y III, en quienes se hizo tratamiento quirúrgico, a pesar de lo avanzado de su enfermedad (cuadro 3).

Desenlaces clínicos

De las 455 pacientes elegibles, 303 (66%) estaban vivas al finalizar el período, 144 (31,6%) habían muerto a causa de la enfermedad y 8 (1,8%) habían muerto por causas no relacionadas con la enfermedad. El tiempo medio de seguimiento para los pacientes que no murieron fue de 3,69 años, con una desviación estándar de 2,58 años. El tiempo medio hasta la muerte para los pacientes que murieron a causa de la enfermedad, fue de 1,50 años con una desviación estándar de 1,29 años. Se observaron algunos valores atípicos para el

tiempo hasta la muerte en el grupo de pacientes fallecidas (figura 1).

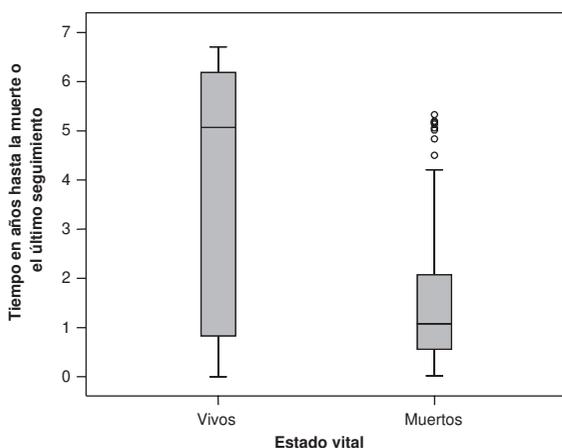
Análisis de factores de pronóstico

Considerando que sólo ocho pacientes murieron por causas intercurrentes, se presentan solamente los resultados de supervivencia global, pues las cifras de supervivencia por causa específica no tendrían mayor variación. La probabilidad acumulada de supervivencia global a cinco años fue de 58,8% y el tiempo medio de supervivencia, de 4,53 años.

Se consideraron el nivel educativo, el régimen de afiliación, el estadio de la enfermedad, el tipo histológico, la edad y el diámetro tumoral, como factores de pronóstico. Las curvas de supervivencia se compararon mediante la prueba de rangos logarítmicos; los resultados se presentan de manera resumida para cada uno de los factores analizados (cuadro 4). Los valores p de la prueba de rango logarítmico demostraron que el nivel educativo, el tamaño del tumor y el estadio tumoral parecen afectar la función de

Cuadro 3. Características del tratamiento de las pacientes con cáncer de cuello uterino tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología, 2000.

Estado clínico	Tratamientos recibidos											
	Cirugía, quimioterapia y radioterapia		Radioterapia exclusiva		Cirugía exclusiva		Cirugía y radioterapia		Radioterapia y quimioterapia		Sin información	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>In situ</i>			1	1,1	90	96,8	2	2,2				
IA					2	100,0						
IB	2	3,6	8	14,5	13	23,6	28	50,9	4	7,3		
IIA			2	28,6	1	14,3	3	42,9	1	14,3		
IIB			43	58,1					30	40,5	1	1,4
IIIB			170	84,2			2	1,0	24	11,9	6	3,0
IVA			9	90,0							1	10,0
IVB			7	87,5							1	12,5
Sin información			2	50,0			2	50,0				

**Figura 1.** Tiempo en años hasta la muerte o el último seguimiento en pacientes con cáncer de cuello uterino tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología, 2000.

supervivencia. Sin embargo, estos hallazgos se deben analizar libres de la confusión que podrían introducir los demás factores de pronóstico a través de un modelo multivariado.

Los resultados del modelo multivariado definitivo de regresión de Cox demostraron que la única variable que afectó la función de riesgo significativamente fue el estadio clínico al momento del diagnóstico (figura 2). Se encontró que el peligro de muerte es cerca de cuatro veces mayor para los pacientes con estadio clínicos I y II, cuando se comparan con pacientes con tumores *in situ*. Sin embargo, los intervalos

de confianza de la razón de peligro no fueron significativos, lo cual se atribuyó a que las diferencias de la supervivencia en estos grupos no son muy grandes y la potencia del estudio no permitió detectarlas. El riesgo de morir se incrementó en 6,2 veces para las pacientes con estadio clínico III, cuando se compararon con aquéllas con tumores *in situ*. El riesgo de muerte se incrementó hasta en 26,8 veces para las pacientes con estadio IV, cuando se compararon con aquéllas con tumores *in situ*. Los factores que previamente se habían identificado como posibles factores de pronóstico (tamaño tumoral y nivel educativo) perdieron su significancia en el modelo multivariado (cuadro 5).

Discusión

En Colombia, los estudios de supervivencia en pacientes con cáncer de cuello uterino son escasos y, en este aspecto, la combinación metodológica de revisión de historias clínicas, seguimiento telefónico y revisión de bases de datos de mortalidad, es una alternativa aplicable a instituciones que tengan un registro institucional de cáncer o de base hospitalaria. Los estudios internacionales hacen uso de esta metodología con buenos resultados (11,12).

El Instituto Nacional de Cancerología maneja un alto volumen de pacientes con cáncer de cuello uterino; sin embargo, la población de pacientes elegibles para el análisis se vio

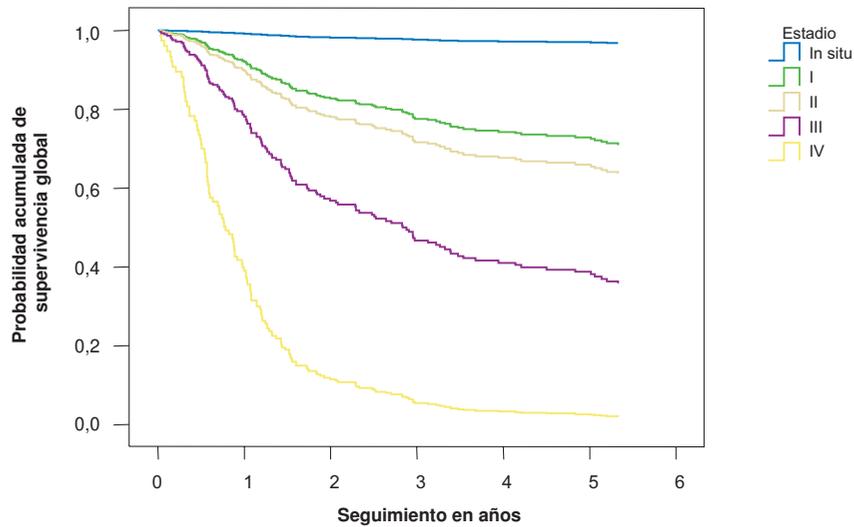


Figura 2. Función de supervivencia global para el estadio obtenida a partir del modelo multivariado de regresión de riesgos proporcionales de Cox, en pacientes con cáncer de cuello uterino tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología, 2000

Cuadro 4. Medias de supervivencia en años por factores de pronóstico evaluados en pacientes con cáncer de cuello uterino tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología, 2000.

Variable	Niveles de la variable	n	Media de supervivencia en años	p*
Nivel educativo máximo alcanzado	Ninguno	67	3,9	0,017
	Primaria completa o incompleta	277	4,6	
	Secundaria o más	93	5,1	
Régimen de afiliación	Contributivo	43	5,2	0,06
	Subsidiado	210	4,6	
	Vinculado	197	4,1	
Edad al inicio del tratamiento (años)	De 20 a 35	83	5,2	0,091
	De 35 a 50	209	4,3	
	De 35 a 65	120	4,4	
	Mayores de 65	43	4,3	
Tipo histológico	Escamocelulares	415	4,5	0,159
	Adenocarcinomas	26	5,5	
	Otros tipos histológicos	14	3,6	
Estadio tumoral	<i>In situ</i>	93	6,6	0,000
	I	57	5,5	
	II	81	5,0	
	III	202	3,4	
	IV	18	0,9	
Tamaño tumoral	Tumor clínicamente indetectable	105	6,5	0,000
	Tumores entre 1 y 5 cm	84	4,8	
	Tumores entre 5 y 20 cm	244	3,6	

* Valor p de la prueba de rango logarítmico

Cuadro 5. Razones de peligro obtenidas mediante el modelo multivariado de regresión de Cox en pacientes con cáncer de cuello uterino tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología, 2000.

Variable	Niveles de la variable	HR	IC 95%
Edad	De 20 a 35 años	1	
	De 36 a 50 años	1,08	0,61 - 1,91
	De 51 a 65 años	1,00	0,54 - 1,87
	Mayores de 65 años	0,95	0,44 - 2,06
Nivel educativo	Ninguno	1	
	Primaria	0,62	0,38 - 1,01
	Secundaria o universitaria	0,70	0,37 - 1,35
Afilación al SGSSS	Vinculados	1	
	Contributivos	0,47	0,22 - 1,04
	Subsidiados	0,95	0,66 - 1,36
Tamaño tumoral	Tumor clínicamente indetectable	1	
	Tumores entre 1 y 5 cm	3,72	0,47 - 29,21
	Tumores mayores de 5 cm	4,49	0,55 a 36,67
Estadio clínico	<i>In situ</i>	1	
	I	4,18	0,38 - 46,38
	II	3,49	0,27 - 43,83
	III	7,25	0,58 - 90,21
	IV	27,86	2,04 - 380,46
Tipo histológico	Escamocelular	1	
	Adenocarcinoma	0,46	0,18 - 1,19
	Otros	1,33	0,48 - 3,66

HR: Hazard Ratio (Razón de peligro).

IC 95%: Intervalo de confianza al 95%

reducida en 30%. Ello disminuyó la potencia que podría tener el estudio para detectar razones de peligro univariadas superiores o iguales a 1,5 con confianza del 95%, desde 88% hasta 77%, y de esta manera, limitó las posibilidades de explorar factores de pronóstico, más aún cuando se requiere de un análisis multivariado. Se destaca que una pérdida importante de pacientes elegibles estuvo relacionada con la atención fraccionada, la cual se vio reflejada en las que ingresaron con tratamientos previos o en aquéllas que ingresaron y no se trataron por causas ajenas a la institución.

La probabilidad acumulada de supervivencia global para el grupo de pacientes fue de 58,8%. La supervivencia global a cinco años para pacientes con cáncer *in situ* fue de 98,2%, mientras que la reportada en la literatura es de 100%. Para pacientes con estadios I, la supervivencia global a cinco años fue de 74,5%; la reportada varía entre 75,7% para estadio IB2 y 97,5 % para estadio IA1. Para pacientes con

estadio II, la supervivencia global a cinco años fue de 66,8%; mientras que la descrita en la literatura varía entre 65,8% para estadio IIB y 73,4% para estadio IIA. Los estadios III tuvieron una supervivencia global a cinco años de 37,4%; la informada en la literatura varía entre 39,7 % y 41,5%. Para los estadios IV, la supervivencia global a cinco años fue de 0%, mientras que la reportada en la literatura varía entre 9,3% para el estadio IVB y 22% para el estadio IVA (13). Esta única diferencia entre la supervivencia reportada y la observada puede atribuirse al bajo tamaño de muestra de casos en estadio IV, aunque también podría atribuirse a las malas condiciones sociales y de salud en que ingresan las pacientes. No se logró demostrar la relevancia de otros factores diferentes al estadio clínico, en la supervivencia de las pacientes.

Se destaca que la mayor proporción de pacientes que acuden a tratamiento tienen un nivel escolar bajo, están afiliadas al régimen subsidiado o vinculado (población vulnerable) y

están en el rango de edad entre 35 y 50 años. Estas características pueden explicar el alto porcentaje de estadios clínicos avanzados.

Un alto porcentaje de casos correspondieron a población vinculada, a pesar de que las disposiciones legales tienden a promover la afiliación al régimen subsidiado en la población pobre y, al régimen contributivo, en la población con capacidad de pago (14).

La mayoría de las pacientes tenían tumores de tipo escamocelular y 5,7% correspondía a adenocarcinomas, lo cual es concordante con la literatura, la cual establece que cerca de 85% de los cánceres de cuello uterino corresponden a carcinomas escamocelulares (15,16).

La literatura reciente ha demostrado que el uso de radioterapia concomitante con la quimioterapia en los estadios I y II, mejora la supervivencia global y libre de enfermedad (17). Sin embargo, este estudio muestra una baja práctica del uso combinado de quimioterapia y radioterapia en pacientes en estos estadios; esto puede obedecer a que estos datos se generaron de manera muy cercana al periodo en el cual se incluyeron las pacientes para este estudio. Se recomienda hacer estudios descriptivos de fechas recientes, en los cuales se evalúe el uso concomitante de quimioterapia y radioterapia en estadios I y II.

Es necesario destacar algunos casos en estadio II y III, en quienes se hizo tratamiento quirúrgico, a pesar de lo avanzado de su enfermedad. Esta terapéutica inusual estuvo relacionada con el tipo histológico de estos tumores, los cuales correspondieron en su mayoría a sarcomas de cuello uterino (18).

A pesar de que en el análisis de Kaplan-Meier se encontraron como factores de pronóstico el régimen de afiliación, el tamaño tumoral y el estadio clínico al ingreso, el modelo multivariado identificó en este estudio al estadio clínico como el único factor significativo de pronóstico en la función de riesgo. Es posible que un tamaño de muestra mayor hubiese mejorado la potencia del estudio y, en consecuencia, hubiese logrado identificar como significativos a estos factores.

En este estudio se logró un seguimiento hasta la muerte o hasta los cinco años de seguimiento de 67% de los casos con la metodología descrita, lo cual resulta satisfactorio, puesto que es un porcentaje similar al observado en series internacionales de casos.

Vale la pena resaltar que en este estudio se controlaron sesgos de información y medición que son frecuentes en este tipo de metodología. El contar con personal entrenado en metodología de registros institucionales de cáncer y en seguimiento de pacientes con cáncer, disminuyó estos sesgos. El aplicar la metodología de control de calidad empleada para los registros de cáncer, también permitió identificar algunos errores tanto de información como de digitalización y corregirlos en su totalidad.

De los resultados de la experiencia de investigación, se deben tener en cuenta algunos aspectos que permitieron tener un mayor control sobre el trabajo de investigación. El hecho de que la digitalización fuera hecha por el mismo investigador, permitió detectar de forma más precisa y oportuna las inconsistencias, las cuales se resolvieron con una nueva revisión del formato de recolección o de la historia clínica. La falta de conocimiento en tópicos relacionados con el diagnóstico o tratamiento del tumor, se logró superar con el apoyo de un ginecólogo oncólogo y un especialista en radioterapia.

Es importante contar con fuentes de información, como las bases nacionales de datos de mortalidad general, las cuales permiten actualizar el estado vital de un número importante de registros. Sin embargo, la calidad de la información encontrada en la causa básica de defunción no es buena, ya que existen algunas inconsistencias. El cruce de información permitió identificar, en el certificado de defunción, algunos casos en los que el tumor había sido mal identificado como un tumor de otros sitios o de sitios mal definidos.

El contacto telefónico con las pacientes se convierte en un proceso dispendioso por el continuo cambio de vivienda de las pacientes. Entre las pacientes que tienen su residencia habitual fuera de Bogotá fue difícil el contacto, pero, también, se hizo patente que los

teléfonos consignados en la historia clínica no corresponden, porque la persona ya no vive allí, la línea ha sido desactivada o quienes contestan la llamada afirman no conocer a la persona por la cual se está indagando.

El cumplimiento del tratamiento instaurado en el Instituto Nacional de Cancerología no fue posible, principalmente, en las pacientes residentes fuera de Bogotá, de lo que se derivan la mayoría de las pérdidas en el seguimiento. Esta situación resulta relevante en un cáncer como el de cuello uterino, el cual tiene una reglamentación establecida para su detección temprana dentro del Sistema General de Seguridad Social. Las dificultades mencionadas ameritan una revisión de las causas existentes en la cobertura, oportunidad y autorización de los tratamientos, por parte de las aseguradoras.

Los resultados obtenidos permiten recomendar el desarrollo de estudios en cohortes más grandes y de fechas más recientes, de tal manera que permitan determinar el efecto de la implementación de la quimioterapia y radioterapia concomitantes, y aumentar la potencia del estudio, para así poder identificar otros factores de pronóstico que no fueron significativos en este estudio, probablemente por el tamaño de la muestra.

Agradecimientos

A Natascha Ortiz, del Instituto Nacional de Cancerología, y Patricia Arce, de Estadísticas Vitales de la Secretaría Distrital de Salud. A William Marzán y Julieth Castro, por su colaboración en el proceso de recolección de la información, y al Grupo Archivo de Historias Clínicas del Instituto Nacional de Cancerología.

Conflicto de intereses

No existe ninguno.

Financiación

Este estudio fue financiado con recursos propios de los investigadores.

Referencias

1. **Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM.** Globocan 2002 cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC CancerBase No. 5, version 2.0. Lyon: IARC Press; 2004.
2. **República de Colombia, Sistema Nacional de Salud, Instituto Nacional de Cancerología.** Normas técnicas y administrativas. Guía de implantación, detección y control de cáncer de cuello uterino. Bogotá: Imprenta Nacional; 1994.
3. **República de Colombia, Ministerio de Salud.** Resolución 00412 de 2000 (25 de febrero), por la cual se establecen las actividades, procedimientos e intervenciones de demanda inducida y obligatorio cumplimiento y se adoptan las normas técnicas y guías de atención para el desarrollo de las acciones de protección específica y detección temprana y la atención de enfermedades de interés en salud pública. Diario oficial No. 49.956, 31 de marzo de 2000. Bogotá D.C.: Ministerio de Salud; 2000.
4. **República de Colombia, Ministerio de la Protección Social.** Política nacional de salud sexual y reproductiva. Bogotá: Ministerio de la Protección Social; 2000. Fecha de consulta: 23 de octubre de 2008. Disponible en: <http://www.minproteccionsocial.gov.co/vbecontent/library/documents/DocNewsNo15132DocumentNo1893.PDF>.
5. **Eifel P, Berek J, Markman M.** Cancer of the cervix, vagina, and vulva. In: DeVita V, Hellman S, Rosenberg S, editors. Cancer principles and practice of oncology. 8th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. p. 1496-543.
6. **Pérez C, Kavanagh B.** Uterine cervix. In: Halperin E, Pérez C, Brady L, editors. Pérez and Brady's principles and practice of radiation oncology. 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. p. 1533-609.
7. **Sankaranarayanan R, Madhukar-Budukh A, Rajkumar R.** Effective screening programs for cervical cancer in low- and middle-income developing countries. Bull World Health Organ. 2001;79:954-62.
8. **Instituto Nacional de Cancerología.** Anuario estadístico 2004. Bogotá, D.C.: Instituto Nacional de Cancerología; 2005. Fecha de consulta: 23 de octubre de 2008. Disponible en: http://www.incancerologia.gov.co/documentos/2_9_2006_2_56_34_PM_Páginas%20interiores_total.pdf
9. **Dos Santos I.** Introducción al análisis de la supervivencia. En: Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer. Epidemiología del cáncer: principios y métodos. Lyon, Francia: Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC); 1999. p. 279-93.
10. **Jensen OM, Parkin DM, Mac Lennan R, Muir CS, Skeet RG.** Análisis de supervivencia. En: Registros de cáncer: principios y métodos. Publicación científica No. 95. Lyon, Francia: Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC); 1995. p. 153-72.
11. **Lea JS, Sheets EE, Wenham RM, Duska LR, Coleman RL, Miller DS, et al.** Stage IIB–IVB cervical adenocarcinoma: prognostic factors and survival. Gynecol Oncol. 2002;84:115-9.

12. **Farley JH, Hickey KW, Carlson JW, Rose GS, Kost ER, Harrison TA.** Adenosquamous histology predicts a poor outcome for patients with advanced-stage, but not early-stage, cervical carcinoma. *Cancer*. 2003;97:2196-202.
13. **Quinn MA, Benedet JL, Odicino F, Maisonneuve P, Beller U, Creasman WT, et al.** Carcinoma of the *cervix uteri*. FIGO 6th Annual report on the results of treatment in gynecological cancer. *Int J Gynaecol Obstet*. 2006;95(Suppl.1):S43-103.
14. **Céspedes JE, Jaramillo I, Martínez R, Olaya S, Reynales J, Uribe C, et al.** Efectos de la reforma de la seguridad social en salud en Colombia sobre la equidad en el acceso y la utilización de servicios de salud. *Rev Salud Pública*. 2000;2:145-64.
15. **Rubin P, Williams J.** Carcinoma de cérvix uterino. En: Rubin P, editor. *Oncología clínica: Enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes*. Octava edición. Madrid: Elsevier Science; 2003. p. 463-77.
16. **Murphy G, Lawrence W, Lenhard R.** *Oncología clínica. Manual de la American Cancer Society*. Publicación científica No. 559. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 1996.
17. **Green J, Kirwan J, Tierney J, Vale C, Symonds P, Fresco L, et al.** Concomitant chemotherapy and radiation therapy for cancer of the uterine cervix. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005;CD002225.
18. **Reed N.** The management of uterine sarcomas. *Clin Oncol*. 2008;20:470-78.

ARTÍCULO ORIGINAL

***In vitro* susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole**

Katherine Paola Luna¹, Indira Paola Hernández¹, César Mauricio Rueda¹,
María Magdalena Zorro¹, Simon L. Croft², Patricia Escobar¹

¹ Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CINTROP), Facultad de Salud, Escuela de Medicina, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Industrial de Santander, Piedecuesta, Santander, Colombia.

² Department of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, United Kingdom

Introduction. The current chemotherapy for Chagas disease is unsatisfactory with only two drugs available for treatment. Research to discover new drugs for Chagas disease is urgent. Hexadecyl-phosphocholine (HPC, miltefosine) has been demonstrated to have *in vitro* activity against *Trypanosoma cruzi* parasites, but its activity on different Colombian *T. cruzi* strains is not known.

Objective. To evaluate the *in vitro* susceptibility of *T. cruzi* strains isolated from humans and vectors in Santander, Colombia, to miltefosine, nifurtimox and benznidazole.

Materials and methods. Eight *T. cruzi* Colombian strains and three reference strains (Esmeraldo, SilvioX10 and Y) were studied. Drug activities against extracellular epimastigotes and intracellular amastigotes were determined by microscopic counting. The results were expressed as the concentrations that inhibited 50% and 90% growth (IC₅₀ and IC₉₀).

Results. For miltefosine a similar range of drug activity was observed against all the Colombian strains, all parasites being more susceptible to miltefosine than to the reference drugs. The intracellular amastigotes were more susceptible to miltefosine (IC₅₀ 0.08 to 0.63 µM and IC₉₀ 0.21 to 2.21 µM) than extracellular forms (IC₅₀ <0.92 to 2.29 µM and IC₉₀ 1.38 to 4.76 µM). For reference drugs, parasites were more susceptible to nifurtimox than to benznidazole and some differences in activity of benznidazole between *T. cruzi* strains was observed.

Conclusions. The results showed the significant *in vitro* activity of miltefosine against *T. cruzi* stages, and the expected results for the reference drugs. Further *in vivo* studies with miltefosine are planned.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, miltefosine, benznidazole, nifurtimox, drug therapy, Colombia.

Susceptibilidad *in vitro* a hexadecilfosfocolina (miltefosina), nifurtimox y benznidazole de cepas de *Trypanosoma cruzi* aisladas en Santander, Colombia

Introducción. Los tratamientos actuales para la enfermedad de Chagas son insatisfactorios y sólo existen dos medicamentos disponibles. La búsqueda de alternativas terapéuticas es prioritaria. La hexadecilfosfocolina (miltefosina) ha mostrado actividad *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi*. Sin embargo, su actividad en aislamientos de *T. cruzi* obtenidos en Colombia aún no ha sido reportada.

Objetivo. Evaluar la susceptibilidad *in vitro* a miltefosina, nifurtimox y benznidazole de cepas de *T. cruzi* aisladas de humanos y vectores en Santander, Colombia.

Materiales y métodos. Se evaluó la susceptibilidad de los tres medicamentos en ocho cepas colombianas de *T. cruzi* y tres cepas de referencia: Esmeraldo, Silvio X10 y Y. La actividad de los compuestos fue determinada en epimastigotes extracelulares y amastigotes intracelulares, por conteo microscópico. Los resultados se expresaron en concentraciones inhibitorias 50 y 90 (CI₅₀ y CI₉₀).

Resultados. Para la miltefosina, se observaron rangos similares en la actividad del medicamento entre las cepas colombianas; todos los parásitos fueron más susceptibles a la miltefosina que a los medicamentos de referencia. Los amastigotes intracelulares fueron más sensibles a la miltefosina (CI_{50} , 0,08 a 0,63 μ M y CI_{90} , 0,21 a 2,21 μ M) que las formas extracelulares (CI_{50} , <0,92 a 2,29 μ M y CI_{90} , 1,38 a 4,76 μ M). En los medicamentos de referencia, los parásitos fueron más susceptibles al nifurtimox que al benznidazole. Se observaron algunas diferencias en la actividad del benznidazole en las cepas estudiadas de *T. cruzi*.

Conclusiones. Los resultados obtenidos de la actividad *in vitro* de miltefosina y de los medicamentos de referencia contra aislamientos de *T. cruzi* son satisfactorios y serán considerados en estudios posteriores *in vivo*.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, enfermedad de Chagas, miltefosina, benznidazol, nifurtimox, quimioterapia, Colombia.

Chagas disease, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), constitutes one of the largest parasitic disease burdens in Latin America where approximately 13-15 million of people are affected (1). *Trypanosoma cruzi* strains are divided into two main well-defined groups called *T. cruzi* I and *T. cruzi* II; five subgroups have been identified inside the *T. cruzi* II group (IIa, IIb, IIc, IId and IIe) (2). In Colombia, 5% of the population is infected in endemic areas and the predominance of *T. cruzi* I has been reported (3-7). The Santander Province is one of the territorial divisions where the prevalence of infection is highest (8,9). No vaccines are available, and the chemotherapy remains precarious with only two available drugs, the nitrofurán derivative, nifurtimox (Lampit, Bayer) and 2-nitroimidazole benznidazole (Radanil, Roche). Both are restricted mainly to the treatment of the acute phase or the congenital infection (10,11). Currently, these drugs have severe limitations, including high frequency of undesirable side effects, long protocols of treatment, and limited efficacy and availability (12,13). The research to discover new drugs for the treatment of Chagas disease is imperative.

Hexadecylphosphocholine (HPC; miltefosine), an alkylphosphocholine developed initially as an anticancer drug, constitutes the first oral treat-

ment for visceral and cutaneous leishmaniasis (14,15). It shows a broad spectrum of drug activity on several types of parasites such as *Leishmania* spp., *T. cruzi* and *Entamoeba histolytica* (16). In *T. cruzi* models, it is active against free and intracellular live forms of parasites as well as strains with different levels of susceptibility to benznidazole (17,18). Its mechanism of action is not clear, but parasite membranes are probably the primary target, possibly by interference with lipid metabolism (18,19). Additionally, synergism of miltefosine or edelfosine (another alkyl-phospholipid drug) in combination with ketoconazole has also been demonstrated (18-20).

The purpose of the current study was to evaluate the *in vitro* activities of miltefosine, nifurtimox and benznidazole against Colombian *T. cruzi* strains, as well as against the Silvio X10, Esmeraldo and Y reference strains.

Materials and methods

Parasites

Eight strains of *T. cruzi*, isolated from various hosts by hemoculture and xenoculture, were used (Luna KP, Jaramillo CL, Gutierrez R, Esteban L, Angulo VM. Aislamiento de *T. cruzi* en pacientes en fase crónica de la enfermedad de Chagas por medio de hemocultivo y xenocultivo. Biomédica. 2003;23 (Supl.1):119). They have been previously characterized by amplification of the mini-exon gene nontranscribed spacer (Gutierrez R, Luna KP, Angulo VM, Fernandes O. Eficiencia de los métodos parasitológicos de diagnóstico y caracterización de poblaciones de *Trypanosoma cruzi* en un área endémica de

Correspondence:

Patricia Escobar, CINTRÓP, Facultad de Salud, Escuela de Medicina, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
Teléfono/fax: (0057) 656 3971
pescobar@uis.edu.co

Recibido: 28/11/08; aceptado:08/04/09

Chagas. *Biomédica*. 2003;23 (Supl.1):119-20). Parasites originated from the domestic cycle in the biogeographical area of Santander, Colombia (Table 1). In addition, *T. cruzi* reference strains Silvio X10 (*T. cruzi* I) Esmeraldo and Y (*T. cruzi* II) were used. The parasites were maintained by serial passage in Liver Infusion Tryptose (LIT) medium supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (hiFCS, Gibco, USA) and hemin (10 mg/L, Sigma) at 28 °C. They were used within four passages of isolation.

Drugs

Hexadecylphosphocholine (HPC, miltefosine) was obtained from A.G Scientific, INC, nifurtimox from Bayer (Germany) and benznidazole from Roche (Switzerland). Nifurtimox and benznidazole were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The final DMSO concentration did not exceed 1% (v/v). Miltefosine was dissolved directly in culture medium. Working solutions were prepared in LIT or RPMI 1640 culture media immediately before the assays.

Epimastigotes assay

Parasites were harvested during the exponential growth phase, diluted in LIT to 5×10^5 parasites/mL and incubated in a three-fold dilution series of miltefosine (0.92-25.0 μ M), nifurtimox (1.1-261 μ M) and benznidazole (1.2-288 μ M) in 96 well multiwell plates (Becton Dickinson, New Jersey, USA), for 72 h at 28 °C. Each drug

concentration was evaluated in triplicate and control cultures were maintained without drug. Parasite inhibition was determined microscopically by counting parasite numbers in a Neubauer haemocytometer.

Intracellular amastigotes assay

Vero cells, diluted to 3×10^5 cells/mL in RPMI 1640 medium plus 10% hiFCS, were plated in 16-well Lab-tek™ tissue culture chamber slides (Life Technologies, Paisley, UK) and allowed to adhere for 24 h at 37 °C in a 5% CO₂-95% air mixture. Adherent cells were infected with tissue derived trypomastigotes (TDT) at a ratio of parasites to cells of 10:1. The cultures were maintained in a 5% CO₂-95% air mixture at 37 °C. TDT were obtained by successive serial infections in Vero cells with released parasites from culture supernatants. Reference strains and the 215 strain were not tested in the amastigote assay due to a failure to generate sufficient TDT to infect cells. After 24 h, free parasites were removed by washing and infected cultures were incubated for 72 h with three fold dilution series of miltefosine (0.04 to 3.30 μ M), nifurtimox (0.3-87.0 μ M) and benznidazole (1.2 to 96.0 μ M) for 72 h at 37 °C, in a 5% CO₂-95% air mixture. The cultures were then fixed with methanol and stained with Giemsa. Each drug concentration was evaluated in quadruplicate and control cultures were maintained without drug. Drug activity was determined by the percentage of infected cells in treated and untreated cultures.

Statistical analyses

The drug activities were expressed as the drug concentration needed to inhibit to 50% or 90% of parasite growth (IC₅₀ and IC₉₀). They were calculated by sigmoidal regression analysis (Mxflfit™; ID Business Solution, Guildford, UK). Results were expressed as mean \pm standard deviation (SD) and statistical significance was determined by Student t test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. Each experiment was repeated twice.

Results

The activities of miltefosine, nifurtimox, and benznidazole against *T. cruzi* epimastigotes are

Table 1. *Trypanosoma cruzi* parasites strains used in this study.

Parasite strains	Classification ^a	Host
215	Z3	Human
209	<i>T. cruzi</i> I	Human
204	<i>T. cruzi</i> I	Human
132	<i>T. cruzi</i> I	Human
070I06	<i>T. cruzi</i> I	<i>Rhodnius prolixus</i>
320I01	<i>T. cruzi</i> I	<i>R. prolixus</i>
421I02	<i>T. cruzi</i> I	<i>Triatoma dimidiata</i>
187401	<i>T. cruzi</i> I	<i>T. dimidiata</i>
Silvio X10	<i>T. cruzi</i> I	Human
Esmeraldo	<i>T. cruzi</i> II	Human
Y	<i>T. cruzi</i> II	Human

^a Classification from amplification of mini-exon gene non-transcribed spacer by Fernández, et al., 2001 (Gutiérrez, et al., 2003)

shown in table 2. All Colombian *T. cruzi* strains were more susceptible to miltefosine ($IC_{50} < 0.92$ to $2.29 \pm 1.08 \mu\text{M}$ and $IC_{90} 1.38 \pm 0.08$ to $4.76 \pm 1.54 \mu\text{M}$) and nifurtimox ($IC_{50} 2.25 \pm 0.34$ to $5.05 \pm 1.70 \mu\text{M}$ and $IC_{90} 12.80 \pm 1.24$ to $26.38 \pm 2.09 \mu\text{M}$) than to benznidazole ($IC_{50} 9.34 \pm 0.78$ to $27.30 \pm 1.81 \mu\text{M}$ and $IC_{90} 60.00 \pm 29.05$ to $>288 \mu\text{M}$). Reference strains showed considerable variation in drug sensitivity: Esmeraldo was the least susceptible to miltefosine ($IC_{50} 3.92 \pm 0.51 \mu\text{M}$ and $IC_{90} 7.13 \pm 0.70 \mu\text{M}$) and Y was the least susceptible to benznidazole ($IC_{50} 20.35 \pm 3.04 \mu\text{M}$ and $IC_{90} >288 \mu\text{M}$). The results were reproducible in the two independent experiments.

The activity range of miltefosine, nifurtimox and benznidazole against *T. cruzi* intracellular amastigotes is shown in table 3. All *T. cruzi* strains were highly susceptible to miltefosine ($IC_{50} 0.082 \pm 0.01$ to $0.63 \pm 0.13 \mu\text{M}$ and $IC_{90} 0.21 \pm 0.70$ to $2.21 \pm 0.07 \mu\text{M}$). Nifurtimox and benznidazole were also active against intracellular amastigotes but with lower values than miltefosine.

Variation in the activity of miltefosine against each life cycle stage was observed. Intracellular amastigotes were more sensitive than epimastigotes ($p=0.0000$) (tables 2 and 3). Additionally, comparisons of values of IC_{50} and

IC_{90} between genetic groups (*T. cruzi* I and *T. cruzi* II) showed no significant difference, with one except for nifurtimox which showed significant differences in IC_{90} values ($p=0.0001$) (figure 1).

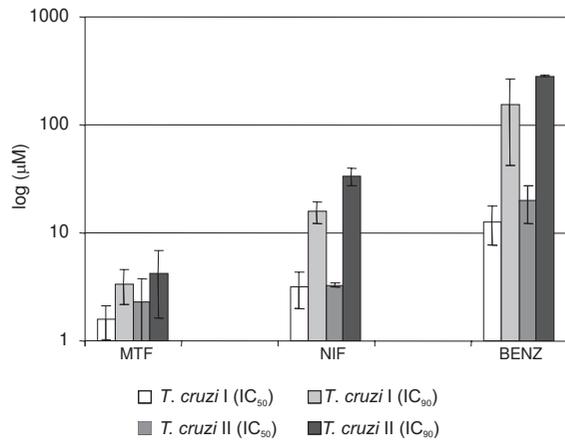


Figure 1. Susceptibility of *T. cruzi* I and *T. cruzi* II epimastigotes to miltefosine, nifurtimox and benznidazole.

MTF: miltefosine; NIF: nifurtimox, BENZ: benznidazole, IC_{50} and IC_{90} : drug concentration to inhibit 50 or 90 percent of epimastigotes. The each bar represents the mean \pm SD obtained from triplicate wells of a representative experiment. Values of p for each case were: IC_{50} : MTF ($p=0.68$) NIF ($p= 1.00$) BENZ ($p= 0.09$) and IC_{90} MTF ($p=0.46$) BENZ (0.1989) NIF ($p=0.0001$). $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Table 2. In vitro activities of miltefosine, nifurtimox and benznidazole against extracellular epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* parasites.

Parasite code	Miltefosine		Nifurtimox		Benznidazole	
	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}
215	1.17±0.04	2.06±0.14	<3.2	26.38±2.09	27.30±1.81	>288
209	1.75±0.19	3.60±0.27	5.05±1.71	16.06±2.94	21.03±3.55	>288
204	0.93±0.01	2.36±0.05	4.24±0.32	17.56±1.85	20.39±1.22	>288
132	0.96±0.04	2.36±0.16	3.81±1.91	15.11±2.47	11.65±4.15	114.46±29.76
070I06	<0.92	1.38±0.08	2.25±0.34	21.60±2.04	11.40±0.43	66.70±11.51
320I01	2.29±1.08	4.22±1.29	2.47±0.50	18.76±7.67	9.48±2.31	60.00±29.05
421I02	1.96±0.67	4.76±1.54	3.80±1.22	12.80±1.24	11.34±3.31	>288
1874-01	1.97±0.09	4.61±0.38	2.31±0.27	14.39±1.08	9.34±0.78	61.48±5.92
SilvioX10	1.85±0.28	3.82±0.48	1.56±0.40	10.58±0.71	7.33±1.53	27.39±3.72
Esmeraldo	3.92±0.51	7.13±0.70	<3.2	38.84±7.50	12.12±0.49	277.91±43.12
Y	1.73±0.16	3.50±0.26	3.50±0.58	35.28±9.47	20.35±3.04	>288

IC_{50} and IC_{90} : drug concentration to inhibit 50 or 90 percent of epimastigotes growth. Data are displayed as mean \pm SD of two independent experiments performed in triplicate. Miltefosine was more effective against epimastigotes of *T. cruzi* than nifurtimox ($p=0.004$) and benznidazole ($p<0.001$).

Table 3. In vitro activities of miltefosine, nifurtimox and benznidazole against intracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* parasites infecting Vero cells.

Parasite code	No. Exp	% inf	$\mu\text{M} \pm \text{SD}$					
			Miltefosine		Nifurtimox		Benznidazole	
			IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀
209	1	43.6	0.16±0.005	0.44±0.06	>1.1	7.35±4.52	3.66±0.10	23.09±5.94
	2	43.9	0.22±0.07	0.45±0.08	1.31±0.37	6.82±4.04	5.90±0.81	23.72±16.73
204	1	66.8	0.213±0.04	0.98±0.22	1.80±0.48	9.63±7.15	8.16±1.77	46.46±23.64
	2	66.5	0.22±0.003	0.72±0.09	1.43±0.26	5.03±2.95	6.32±1.38	74.14±15.14
132	1	47.3	0.10±0.006	0.34±0.13	1.82±0.35	6.63±1.91	5.98±0.76	25.37±8.58
	2	66.5	0.34±0.08	2.12±0.11	1.52±0.43	8.94±5.02	11.49±3.26	66.92±21.68
070I06	1	97.9	0.63±0.13	0.91±0.07	2.62±0.48	9.98±3.67	7.72±1.47	58.60±13.60
	2	89.7	0.082±0.01	0.21±0.07	1.45±0.28	5.17±3.12	5.73±1.10	38.61±17.40
320I01	1	45	0.09±0.02	1.31±0.16	ND	ND	5.93±1.43	>96
	2	70	0.21±0.003	0.43±0.05	3.44±0.43	11.37±1.50	6.16±1.14	29.18±14.55
421I02	1	38.8	0.33±0.03	0.51±0.19	1.63±0.51	44.83±12.30	3.33±0.424	30.69±1.98
	2	69.6	0.13±0.03	1.99±0.87	3.23±1.72	>87	13.38±5.21	>96
187401 I	1	72.7	0.44±0.08	1.56±0.80	3.55±2.05	22.90±8.71	22.03±8.07	>96
	2	78.4	0.13±0.03	1.00±0.43	0.47±0.24	28.34±4.23	6.81±3.70	14.00±8.80
Y*		ND	0.7 ± 0.2	ND	2.7	ND	ND	ND

% inf: percent of infection before drug treatment; No. Exp: number of experiment; IC₅₀ and IC₉₀: drug concentration to inhibit 50 or 90 percent of parasite growth; ND: not determined. *Croft S, *et al.* 1996 (24).

Data are displayed as mean \pm SD, as obtained from quadruplicate wells. Miltefosine was more effective against intracellular amastigotes of *T. cruzi* than nifurtimox ($p=0.0003$) and benznidazole ($p<0.0001$)

Discussion

Differences in the drug susceptibility of *T. cruzi* strains according to genetic group, host and geographical origin have been described (21-23). However, investigations performed to date have mainly evaluated susceptibilities to benznidazole and nifurtimox. Both of these standard drugs have limited efficacy in the chronic form of Chagas disease and they produce toxic side effects (12). Therefore, there is an urgent need for studies that evaluate the activity of new anti-trypanosomal drugs.

This is the first study that shows the in vitro susceptibility to miltefosine of *T. cruzi* strains isolated from humans and vectors in a Colombian endemic area. All the parasites strains and stages tested were highly susceptible to miltefosine. Similar results were obtained by other authors using *T. cruzi* reference strains confirming the broad activity of this drug (17-19,24). Miltefosine was significantly more active against intracellular amastigotes than epimastigotes ($p<0.001$) (table 3). This has been demonstrated in earlier studies

as well (17,19). Initially, phospholipid-derived drugs were discovered as a new class of biological response modifiers, with therapeutic activity in cancer mediated by an increase in the cytotoxic properties of macrophages (25).

Saraiva *et al.* (2002) observed that miltefosine may activate macrophages *in vitro* and the antiparasitic activity of this compound on intracellular amastigotes was independent of nitric oxide production (17). The participation of some cytokines was suggested. However, the host cell mechanisms involved in the inhibition or parasite killing after miltefosine treatment is still unclear.

Against *Leishmania* parasites, a significant variation of the *in vitro* susceptibility to miltefosine has been described for several species of *Leishmania* (26). In patients with cutaneous leishmaniasis, it is more effective in lesions caused by *L. panamensis* as compared to those by *L. braziliensis* (27). In contrast with the results obtained in the present study, miltefosine was found to be more active against promastigotes of *Leishmania* than against intracellular

amastigotes infecting bone marrow derived macrophages (26). This difference with *T. cruzi* may be due to intrinsic differences of both parasites. However, Croft (2003) proposed that in comparative studies between extracellular and intracellular stages one must consider that: (i) the effective drug concentration in host cells may be higher or lower than that outside the cells, (ii) the division rates of the stages differ, or (iii) the assay temperatures may differ (16).

In experimental *in vivo* models, miltefosine has also proved to be active against Leishmania and *T. cruzi* when it was administered orally (17,21,28,29). Unfortunately, only two studies with *T. cruzi* have been reported; both showed a suppressive effect against *T. cruzi* on BALB/c-infected mice, although they used different protocols of treatment and infection (17,21). Further research in a murine or another more appropriate *in vivo* model is necessary to determine aspects such as pharmacokinetic properties, dose-response relationship and protocols of treatment.

We also investigated the susceptibility of *T. cruzi* strains to two nitroheterocyclic compounds (nifurtimox and benznidazole). Although all strains were susceptible to both drugs, we noted that nifurtimox was more active than benznidazole both in epimastigotes ($p < 0.001$) and intracellular amastigotes ($P = 0.0004$). Benznidazole showed greater variation in its activity against different Colombian *T. cruzi* strains. This could be related to the different mechanisms of action of both drugs (30,31). Additionally, in contrast to the results obtained with miltefosine, the epimastigotes of strains isolated from vectors were more susceptible to nifurtimox ($p = 0.03$) and benznidazole ($p = 0.01$) than those isolated from humans (table 2). Several studies have reported a wide variation in the susceptibility of a large number of *T. cruzi* strains isolated from different hosts and geographic areas to these nitroheterocyclic compounds (22,23,32-34). The existence of predominant strains with particular levels of susceptibility to these drugs in specific geographical areas has been also reported (22,23). In these cases, the parasite drug susceptibility before clinical treatment must

be considered as a factor. Moreover, for a better understanding of the response to drugs, the local strains should be characterized genetically and biologically, as completed in this study (Luna KP, Jaramillo CL, Rueda CM, Hernández IP, Zorro MM, Angulo VM, *et al.* Biological and genetic characteristics of *Trypanosoma cruzi* isolates from an endemic area of Santander, Colombia. Bol Malariol Sal Amb. 2007;47 (Supl 1):139-40).

Many authors have explored possible links between the phylogenetic diversity of *T. cruzi* and biological properties (24,35-38). Correlations between the susceptibility to benznidazole and genetic groups of *T. cruzi* have been described (24,38). However, in the current study, no significant differences were observed in the drug susceptibility *in vitro* between *T. cruzi* I and *T. cruzi* II strains (figure 1). This is in agreement with Villareal *et al.* (2004) (39), although due to the low number of strains analyzed in the current work, the results obtained must be considered as preliminary data.

In conclusion, the current *in vitro* study described the susceptibility to miltefosine, nifurtimox and benznidazole of *T. cruzi* strains isolated from humans and vectors in the same transmission area of Chagas disease in Colombia. Miltefosine showed greater activity than the used reference drugs and no differences in the susceptibility according to host origin were observed. These were considered promising results. Further investigation with these strains in murine models of experimental Chagas disease will be necessary to establish the potential of miltefosine for the treatment of human Chagas disease before undertaking clinical studies.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest on the results published in this paper.

Financing

This work was supported by the Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología "Francisco Jose de Caldas" Colciencias (Grant 1102-04-12928) and by the Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

References

- World Health Organization.** Tropical disease research, progress 2003-2004: 17th Programme Report of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Report No. 17. Geneva: WHO; 2005.
- Brisse S, Barnabe C, Tibayrenc M.** Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol.* 2000;30:35-44.
- Saravia NG, Holguin AF, Cibulskis RE, D'Alessandro A.** Divergent isoenzyme profiles of sylvatic and domiciliary *Trypanosoma cruzi* in the eastern plains, piedmont, and highlands of Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 1987;36:59-69.
- Ruiz-García M, Montilla M, Nicholls SO, Angarita L, Álvarez D.** Genetic relationships and spatial genetic structure among clonal stocks of *Trypanosoma cruzi* in Colombia. *Heredity.* 2000;85:318-27.
- Cuervo P, Cupolillo E, Segura I, Saravia N, Fernandes O.** Genetic diversity of Colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the ribosomal DNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97:877-80.
- Montilla MM, Guhl F, Jaramillo C, Nicholls S, Barnabe C, Bosseno MF, et al.** Isoenzyme clustering of Trypanosomatidae Colombian populations. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66:394-400.
- Salazar A, Schijman AG, Triana-Chávez O.** High variability of Colombian *Trypanosoma cruzi* lineage I stocks as revealed by low-stringency single primer-PCR minicircle signatures. *Acta Trop.* 2006;100:110-8.
- Moncayo A.** Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98:577-91.
- Gutiérrez R, Angulo VM, Tarazona Z, Britto C, Fernandes O.** Comparison of four serological tests for the diagnosis of Chagas disease in a Colombian endemic area. *Parasitology.* 2004;129:439-44.
- Sosa S, Segura E.** Tratamiento de la infección por *Trypanosoma cruzi* en fase indeterminada. Experiencia y normatización actual en la Argentina. *Medicina.* 1999;59(Suppl.2):166-70.
- Lauria-Pires L, Braga MS, Vexenat AC, Nitz N, Simoes-Barbosa A, Tinoco DL, et al.** Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;63:111-8.
- Urbina JA, Docampo R.** Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* 2003;19:495-501.
- Jannin J, Villa L.** An overview of Chagas disease treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102(Suppl.1):95-7.
- Bhattacharya SK, Sinha PK, Sundar S, Thakur CP, Jha TK, Pandey K, et al.** Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2007;196:591-8.
- Soto J, Soto P.** Miltefosina oral para el tratamiento de la leishmaniasis. *Biomédica.* 2006;26(Suppl.1):207-17.
- Croft SL, Seifert K, Duchene M.** Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. *Mol Biochem Parasitol.* 2003;126:165-72.
- Saraiva VB, Gibaldi D, Previato JO, Mendonca-Previato L, Bozza MT, Freire-De-Lima CG, et al.** Proinflammatory and cytotoxic effects of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:3472-7.
- Lira R, Contreras LM, Rita RM, Urbina JA.** Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of *in vitro* activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. *J Antimicrob Chemother.* 2001;47:537-46.
- Santa-Rita RM, Santos H, Meirelles MN, de Castro SL.** Effect of the alkyl-lysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 2000;75:219-28.
- Santa-Rita RM, Lira R, Barbosa HS, Urbina JA, de Castro SL.** Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55:780-4.
- Andrade SG, Andrade V, Brodskyn C, Magalhaes JB, Netto MB.** Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol.* 1985;79:397-407.
- Filardi LS, Brener Z.** Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81:755-9.
- Revollo S, Oury B, Laurent JP, Barnabe C, Quesney V, Carriere V, et al.** *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Exp Parasitol.* 1998;89:30-9.
- Croft SL, Snowdon D, Yardley V.** The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J Antimicrob Chemother.* 1996;38:1041-7.
- Klenner T, Beckers T, Nooter K, Holtmann H.** Influence of hexadecylphosphocholine (miltefosine) on cytokine synthesis and biological responses. *Adv Exp Med Biol.* 1996;416:181-7.
- Escobar P, Matu S, Marques C, Croft SL.** Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine

- (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Trop.* 2002;81:151-7.
27. **Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Díaz A, et al.** Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 2004;38:1266-72.
 28. **Escobar P, Yardley V, Croft SL.** Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), AmBisome, and sodium stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient scid mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1872-5.
 29. **Murray HW, Delph-Etienne S.** Visceral leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) in mice deficient in T cells and activated macrophage microbicidal mechanisms. *J Infect Dis.* 2000;181:795-9.
 30. **Maya JD, Repetto Y, Agosin M, Ojeda JM, Téllez R, Gaule C, et al.** Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1997;86:101-6.
 31. **de Castro SL.** The challenge of Chagas' disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 1993;53:83-98.
 32. **Andrade SG, Rassi A, Magalhaes JB, Ferrioli Filho F, Luquetti AO.** Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992;86:624-6.
 33. **Toledo MJ, Guilherme AL, da Silva JC, de Gasperi MV, Mendes AP, Gomes ML, et al.** *Trypanosoma cruzi* chemotherapy with benznidazole in mice inoculated with strains from Parana state and from different endemic areas of Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1997;39:283-90.
 34. **Murta SM, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ.** Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol.* 1998;93:203-14.
 35. **Laurent JP, Barnabe C, Quesney V, Noel S, Tibayrenc M.** Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology.* 1997;114:213-8.
 36. **de Lana M, da Silveira A, Barnabe C, Quesney V, Noel S, Tibayrenc M.** *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol.* 1998;90:20-5.
 37. **Toledo MJ, de Lana M, Carneiro CM, Bahia MT, Machado-Coelho GL, Veloso VM, et al.** Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. *Exp Parasitol.* 2002;100:161-72.
 38. **Toledo MJ, Bahia MT, Carneiro CM, Martins-Filho OA, Tibayrenc M, Barnabe C, et al.** Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:223-30.
 39. **Villarreal D, Barnabe C, Sereno D, Tibayrenc M.** Lack of correlation between *in vitro* susceptibility to benznidazole and phylogenetic diversity of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Exp Parasitol.* 2004;108:24-31.

ARTÍCULO ORIGINAL

Evaluación de los efectos del glifosato y otros plaguicidas en la salud humana en zonas objeto del programa de erradicación de cultivos ilícitos

Marcela Varona¹, Gloria Lucía Henao², Sonia Díaz¹, Angélica Lancheros¹, Álix Murcia¹, Nelcy Rodríguez³, Víctor Hugo Álvarez⁴

¹ Grupo de Salud Ambiental, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

² Grupo de Factores de Riesgo Ambiental, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

³ Grupo de Métodos en Bioestadística, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Grupo de Vigilancia en Salud Pública, Ministerio de la Protección Social, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos con Glifosato se ejecuta dando cumplimiento a lo establecido en el Plan de Manejo Ambiental.

Objetivo. Explorar los posibles efectos del glifosato y otros plaguicidas sobre la salud humana como resultado de las aspersiones aéreas.

Materiales y métodos. Se realizó un estudio descriptivo en 112 individuos procedentes de las áreas asperjadas de los departamentos de Huila, Tolima, Putumayo, Guaviare, Santander, Antioquia, Magdalena y La Guajira, durante 2005 y 2006. Se aplicó una encuesta y se recolectaron muestras de orina para la determinación de glifosato, y de sangre, para la determinación de acetilcolinesterasa y organoclorados. Se llevó a cabo un análisis simple y se exploraron las posibles asociaciones.

Resultados. El 50,0% (56 individuos) de la población manifestó el uso de plaguicidas en su trabajo. El tiempo que llevaban utilizando los plaguicidas fue de 84,8 meses y refirieron aplicar plaguicidas 5,6 horas al día. El predominio de los plaguicidas usados fue extremadamente tóxico. De 39,6% de los individuos a quienes se les cuantificó glifosato, 64,3% reportaron su uso en actividades agrícolas. Se encontró una relación estadísticamente significativa entre el uso de glifosato terrestre (manual) y los niveles de este herbicida en orina (OR=2,54; IC95% 1,08-6,08).

Conclusión. No hubo hallazgos concluyentes entre la exposición a glifosato empleado en la erradicación de cultivos ilícitos y los efectos en la salud, debido a que se halló exposición ocupacional concomitante por la misma sustancia y por otras de mayor toxicidad que el glifosato.

Palabras clave: plaguicidas, herbicidas, exposición a plaguicidas, exposición a riesgos ambientales, riesgo, toxicidad.

Effects of aerial applications of the herbicide, glyphosate and insecticides on human health

Introduction. The herbicide glyphosate is administered aerially by the Program to Eradicate Illicit Crops Program and is undertaken in rigorous compliance with the Environmental Management Plan.

Objective. The effects of the glyphosate herbicide and other aerially applied insecticides were measured to determine possible impact on human health.

Materials and methods. In 2006-2006, a survey was taken of 112 individuals living in herbicide-treated areas of the Colombian provinces of Huila, Tolima, Putumayo, Guaviare, Santander, Antioquia, Magdalena and La Guajira. Samples of blood were examined for presence of acetylcholinesterase and organochlorine insecticides; urine was analyzed for glyphosate and its metabolites.

Results. Fifty percent (50%) of the individuals sampled acknowledged the use of control chemicals as part of their work. The mean exposure time to the chemicals was 84.4 months, with a mean

daily exposure of 5.6 hours. The most commonly used pesticides were of category I--extremely hazardous. In individuals sampled for glyphosate (39.6% of the total), 64.3% indicated the use of this herbicide at ground level in agricultural work. A statistically significant relationship was found between the use of glyphosate at ground level, and the concentration levels of glyphosate in the urine samples (odds ratio=2.54, 95% CI: 1.08 to 6.8).

Conclusion. These data did not show a relationship between the aerial sprayings of glyphosate for illicit crops eradication and an impact on human health, nor with occupational exposure to this and other chemicals (insecticides) with a high levels of toxicity.

Key words: pesticides, herbicide, pesticide exposure, environmental exposure, toxicity

En enero de 1992, el Consejo Nacional de Estupefacientes autorizó la aspersión aérea controlada de cultivos ilícitos, mediante el empleo del agente químico glifosato, después de haber evaluado diferentes herbicidas y, en noviembre de 2001, mediante la Resolución 1065, en ese entonces el Ministerio del Medio Ambiente, impuso el Plan de Manejo Ambiental a la Dirección Nacional de Estupefacientes, ejecutándose a partir de la Resolución 1054 del 2003 con el fin de dar seguimiento a todas las actividades objeto del Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos con Glifosato .

El inicio de las aspersiones trajo consigo innumerables quejas, las cuales se referían a afectaciones de los cultivos lícitos, de los animales, del ambiente y de la salud humana. Aunque la evaluación de riesgo del herbicida y su clasificación toxicológica (1) mostraba el bajo riesgo de su uso, el Ministerio de la Protección Social, como autoridad competente en el tema, propuso un estudio el cual se llevó a cabo en forma conjunta con el Instituto Nacional de Salud, para recolectar evidencias epidemiológicas que permitieran una mejor comprensión sobre los efectos agudos que se podrían estar ocasionando como consecuencia de la aplicación de la mezcla utilizada.

En relación con los plaguicidas empleados en el país, la Dirección Nacional de Estupefacientes y la Sección de Asuntos Narcóticos de la Embajada de los Estados Unidos publicaron, en 1999, un

informe en el que se reportó que 98,7% de los cultivadores utilizaban insecticidas y fungicidas para controlar las plagas y enfermedades; 92,5% utilizaba fertilizantes químicos y 95,5% controlaba la competencia de otras plantas con herbicidas (Uribe S. Proyecto sobre rendimientos de las plantaciones de coca en Colombia, Informe de progreso N° 5. Bogotá, octubre 25 de 1999). Por otro lado, la investigación del Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas (SINCHI) muestra que los productores, al contrario de lo que acostumbran a hacer con su producción de pan coger, se esmeran por realizar labores agrícolas como desyerbar en sus cultivos ilícitos, al igual que acostumbran a controlar químicamente los insectos y plagas (2).

Otro reflejo del gran uso de plaguicidas es el reporte de intoxicaciones a través del Sistema de Vigilancia en Salud Pública Nacional (SIVIGILA), en el que se reportaron, para el 2006, un total de 8.777 intoxicaciones por sustancias químicas, de las cuales, 5.219 (59,5%) correspondieron a intoxicaciones por plaguicidas y, para el 2007, se presentaron 12.848 intoxicaciones por sustancias químicas, 47,8% (6.141) de las cuales fueron por plaguicidas (3).

En relación con la aplicación operativa de la estrategia de aspersión aérea, ésta es ejecutada por la Dirección Antinarcóticos de la Policía Nacional.

En ese sentido, el Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos con Glifosato se ejecuta según lo establecido en el Plan de Manejo Ambiental (4, Sección Asuntos Narcóticos, Dirección de Antinarcóticos, Policía Nacional. Acercamiento a la actividad agronómica y la problemática ambiental de los cultivos de coca en Colombia. Documento técnico, 2005) y en el Decreto 1843

Correspondencia:

Marcela Varona, Grupo de Salud Ambiental, Instituto Nacional de Salud, calle 26 No. 51-20, Bogotá, D.C., Colombia.
Telefax: (571) 220 7700, extensión 447
mvarona@ins.gov.co

Recibido: 26/09/08; aceptado:13/04/09

de 1991 del Ministerio de Salud, que reglamenta el uso y manejo de plaguicidas en el territorio nacional (5). La verificación del cumplimiento del Plan de Manejo Ambiental la realiza el Ministerio del Medio Ambiente y Vivienda Territorial, mediante visitas de seguimiento a las diferentes áreas donde se adelantan las labores de aspersión (6).

El herbicida empleado para la erradicación de los cultivos ilícitos es el patentado por la casa Monsanto con la marca comercial Roundup®, el cual está compuesto por 480 g/L de la sal isopropilamina de N-fosfometilglucina. El glifosato es uno de los plaguicidas más ampliamente utilizados en todo el mundo; su uso incluye manejo agrícola, industrial, de jardinería ornamental y de malezas en las residencias, la formulación se encuentra registrada en más de cien países y es usado en 60 cultivos agrícolas, aproximadamente (4).

En el país, el glifosato es uno de los herbicidas más utilizados. Se emplea para madurar la caña de azúcar en el Valle del Cauca hace más de 30 años y, como herbicida, en cultivos de café, banano, arroz, cacao, palma africana y cítricos. Igualmente, es el herbicida empleado en el Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos (2). Sin embargo, el uso de glifosato en el programa de aspersión de coca y amapola representa una fracción relativamente pequeña del total de su uso en Colombia (7).

El glifosato es un herbicida de amplio espectro, no selectivo y posemergente, cuya fórmula empírica es $C_3H_8NO_5P$, que corresponde a un ácido orgánico débil formado por una molécula de glicina y otra de fosfometilo. Su forma física es un polvo cristalino, blanco, inodoro, con un peso específico de 1.704, soluble en agua e insoluble en solventes orgánicos y no tiene volatilización significativa (8). Ejerce su mecanismo de acción por inhibición de la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-P sintetasa, esencial en el proceso de síntesis de los aminoácidos aromáticos en las plantas (9,10).

El glifosato es adsorbido rápida y fuertemente por las partículas del suelo, lo cual impide su movilidad y su lixiviación, y lo inhabilita para

ser absorbido a través de las raíces. Uno de los principales productos de la degradación por la acción bacteriana es el ácido amino-metil-fosfónico, el cual es biodegradable y tiene una vida media de 30 días, aproximadamente. Al alcanzar el agua, el glifosato es absorbido por partículas en suspensión o en sedimentación para luego ser degradado, lo cual ocurre más lentamente que en los suelos, a causa del menor número de microbios; alcanza una vida media de 7 a 10 semanas en aguas naturales (11).

Los plaguicidas que contienen glifosato, como el Roundup®, están registrados en Colombia en la categoría toxicológica IV, ligeramente tóxicos, basados en la dosis letal 50 (DL_{50}) por vía oral del ingrediente activo en ratas, considerada mayor de 5.000 mg/kg. Por tener toxicidad oral aguda y dérmica relativamente baja, ha sido clasificado por la *Environmental Protection Agency*, (EPA) en la categoría III (ligeramente tóxico) y en el grupo E de oncogenicidad como no carcinogénico para humanos (12).

La toxicidad aguda (DL_{50}) para el glifosato comercial por vía oral y cutánea es mayor de 5.000 mg/kg, y por inhalación, mayor de 3.400 mg/L (13). Los estudios toxicocinéticos en animales de experimentación muestran una absorción de 30% a 36% en el tubo digestivo y una escasa absorción por vía cutánea. Una vez absorbido, se distribuye ampliamente en todo el organismo; 15% a 29% se excreta por la orina, 2% por el aire espirado y el 70% restante por las heces. Su metabolismo es escaso y 97% de la dosis oral se elimina como glifosato; su único metabolito es el ácido amino-metil-fosfónico, con una vida media de dos días, aproximadamente (7,8).

Entre las manifestaciones clínicas por inhalación, puede causar irritación leve de la nariz y garganta, y al contacto con los ojos desencadena irritación ocular intensa, y con la piel, sensibilización, irritación leve y fotosensibilización (8).

Para el caso de la intoxicación aguda por ingestión de glifosato como producto comercial, los síntomas aparecen según la dosis ingerida. Con la ingestión de 5 a 150 ml se presentan síntomas leves, principalmente gastrointestinales, como

náuseas, vómito, diarrea y dolor abdominal, que se resuelven en el lapso de 24 horas. Con ingestión de 20 a 500 ml, se presentan síntomas moderados gastrointestinales que duran más de 24 horas, como hemorragias gastrointestinales, esofagitis o gastritis verificables por endoscopia, y ulceración oral e hipotensión. En las intoxicaciones graves se puede presentar disfunción respiratoria, falla renal, falla cardíaca, coma y muerte (13-15).

El glifosato no fue mutagénico en ensayos de células mamíferas en sistemas *in vitro* e *in vivo*. Se ha informado sobre efectos nocivos en estudios de linfocitos humanos, los que mostraron que el glifosato produce cambios en el ADN de cromátides hermanas (15,16) y, como principio activo, es mucho menos citotóxico para las células mononucleares de sangre periférica que la formulación comercial (16).

En cuanto a la teratogénesis y toxicidad para el embrión, en dosis superiores a 3.500 mg/kg diarios de glifosato, en ratas, se observó toxicidad para el desarrollo en forma de pérdida de la osificación del esternón y disminución del peso corporal total. Estas dosis también fueron tóxicas para las madres: el nivel de no efecto observable (NOEL) para el desarrollo y la toxicidad materna, fue de 1.000 mg/kg diarios. En un estudio sobre la reproducción en tres generaciones de ratas, a diferentes dosis, el hallazgo tóxico significativo fue dilatación tubular en los riñones de los recién nacidos de la primera generación de las madres que recibieron las dosis más altas (30 mg/kg diarios); el NOEL para este efecto fue de 10 mg/kg diarios (17-19).

Aunque ninguno de los estudios sobre mutagénesis requeridos para el registro del glifosato ha mostrado acción mutagénica, los resultados son diferentes cuando se realizan con formulaciones comerciales a base de glifosato. Por ejemplo, en estudios de laboratorio con varios organismos, se encontró que el Roundup® incrementó la frecuencia de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en la mosca de la fruta. También, se ha reportado daño al ADN en pruebas de laboratorio con tejidos y órganos de ratón (20-22) y, de igual forma, no se ha

asociado con incidencia de cáncer (23). Como antecedentes de investigación en el tema en Colombia, se tiene información de tres estudios descriptivos.

Uno fue realizado por Revelo *et al.* (24), "Efectos de la fumigación con glifosato en los municipios de Valle de Guamuez, San Miguel y Orito, Putumayo-Colombia, diciembre 2001", en el cual se hizo un análisis de la información consignada en los formatos de quejas, presentadas en la Personería Municipal de los municipios de Valle del Guamuez, San Miguel y suministrada por la Unidad de Asistencia Técnica de Orito.

En éste se encontró que 1.153 (80%) de las 1.443 quejas presentadas ante las personerías de Valle del Guamuez, San Miguel y Orito hacen referencia a problemas de salud atribuidos a la aspersión. La frecuencia de síntomas referidos fue: brotes en piel (524), fiebre (516), cefalea (469), infección respiratoria aguda (454), diarrea (373), vómito (281), dolor abdominal (221), malestar general (179), mareos (137), angustia, miedo y pánico (64), dolor de garganta (41), conjuntivitis (32) y otros síntomas (30). Los porcentajes de cambio calculados en la morbilidad atendida en los meses de enero y febrero de 2000, comparados con el 2001, en el Hospital de La Hormiga, reportan un incremento estadísticamente significativo para eventos como fiebre, diarrea, dolor abdominal, infección respiratoria aguda e infecciones de piel ($p < 0,005$) (24).

El segundo estudio fue realizado por Uribe *et al.* y consistió en la revisión de las denuncias presentadas por la comunidad de Aponte en el noroccidente de Nariño, durante las aspersiones realizadas en el 2000. De las 29 quejas reportadas, se obtuvieron 21 historias clínicas que estaban disponibles en el Puesto de Salud de Aponte, en las cuales se encontraron diagnósticos de enfermedades de origen infeccioso o por otras causas no relacionadas con intoxicación por glifosato (25).

El tercer estudio, también llevado a cabo por Uribe *et al.*, se realizó en los municipios del departamento del Putumayo, donde se practicó aspersión controlada de glifosato

en diciembre de 2000 y febrero de 2001. En el estudio se observaron y midieron retrospectivamente los posibles efectos sobre la salud humana atribuibles a la exposición al glifosato y los posibles efectos por exposición a otros plaguicidas empleados para cultivar coca. Se encontró que los problemas de salud observados en los municipios objeto del estudio tuvieron una tasa de prevalencia similares a las encontradas en los reportes epidemiológicos de los años previos al inicio de las aspersiones. Las enfermedades referidas con mayor frecuencia por la población fueron gastrointestinales, cutáneas, oculares y respiratorias; sin embargo, las quejas en salud no se relacionaron con la localización de los sujetos en el momento de la aspersión. Igualmente, se encontró que los síntomas manifestados pueden tener su origen en la exposición crónica de la población a los múltiples productos agroquímicos empleados en los cultivos de coca en el departamento del Putumayo (25).

En ninguno de los estudios mencionados anteriormente se pudo establecer un nexo de causalidad entre los problemas de salud reportados y el Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos con Glifosato. Por ejemplo, muchos de los cuadros clínicos reportados no coinciden con las fechas en las que se efectuaron las aspersiones, mientras que las condiciones de salud reportadas corresponden con las condiciones endémicas de estas zonas. Por otra parte, los estudios realizados fueron de tipo retrospectivo, lo cual no permite establecer ni descartar una relación entre la exposición a una sustancia dada y las manifestaciones clínicas debidas a su exposición (24,25).

El presente estudio tuvo como objetivo explorar los posibles efectos del glifosato y otros plaguicidas sobre la salud humana, como resultado de las aspersiones aéreas, mediante la detección de los posibles casos de intoxicación aguda por plaguicidas que se presenten en forma concomitante con la aplicación aérea de glifosato, la descripción de las manifestaciones clínicas de la exposición humana al glifosato, la caracterización de la exposición de la población de las áreas asperjadas a otros plaguicidas y la

exploración de algunas actitudes de la población frente a las aspersiones aéreas.

Es de anotar que, en este estudio, no se evaluaron los impactos sociales, políticos, económicos ni ambientales de la medida, que podrían contribuir a la explicación de la gran mayoría de quejas.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, en 112 individuos procedentes de las áreas asperjadas de los departamentos de Huila, Tolima, Putumayo, Guaviare, Santander, Antioquia, Magdalena y Guajira, que consultaron espontáneamente o se detectaron por búsqueda activa en los primeros cinco días de aplicada la medida, durante los años 2005-2006.

No se buscó en los departamentos objeto del proyecto un marco estadísticamente representativo, por dos razones fundamentales: la primera, porque el diseño del estudio no pretendía establecer relaciones de causalidad y, la segunda, por las dificultades operativas para la recolección de las muestras en los departamentos objeto del proyecto, dado que no se podía determinar con antelación cuántas personas podrían estar expuestas y, aunque se podían conocer las zonas asperjadas, pocas eran accesibles y seguras para el equipo investigador. La finalidad de esta investigación era documentar evidencias epidemiológicas y tomar decisiones futuras frente a las necesidades identificadas de desarrollar otros estudios.

Se incluyeron los casos que consultaron espontáneamente o que fueron referidos o detectados mediante búsqueda activa y que cumplieron con los siguientes criterios.

Casos confirmados

Criterios:

Clínico-epidemiológico: individuos procedentes de las zonas del Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos con Glifosato que presentaron durante los cinco días siguientes a la aspersión aérea, un cuadro clínico sugestivo de exposición a plaguicidas, diagnosticado por un médico y con claros antecedentes de exposición.

De laboratorio: casos con indicadores biológicos de exposición o de efecto alterado debido a plaguicidas, con manifestaciones clínicas evidentes o sin ellas.

Dictamen médico-legal: persona fallecida con diagnóstico de intoxicación por plaguicida, confirmado mediante procedimientos médico-legales, exceptuando los casos de muerte intencional por suicidio u homicidio.

La detección de los individuos se inició en el momento en que se aplicó la medida de la aspersión aérea. Los casos se captaron por medio de dos estrategias: la pasiva, que fueron los que consultaron a las Instituciones Prestadoras de Servicios de Salud y a las Empresas Sociales del Estado, y la búsqueda activa, realizada en campo directamente por el equipo de investigadores.

Se aplicó una encuesta con la cual se obtuvo información demográfica, antecedentes ocupacionales, toxicológicos, clínicos y percepción de los individuos ante el Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos con Glifosato. Se recolectaron muestras de orina y de sangre, máximo dentro de los primeros cinco días después de realizada la aspersión aérea. A cada individuo se le tomó una muestra de orina (aproximadamente, 50 ml), para la determinación de glifosato y de ácido aminometil-fosónico, en frascos de polipropileno con tapa rosca, la cual se preservó congelada hasta su envío. Estas determinaciones se realizaron en el Centro Toxicológico de Quebec, Canadá. Asimismo, se recolectó una muestra de sangre (10 ml) la cual se fraccionó tomando 9,5 ml sin anticoagulante; esta muestra se centrifugó y el suero separado se transvasó a un tubo *pyrex* o similar, cuya boca se cubrió con papel de aluminio antes de enroscar, para análisis de plaguicidas organoclorados. Los sueros permanecieron refrigerados hasta su envío. Los 0,5 ml restantes se envasaron en tubos *eppendorf* con heparina sódica como anticoagulante, para la determinación de la enzima acetilcolinesterasa. Estando las muestras en el laboratorio, se codificaron nuevamente con el fin de minimizar el sesgo del analista.

La determinación de acetilcolinesterasa y organoclorados se llevó a cabo en el Grupo de Salud

Ambiental—Investigación del Instituto Nacional de Salud. La determinación de organoclorados se realizó por extracción en fase sólida en discos C18 (SPED) en muestras de suero; posteriormente, se cuantificó por cromatografía de gases con detector de micro-captura de electrones (GC/ μ ECD), utilizando una columna cromatográfica HP-5. La enzima acetilcolinesterasa se determinó por la técnica de Limperos y Ranta (26,27).

Los criterios de inclusión estuvieron definidos por los individuos que aceptaron participar voluntariamente y que refirieron presentar manifestaciones clínicas de exposición a plaguicidas, máximo dentro de los cinco días posteriores a las aspersiones aéreas, al igual que la aplicación de la encuesta y la toma de muestras biológicas dentro de este mismo periodo.

Se excluyeron del estudio: los individuos que interpusieron quejas cuya exposición ocurrió en un municipio de un departamento diferente a los incluidos en el proyecto; los que consultaron cinco días después de haber ocurrido las aspersiones en la zona; aquéllos seleccionados en el estudio, cuyas muestras no pudieron ser enviadas dentro de los cinco días posteriores a la toma; todos los individuos que voluntariamente no quisieron participar, y los individuos cuyas muestras llegaron al Instituto Nacional de Salud en neveras que estaban abiertas, con la cinta de enmascarar rota o cuyo contenido se había derramado por mal empaque en el transporte.

Se llevó a cabo el estudio piloto en el 10% del total de la población de estudio. Durante éste, se puso a prueba la encuesta, se valoró la pertinencia de las variables planteadas y se incorporaron las sugerencias dadas, haciendo los ajustes necesarios, tanto de instrumentos como de tiempos y movimientos. Las personas participantes en el estudio piloto no formaron parte de la población seleccionada en el estudio.

Antes de iniciar la recolección de la información y de las muestras biológicas, se les informó los objetivos del estudio, su importancia y los beneficios que les traería el participar. Una vez aceptaron voluntariamente su participación, firmaron un consentimiento escrito.

Se construyó una base de datos en el programa Epi-Info, versión 6.04, y se realizó el análisis univariado de las variables de importancia epidemiológica. Igualmente, se empleó el programa Stata, versión 6.0, tanto para el análisis univariado como para el bivariado. Para este último, se cruzaron las principales variables que caracterizan la exposición con los resultados del seguimiento biológico. Con el fin de asegurar la calidad de la información, el 100% de las variables incluidas en la encuesta fueron revisadas para eliminar cualquier inconsistencia que se hubiera presentado en la fase inicial de digitalización.

En el cruce de las variables, se consideraron tablas de contingencia y se exploraron posibles asociaciones cuando fue de interés particular, mediante la prueba de χ^2 al cuadrado o, en su defecto, mediante la prueba exacta de Fisher.

Este estudio fue aprobado por el Comité Técnico de Investigación y el Comité de Ética del Instituto Nacional de Salud.

Resultados

Se incluyeron en el estudio 112 personas habitantes de zonas donde fue aplicado el Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos con Glifosato, en 12 municipios de 8 departamentos. A las 112 personas entrevistadas se les realizó una encuesta y se les recolectaron muestras biológicas. Durante el transporte, 6 muestras de orina recolectadas por el grupo de investigadores se perdieron por derrame de las mismas, con una pérdida de 5,4%, por lo que el total de muestras analizadas para glifosato y ácido amino-metil-fosfónico fue de 106.

A algunos individuos captados de manera espontánea en diferentes unidades hospitalarias, no les fueron tomadas las muestras de sangre para el análisis de plaguicidas organosforados, carbamatos y organoclorados, por lo cual se tuvo una pérdida de 7,1% y se analizaron en total 104 muestras.

El 92,9% (104) de las muestras fueron obtenidas directamente por el grupo investigador del Instituto Nacional de Salud, mediante desplazamientos a las áreas asperjadas. En el departamento

de Putumayo, se recolectaron 46 muestras (41,1%); en Guaviare, 20 (17,9%); en Antioquia, 18 (16,1%); en La Guajira, 17 (15,2%), y en Magdalena, 3 (2,6%), con el acompañamiento de funcionarios de las respectivas direcciones de salud. El 7,1% (8) restante fueron captadas de manera espontánea en algunas de las unidades hospitalarias, se recolectaron 3 muestras (2,7%) en el departamento del Huila, 2 (1,7%) en Santander, 2 (1,7%) en Magdalena y 1 (1,0%) en Tolima. 2

El 99,0% de los casos del estudio procedían del área rural; sólo un caso (1,0%) manifestó vivir en la zona urbana, aunque todas las exposiciones fueron rurales. El 56,3% (63) eran hombres, quienes en una mayor proporción estuvieron expuestos a la medida de aspersión aérea por su vinculación a las actividades agrícolas. El restante 43,7% (49) pertenecían al sexo femenino y fueron expuestas de forma casual.

El promedio de edad fue de 32 años (rango, 2 a 78; DE=16) para los dos sexos; no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la edad y el sexo ($p=0,141$). La población estudiada fue predominantemente joven y se concentró en tres grupos, el de 30 a 34 años (16,1%), el de 35 a 39 años (13,4%) y el de 15 a 19 años (11,6%). La proporción más baja de la población fue la menor de 15 años y la mayor de 50 años representó el 13,5%. La principal ocupación de la población fue la agrícola, 51,0% (57), seguida de las actividades domésticas, 32,0% (36), y en tercer lugar estuvieron los estudiantes, 8,0% (9). El 37,5% (42) de la población se había empleado como jornaleros en los 15 días anteriores a la entrevista, el 32,1% (36) realizaba oficios de la casa, el 10,7% (12) eran empleados, el 8,1% (9) eran trabajadores independientes, el 7,1% (8) eran estudiantes y el restante 4,5% (5) se dedicaba a actividades recreativas.

El 45,0% (51) de la población estudiada se encontraba afiliada al régimen contributivo del Sistema General de Seguridad Social en Salud, el 36,0% (40) no tenía ninguna afiliación, el 18,0% (20) correspondía al régimen subsidiado y sólo un 1,0% (1) refirió ser atendido en salud

de manera particular. Se encontró una población joven que en el 50,0% (56) no había terminado la educación primaria y sólo el 25,0% (28) la había completado; hubo porcentajes muy bajos de educación secundaria: el 2,6% (3) no la terminó y el 4,5% (5) era bachiller; tan sólo el 1,8% (2) tenía una educación universitaria. El porcentaje de población analfabeta fue de 16,1% (18).

Caracterización de la exposición

Se indagó sobre la exposición de los individuos en el momento en que se llevaron a cabo las aspersiones aéreas con glifosato. El 71,4% (80) de los casos manifestó que la forma de exposición fue por el aire y el 38,4% (43) refirió que tuvo contacto directo con la mezcla al caerle durante la aspersión; el 5,4% (6) restante tuvo exposición por alguna fuente de agua. No se halló exposición por alimentos u otra fuente.

En relación con el abastecimiento de agua para consumo humano, se encontró que 24,1% (27) recogía el agua lluvia, el 19,6% (22) la obtenía de un pozo o aljibe, el 50,0% (56) del río o quebrada, el 1,0% (1) del acueducto y el 5,3% (6) restante de otras fuentes, incluidos pequeños acueductos, lo cual indica la ruralidad de la población estudiada y la carencia de sistemas de acueducto en las zonas.

El 25,9% (29) de los individuos incluidos en el estudio informaron que en el momento de la

exposición se hallaban realizando actividades propias del hogar, el 20,5% (23) en actividades recreativas, el 17,0% (19) cultivando, el 11,6% (13) en el trabajo habitual, el 7,1% (8) caminando por la zona asperjada y el 17,9% (20) restante realizando diferentes labores.

Historia ocupacional

El 50,0% (56) de la población refirió el uso de plaguicidas en su trabajo, y se encontraron 45 nombres comerciales de agroquímicos. En el cuadro 1 se citan los 10 más utilizados, con un promedio de uso de 3,6 plaguicidas por persona. El tiempo que llevaban utilizando los plaguicidas fue, en promedio, de 84,8 meses (rango, 2 a 480; DE=105,3) y refirieron aplicar plaguicidas en promedio 5,6 horas al día (rango, 1 a 12; DE=2,8).

En relación con las labores realizadas durante el periodo que no están empleando plaguicidas, 23 (41,1%) individuos refirieron estar desyerbando, 19 (33,9%) cultivando, 9 (16,1%) realizando oficios del hogar y 5 (8,9%) en diferentes actividades.

Los principales nombres comerciales de los plaguicidas empleados fueron: Gramoxone®, Tamaron®, Roundup®, Anikil®, Panzer®, Furadan® y Metil-paratión®, entre otros. La dosis letal 50 de los ingredientes activos de los diez plaguicidas más utilizados reportados por los

Cuadro 1. Distribución de plaguicidas empleados por nombre comercial, categoría toxicológica, organismos que controla y grupo químico, Colombia 2006.

Nombre comercial®	Categoría toxicológica	Tipo de organismo que controlan	Grupo químico	N	%
Gramoxone	I	Herbicida	Bipiridilo	29	25,9
Tamaron	I	Insecticida	Organofosforado	20	17,9
Roundup	IV	Herbicida	N-fosfonometil- glicina	18	16,1
Anikil	II	Herbicida	Clorofenol	8	7,1
Panzer	IV	Herbicida	N-(fosfonometil) glicina	7	6,3
Furadan	I	Insecticida	Carbamato	7	6,3
Metil paratión	I	Insecticida	Organofosforado	7	6,3
Glifosato	IV	Herbicida	N-fosfonometil- glicina	6	5,4
Manzate	III	Fungicida	Ditiocarbamato	5	4,5
Gramafin	I	Herbicida	Bipiridilo	5	4,5
			Total	112	100

Fuente: Encuesta individual, Instituto Nacional de Salud, 2006

Cuadro 2. Dosis letal 50 (DL50) de los plaguicidas reportados por los individuos del estudio, Colombia, 2006.

Nombre comercial®	Ingrediente activo	DL50 cutánea
Gramoxone	Paraquat	236 mg/kg para conejos
Tamaron	Metamidofos	130 mg/kg para ratas
Roundup	Glifosato	5.000 mg/kg para conejos
Anikil	2,4-D (éster butílico)	>2.000 mg/kg para conejos
Panzer	Glifosato	5.000 mg/kg para conejos
Furadan	Carbofuran	>3.000 mg/kg para ratas
Metil paratión	Metil paratión	50 mg/kg para ratas
Glifosato	Glifosato	5.000 mg/kg para conejos
Manzate	Mancozeb	>5.000 mg/kg para conejos
Gramafin	Paraquat dicloruro	236 mg/kg para conejos

Fuente: United States Environmental Protection Agency (30)

individuos del estudio, se muestra en el cuadro 2. El 45,0% (90) fueron herbicidas; 44,0% (88), insecticidas, y 11,0% (22), fungicidas.

Los plaguicidas usados por la población de estudio fueron de categoría I, extremadamente tóxicos, 45,5% (92), seguidos de los de la categoría III, moderadamente tóxicos, 22,8% (46), la categoría IV, ligeramente tóxicos, 19,3% (39) y, por último, la categoría II, altamente tóxicos, 12,4% (25).

La distribución de los plaguicidas por categoría toxicológica se presenta en el cuadro 3. Entre los plaguicidas de categoría toxicológica IV, ligeramente tóxicos, el herbicida glifosato fue el más utilizado, tal como se reporta en la literatura mundial. Todos los productos con los nombres comerciales anotados en el cuadro 3 para esta categoría, tienen como principio activo N-fosfometil-glicina. En general, la población no reconoce que las sustancias que usan contienen el mismo ingrediente activo que se emplea en las aspersiones aéreas, es decir, el herbicida glifosato.

Pese a que los organoclorados fueron prohibidos en el país, se reportó el uso de los insecticidas tionil y tiodán. Los organofosforados fueron el grupo químico de mayor uso en la población de estudio, 29,2% (59), y éste es el grupo que más intoxicaciones agudas causa en el país (28,29).

En segundo lugar, la N-fosfometil-glicina, 19,3% (39), seguida de los bupiridilos, 16,8% (34), y los carbamatos, 10,4% (21), entre otros.

Cuadro 3. Distribución de plaguicidas empleados por categoría toxicológica, Colombia, 2006

Categoría toxicológica	Nombre comercial®	No.	%
I	Gramoxone	29	31,5
	Tamarón	20	21,7
	Metil paratión	7	7,6
	Furadan	7	7,6
	Gramafin	5	5,4
II	Aniquil	8	14,3
	Puntouno	4	7,1
	Cipermetrina	3	5,4
	Paredón	2	3,6
	Látigo	1	1,8
III	Elsan	1	1,8
	Manzate	5	10,9
	Lorsban	5	10,9
	Sevin	4	8,7
IV	Malatión	4	8,7
	Glifosato	4	10,7
	Roundup	12	32,1
	Panzer	5	12,5
	Faena	3	7,1
	Socar	1	3,6
	Estelar	1	3,6

Fuente: Encuesta individual, Instituto Nacional de Salud, 2006

Respecto a la capacitación sobre el manejo seguro de los plaguicidas, sólo 11 (19,6%) de los que utilizaban plaguicidas refirieron haberla recibido alguna vez en su vida.

Entre las 56 personas que utilizaban plaguicidas, 55,4% (31) tenía la costumbre de almacenarlos fuera de la casa, 23,2% (13) lo guardaba dentro de la casa y 21,4% (12) disponía de un

área exclusiva para su almacenamiento. Los recipientes fueron destinados para almacenar agua, 1,8% (1); quemados, 35,7% (20); enterrados, 16,1% (9); utilizados para guardar otros plaguicidas, 7,1% (4); botados a campo abierto, 35,7% (20), y un porcentaje bajo, 1,8% (1), arrojados al agua.

La protección personal era precaria. Del total de personas que utilizaban plaguicidas (56), 96,4% (54) no empleaba uniforme en esta actividad; la labor de fumigación la realizan con la misma ropa de uso diario. No se reportó protección ocular con visores o monogafas; sólo el 5,4% (3) usaba protección en los miembros superiores (guantes cortos), 7,2% (4) refirió tener alguna protección respiratoria con tapabocas o mascarilla y, para la protección del cuerpo, 5,4% (3) empleaba camisa; el elemento más utilizado fueron las botas de caña alta y caña baja, 66,1% (37).

En relación con las medidas de higiene, 64,3% (36) utilizaba para las aplicaciones la misma ropa de trabajo que empleaba en sus actividades habituales y 91,1% (51) se cambiaba la ropa y se bañaba al finalizar la jornada laboral; 89,3% (50) se cambiaba diariamente, 8,9% (5) dos veces a la semana y el resto, una vez a la semana. La mitad de la población que trabajaba con plaguicidas lavaba la ropa contaminada en sus casas y el restante 50% la lavaba en caños, quebradas y ríos. El 48,2% (27) la lavaba mezclada con el resto de la ropa de la familia.

Respecto a los hábitos, 46,4% (26) de los trabajadores se alimentaba en el cultivo; de éstos, 65,4% (17) lo hacía siempre y 34,6% (9) ocasionalmente. El 73,1% (19) se lavaba las manos siempre antes de ingerir los alimentos, 15,4% (4) lo hacía ocasionalmente y 11,5% (3) de los entrevistados nunca lo hacía. Del total de personas incluidas en el estudio, 19 (17,0%) fumaba y 46 (41,1%) consumía licor; de las que fumaban, 9 (47,4%) lo hacía dentro del cultivo, con una frecuencia de 6 a 10 cigarrillos al día. De los individuos que reportaron consumir licor, 19,6% (9) lo hacía una vez a la semana y el mismo porcentaje refirió ingerirlo dos veces al mes; igualmente, 43,5% (20) lo hacía ocasionalmente.

De las 112 personas entrevistadas, 12,5% (14) manifestó haberse intoxicado con plaguicidas alguna vez en su vida; 57,2% (8) de éstas, utilizó remedios caseros, 35,7% (5) consultó al médico y 7,1% (1) no hizo nada al respecto. El plaguicida reportado como el que mayores intoxicaciones causó, fue el Furadan® (37,5%), seguido por el Tamaron® (28,6%), el Lannate® (14,3%), el Lorsban® y el Metavin® (7,1%).

Actitud frente al Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos con Glifosato

De igual forma, se indagó sobre la percepción individual del Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos con Glifosato. Se reportó que sólo 7,1% (8) creía que es una política de Estado que debe realizarse. El 68,7% (77) de los encuestados pensaba que las aspersiones podían producir efectos sobre la salud, 67,0% (75) que afectaban los cultivos lícitos; 52,7% (59), el medio ambiente; 51,8% (58), los animales; 42,9% (48), la economía, y un porcentaje mínimo no respondieron (0,9%). Igualmente, se les preguntó de sus sentimientos acerca de las aspersiones, y se obtuvo que la mayor impresión fue la tristeza (61,6%), seguido de la desesperanza (25,0%), las ganas de irse (23,2%), el rechazo (15,2%), el miedo y la depresión (14,3%).

Manifestaciones clínicas

En el cuadro 4 se describen los sistemas en los cuales previamente se agruparon los síntomas reportados por los individuos que conformaron el estudio. La mayoría de síntomas reportados se relacionan principalmente con alteraciones neurológicas y de piel. En cuanto a las alteraciones neurológicas, 82,2% (92) manifestó algún síntoma, y los principales fueron cefalea, 37,5% (42), mareo, 9,8% (11), y sudoración profusa y visión borrosa, 7,1% (8). Entre las manifestaciones de piel, 71,5% (80) refirió alguna de ellas; el prurito, 35,7% (40), y el eritema, 20,5% (23), fueron las más mencionadas.

Los otros sistemas implicados en la mayoría de las manifestaciones clínicas fueron el sistema digestivo, 68,8% (77), y los órganos de los sentidos, 42,9% (48). Es importante aclarar

que cada persona pudo haber mencionado más de una manifestación clínica al momento de realizarle la encuesta.

Biomarcadores de exposición y efecto

Respecto a los biomarcadores de exposición y de efecto que se emplearon en el estudio, en el cuadro 5 se muestran los resultados para glifosato y su metabolito, ácido amino-metil-fosfónico, teniendo en cuenta el límite de detección y de cuantificación del método cromatográfico. Es de aclarar que el límite de detección para glifosato es 0,5 µg/L, es decir, por debajo de este límite el equipo no tiene la capacidad de detectar concentraciones de glifosato. Por encima de este límite, se puede detectar que existe alguna concentración de glifosato, pero no siempre se puede cuantificar. El límite de cuantificación para glifosato es de 2 µg/L, por debajo del cual se puede detectar pero

Cuadro 4. Manifestaciones clínicas reportadas por los individuos incluidos en el estudio agrupadas por sistemas, Colombia, 2006.

Sistemas	N	%
Neurológico	92	82,2
Piel	80	71,5
Digestivo	77	68,8
Órganos de los sentidos	48	42,9
Respiratorio	25	22,3
Hematopoyético	24	21,5
Cardiovascular	10	9,0
Urinario	4	3,6

Fuente: Encuesta individual, Instituto Nacional de Salud, 2006

Cuadro 5. Resultados de glifosato y ácido amino-metil-fosfónico en orina de los individuos incluidos en el estudio, Colombia, 2006.

Glifosato	Valores	N	%
Límite de detección: 0,5 µg/L	No detectado	64	60,4
	Detectado	42	39,6
Límite de cuantificación: 2 µg/L	Detectado no cuantificado	0	
	Cuantificado	42	39,6
Ácido amino-metil-fosfónico	Valores	N	%
Límite de detección: 1 µg/L	No detectado	102	96,2
	Detectado	4	3,8
Límite de cuantificación: 15 µg/L	Detectado no cuantificado	0	
	Cuantificado	4	3,8

Fuente: Centro Toxicológico de Québec (Canadá), 2006

no cuantificar, y por encima de este límite se puede cuantificar y, por lo tanto, hay la certeza de que se encuentra glifosato en la muestra de orina analizada. Lo mismo sucede con el ácido amino-metil-fosfónico, cuyo límite de detección es de 1 µg/L y el de de cuantificación es de 15 µg/L.

El valor promedio de las concentraciones de glifosato en orina fue de 7,6 µg/L, con un rango de 0 a 130 µg/L y una desviación estándar (DE) de 18,6, y para ácido amino-metil-fosfónico, el promedio fue de 1,6 µg/L, con un rango de 0 a 56 µg/L y una DE de 8,4.

En relación con el glifosato, se encontró que en 60,4% (64) de las muestras de orina analizadas no se detectó este herbicida y en 39,6% (42) sí se detectó. La totalidad de muestras en las cuales se detectó glifosato fue igualmente cuantificada. Para el ácido amino-metil-fosfónico, 96,2% (102) de las muestras no fueron detectadas y 3,8% (4) fueron detectadas; asimismo, el total de muestras detectadas fueron cuantificadas.

De los 42 individuos que tuvieron niveles de glifosato cuantificables, 4 (9,5%) presentaron niveles de ácido amino-metil-fosfónico cuantificables; estos últimos tenían niveles de glifosato de 58,8 µg/L en promedio, con un rango de 28 a 130 µg/L.

Del total de individuos con niveles cuantificables de glifosato, 27 (64,3%) reportaron el uso de este herbicida con cualquiera de sus diferentes nombres comerciales en actividades agrícolas

y, de los 4 con niveles cuantificables de ácido amino-metil-fosfónico, 2 (50%) reportaron el uso de glifosato como ingrediente activo en labores agrícolas.

El departamento de Putumayo presentó el mayor número de individuos a quienes se les detectó tanto glifosato (23) como ácido amino-metil-fosfónico (4) en orina, seguido por Guaviare (10), La Guajira (5) y Antioquia (4).

La determinación de la enzima acetilcolinesterasa se empleó como biomarcador de efecto por exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos. De todos los individuos participantes en el estudio, 91,3% (95) presentó valores mayores o iguales a 75%, y 8,7% (9), valores menores a 75%, de los cuales, 7,1% (8) tuvieron valores de 62,5% y un solo individuo presentó un valor de inhibición de la acetilcolinesterasa del 50%. Todos los trabajadores que tuvieron valores anormales se encontraron en un rango de 50% a 62,5%, que indica probable sobreexposición; no se encontró ningún valor entre 25% y 37,5%, que representa una sobreexposición seria, ni entre 0% y 12,5%, que muestra sobreexposición muy seria y peligrosa. Por la técnica de Limperos y Ranta, los porcentajes iguales o mayores de 75% de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa son normales y los menores a 75% se consideran anormales. De todo el grupo de estudio, en 8 no fue posible tomar la muestra de sangre para la determinación de acetilcolinesterasa.

Putumayo fue el departamento que presentó el mayor porcentaje (77,8%) de individuos con inhibición de la acetilcolinesterasa.

Igualmente, se realizaron las determinaciones para 13 plaguicidas organoclorados en suero. Es importante aclarar que los derivados clorados tienen diferentes estructuras químicas que se pueden clasificar de la siguiente manera:

DDT y compuestos análogos: DDT, DDE, metoxicloro y dicofol, entre otros.

Hexacloro ciclohexano y compuestos análogos: HCB y el lindano.

Ciclodienos: aldrín, dieldrín, endrín, isodrín, telodrín y endosulfán.

Lindenos clorados: clordano, heptacloro y nonaclor.

Terpenos o canfenos policlorados: toxafeno y strobane (28)

Hay que tener en cuenta que una persona puede tener más de un metabolito. De todos los plaguicidas analizados, el heptacloro fue el que se presentó con mayor frecuencia, 64,3% (72), seguido del 4,4-DDE (metabolito del DDT), 17,0% (19); el aldrín, 14,3% (16); el gamma-hexaclorobenceno, 10,7% (12), y el alfa-hexaclorobenceno, 8,9% (10). Teniendo en cuenta la cantidad encontrada de estos plaguicidas al ser analizados en suero, el heptacloro mostró el promedio más alto, 9,1 ng/L, y un rango de 0 a 43,8, seguido por el 4,4-DDT, 5,9 ng/L, y un rango de 0 a 284,9. El departamento con mayor frecuencia de casos con niveles de plaguicidas organoclorados en suero fue Putumayo, seguido por Guaviare y La Guajira.

Análisis bivariado

Se realizó el análisis bivariado entre los diferentes valores de los biomarcadores empleados y las variables incluidas en la encuesta.

La edad fue estratificada en tres grupos de 2 a 14 años, de 15 a 44 años y de 45 a 78 años; se halló que en el grupo de 15 a 44 años estuvo el mayor porcentaje (40,2%) de individuos que trabajaba con plaguicidas, con una asociación estadísticamente significativa ($p < 0,005$).

Relación de variables con los niveles de glifosato y su metabolito, ácido amino-metil-fosfónico, en orina

Los resultados de glifosato y ácido amino-metil-fosfónico cuantificado fueron relacionados con los elementos de protección personal y las medidas de higiene industrial, como cambio de ropa y ducharse el cuerpo al finalizar la jornada laboral, lavarse las manos antes de ingerir los alimentos y consumir alimentos en el sitio de trabajo, entre otras. Aunque son 56 las personas que refirieron el uso de plaguicidas, a tres de ellas no fue posible analizarles glifosato y el ácido amino-metil-fosfónico en orina, por lo que el análisis se efectuó con 53 personas. No se

encontró ninguna asociación estadísticamente significativa entre elementos de protección personal y las medidas de higiene industrial ($p>0,005$), y los niveles de glifosato en orina. Para la determinación del ácido amino-metil-fosfónico cuantificado en orina se encontró una asociación entre esta variable y el no uso de tapabocas desechable ($p=0,001$), al igual que con el uso de camisa manga larga ($p<0,005$).

Los resultados de los niveles de glifosato y ácido amino-metil-fosfónico cuantificados y la sintomatología reportada en las encuestas, no mostraron una asociación estadísticamente significativa ($p>0,005$). Sin embargo, los síntomas que con mayor frecuencia reportaron los individuos que tenían valores de glifosato y ácido amino-metil-fosfónico cuantificables fueron cefalea, seguida por ardor ocular, fiebre, mareo y sequedad en la piel. Teniendo en cuenta que no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre cada una de las manifestaciones clínicas y los niveles de glifosato y ácido amino-metil-fosfónico cuantificados, se agruparon los síntomas por sistemas, y tampoco se halló relación.

No se encontró asociación estadísticamente significativa entre antecedentes toxicológicos, como fumar, consumir licor o haberse intoxicado, con los niveles de glifosato ($p>0,005$); pero, en cambio, el antecedente de intoxicación con plaguicidas y niveles de ácido amino-metil-fosfónico cuantificados en orina sí presentó asociación ($p=0,027$).

Tal como se observa en el cuadro 6, se encontró una relación estadísticamente significativa entre el uso de glifosato terrestre (manual) y los niveles de este herbicida en orina ($OR=2,54$; $IC95\% 1,08-6,08$), mientras que para el ácido amino-

metil-fosfónico no hubo una relación significativa ($OR=0,24$; $IC95\% 0,02-4,47$).

En relación con la vía de exposición, 33 (78,6%) de los individuos que tenían glifosato cuantificado refirieron como vía de exposición la aérea ($p=0,346$) y 16 (38,1%), la dérmica ($p=0,294$). Las mismas vías se reportaron en quienes se detectó el metabolito ácido amino-metil-fosfónico, 4 (100%) por vía aérea ($p=0,222$) y 2 (50%) por vía dérmica ($p=0,816$). Sin embargo, no se encontró asociación entre estas variables ($p>0,005$).

Relación de variables con los niveles de acetilcolinesterasa en sangre

Se estudio la relación de las variables edad, sexo y vía de exposición a plaguicidas con los niveles de acetilcolinesterasa, sin que se encontrara una asociación significativa ($p>0,005$).

En cuanto al uso de elementos de protección personal y las medidas de higiene industrial con los niveles de acetilcolinesterasa, no se encontró una diferencia significativa entre los que tienen dichos niveles normales y anormales.

La cefalea (39,5%) y el ardor ocular (23,7%) fueron las manifestaciones clínicas que con mayor frecuencia reportaron los individuos con niveles de acetilcolinesterasa anormal. Sólo se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el aumento de los valores de acetilcolinesterasa y la resequead de piel ($p=0,046$) y el ardor ocular ($p=0,003$).

Relación de las diferentes variables con los niveles en suero de los plaguicidas organoclorados

Al relacionar el uso de elementos de protección personal y las medidas de higiene industrial

Cuadro 6. Relación entre los niveles de glifosato y AMPA y el uso de este herbicida terrestre (manual), Colombia, 2006.

Niveles de glifosato				Niveles de ácido amino-metil-fosfónico			
		Sí	No		Si	No	No
Uso de glifosato	Sí	27	29	Uso de glifosato	Si	2	54
	No	15	41		No	2	16
$(OR= 2,54; IC95\% 1,08-6,08)$				$(OR=0,24; IC95\% 0,02-4,47)$			

Fuente: Encuesta individual, Instituto Nacional de Salud, 2006

con la presencia de organoclorados en suero, no se encontró asociación entre estas variables ($p > 0,005$). Sin embargo, un alto porcentaje de los individuos con organoclorados en las muestras de suero, trabajaba con la ropa de calle (85,7%), la cambiaban al finalizar la jornada laboral (80,3%) y se duchaban al terminar la misma (82,1%), pero no empleaban ningún elemento de protección personal al usar este tipo de plaguicidas altamente liposolubles.

La presencia o ausencia de organoclorados se relacionó con cada una de las manifestaciones clínicas reportadas en el estudio; sin embargo, no se encontró asociación con ninguna de ellas, ni tampoco cuando las manifestaciones se agruparon por sistemas.

Discusión

Los estudios en poblaciones humanas expuestas a agentes ambientales nocivos para la salud, constituyen en la actualidad el objeto de numerosas investigaciones epidemiológicas y toxicológicas, partiendo del hecho de que cualquier exposición a productos potencialmente peligrosos debe ser evitada en la medida de lo posible; sin embargo, no hay que desconocer que numerosos individuos por razones de su trabajo están en contacto directo con productos químicos, en quienes se incrementa la probabilidad de sufrir efectos adversos sobre su salud (29).

El herbicida glifosato se utiliza ampliamente en la agricultura y para la erradicación de la coca y la amapola. En Colombia se estima que de 10% a 14% del uso total es para el programa de erradicación (7). Los hallazgos de esta investigación corroboran los resultados de otros estudios (7) sobre la amplia utilización de los plaguicidas y de otras sustancias empleadas, tanto en la producción de coca y amapola como en la agricultura; y, más allá del objetivo mismo, el estudio permitió confirmar el amplio uso del glifosato en la población y tener un panorama real de la problemática del uso indiscriminado de plaguicidas en ocho departamentos del país.

Todos los individuos (112) incluidos en el estudio vivían en zonas donde fue aplicado el Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos con Glifosato, y Putumayo fue el departamento donde se

recolectó el mayor número de muestras. El 99,0% de los individuos del estudio procedía de la zona rural y sólo una persona manifestó vivir en zona urbana, aunque la exposición a glifosato se produjo en el área rural; de éstos, el mayor porcentaje pertenecía al sexo masculino (56,3%), con un rango de edad muy amplio que osciló entre los 2 y los 78 años. En el grupo de edad de 30 a 34 años se presentó el mayor porcentaje de los individuos estudiados, lo que indica que es población laboralmente activa y que son los adultos jóvenes los que más se emplean en las actividades de cultivos ilícitos.

La tercera parte de los individuos manifestó no tener ninguna afiliación al SGSSS (36,0%). Lo anterior puede deberse a que la mayoría de trabajadores labora informalmente y no tiene un contrato de trabajo. El 45,0% de la población refirió estar afiliada al régimen contributivo, lo que les permite acceder a la atención en salud.

La proporción de población afiliada al régimen contributivo (45,5%) fue mayor a la que no tenía ninguna afiliación al SGSSS (36,0%) y, aunque no se puede explicar lo primero, lo segundo es un indicador de la condición de informalidad laboral. El porcentaje restante (17,8%) pertenece al régimen subsidiado y sólo 0,9% es atendido de forma particular.

Entre los individuos encuestados se encontró un porcentaje alto de población que refirió ser analfabeta, cifra que superó al promedio nacional que es del 13,0%. Es importante resaltar que 50,0% de la población no había terminado la educación primaria.

Un alto porcentaje de las personas que conformaron la muestra manifestaron que la forma como se expusieron al glifosato fue por el aire, seguida por el contacto directo que tuvieron con el herbicida en el momento de la aspersión. Lo anterior se confirma ya que la población mencionó haber estado realizando actividades como cultivar y caminar por la zona asperjada, lo que evidencia la exposición durante las aspersiones aéreas.

El 51,0% de la población estudiada realiza actividades agrícolas, 50,0% utiliza plaguicidas y

37,5% se había empleado como jornalero en los 15 días anteriores a la entrevista, oficio en el cual puede haber mayor probabilidad de exposición a plaguicidas; por lo tanto, la exposición de estos individuos no es exclusivamente por las aspersiones aéreas que realiza el Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos con Glifosato, sino por exposición ocupacional. Estos trabajadores agrícolas se dedican a varios tipos de cultivos, entre ellos la coca; por ende, las necesidades en función del control de plagas y enfermedades del cultivo son diferentes y conlleva a la utilización de gran cantidad de productos, incluso al empleo de mezclas complejas de diferentes compuestos sin atender ninguna fórmula o medida. Lo anterior se corrobora con el hallazgo de 45 nombres comerciales de agroquímicos y que 50,0% de la población refirió el uso de plaguicidas en su trabajo por un tiempo prolongado que, en promedio, fue de 7 años y 8 meses, lo que se considera como una exposición crónica que pudiera desencadenar efectos a largo plazo.

Los herbicidas fueron el principal grupo de plaguicidas utilizado por la población que realiza actividades agrícolas, seguido por los insecticidas y fungicidas, datos que concuerdan con los productos registrados por el Instituto Colombiano Agropecuario como de mayor comercialización en el país (30).

Es importante resaltar que el mayor porcentaje de los plaguicidas empleados por la población de estudio pertenecen a la categoría toxicológica I, extremadamente tóxicos, seguido por la categoría III, medianamente tóxicos.

El plaguicida más frecuentemente utilizado fue el Gramoxone® (paraquat (1,1-dimetil,4,4-bipiridilo), clasificado como extremadamente tóxico.

Es importante resaltar que los encuestados informaron el uso de plaguicidas organoclorados, los cuales se encuentran prohibidos en el país desde 1993 por el Ministerio de Salud (Resolución 10255/93).

Entre los plaguicidas de categoría toxicológica IV, el glifosato fue el más utilizado, lo que concuerda con informado en la literatura mundial (7), y se

encontraron seis nombres comerciales cuyo ingrediente activo es N-fosfonometil-glicina. Sin embargo, la población no reconoce que estos plaguicidas contienen glifosato.

Al ordenar los plaguicidas mencionados por los individuos del estudio teniendo en cuenta la DL_{50} , se encontró que los plaguicidas con una menor DL_{50} fueron aquéllos que tienen como ingrediente activo el metamidofos, monocrotofos y paraquat, es decir, son los de mayor toxicidad. El glifosato fue el plaguicida con la mayor DL_{50} , lo que indica menor toxicidad.

Un porcentaje muy bajo de las personas que utilizan plaguicidas recibieron capacitación sobre uso y manejo de los mismos alguna vez en su vida, razón por la cual la mayoría de los encuestados desconoce los posibles efectos que puede desencadenar la exposición a plaguicidas, y no tiene información sobre los elementos de protección y las medidas de higiene industrial que deben seguir cuando están trabajando con estas sustancias químicas. Aunque varias de las personas (55,4%) refieren almacenar los plaguicidas fuera de la casa, 23,2% mencionó guardarlo dentro de la misma, lo cual puede ocasionar un incremento potencial de la exposición a plaguicidas, no sólo para el trabajador que lo utiliza sino para su familia, como está reportado en otros estudios (31).

Un aspecto crítico identificado es la forma como se almacenan y disponen estas sustancias y sus desechos. Los recipientes de los plaguicidas son reutilizados para almacenar agua y otros son quemados, enterrados, botados a campo abierto o arrojados al agua, lo que está ocasionando contaminación del medio ambiente.

En relación con los elementos de protección personal, se encontró que realizan las labores de aplicación de plaguicidas con la ropa de uso diario y no utilizan elementos de protección en cara, tronco ni manos; el uso de botas fue el único elemento que presentó una frecuencia importante; sin embargo, su uso se debe más a una protección de tipo físico por las condiciones del terreno en donde se labora que a una protección específica por el empleo de plaguicidas. Los individuos del estudio refirieron que no

tienen uniforme o ropa especial para el trabajo con plaguicidas y, además, lavan esta ropa mezclada con el resto de ropa de la familia, exponiéndose los miembros de la familia al riesgo de intoxicación por dichas sustancias.

Esta situación explica cómo 12,5% de estas personas manifestaron haber sufrido en su vida alguna intoxicación con plaguicidas, específicamente con Furadan®, Tamaron®, Lannate® y Metavin®, todos de categoría toxicológica I y pertenecientes al grupo de los organofosforados y carbamatos, los cuales son todavía los insecticidas más usados en el mundo y los que producen el mayor número de intoxicaciones agudas en nuestro país.

Cuando se presentó alguna sintomatología de intoxicación, sólo un pequeño porcentaje refirió consultar al médico y el resto prefirió tomar remedios caseros, lo que dificulta el correcto diagnóstico y tratamiento del paciente intoxicado, como también la notificación del caso al SIVIGILA. En consecuencia, se podría plantear la hipótesis de que existe un subregistro de los casos de intoxicación por plaguicidas reportados al SIVIGILA.

Por otro lado, al indagar sobre la actitud frente al Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos con Glifosato, sólo 7,1% reconoce que es una política de Estado que debe llevarse a cabo, pero la mayoría de ellos piensan que las aspersiones producen efectos sobre la salud, el medio ambiente, los animales, afectan la economía y los cultivos lícitos. Como se ha expresado en otras publicaciones, se encuentran diferentes posiciones respecto a esta medida, las cuales son irreconciliables y ninguna puede considerarse irrefutable (32).

Entre las manifestaciones clínicas informadas, la mayoría de los síntomas se relacionan con alteraciones neurológicas y de piel. Las alteraciones neurológicas, como cefalea, mareo, sudoración profusa y visión borrosa, se pueden relacionar con el uso de plaguicidas organofosforados y carbamatos, mientras que las alteraciones en piel pueden desencadenarse con el empleo de cualquier sustancia química, incluidos los plaguicidas como glifosato, organo-

fosforados y carbamatos (33). Igualmente, las manifestaciones del sistema digestivo, como vómito, náuseas, dolor abdominal y diarrea, se pueden presentar por la ingestión de múltiples sustancias químicas, pero también pueden tener origen bacteriano y viral, entre otras causas.

Del 39,6% de los individuos con glifosato cuantificable, 64,3% reportó el uso de este herbicida en sus actividades agrícolas y, del 3,8% que presentaron el metabolito ácido amino-metil-fosfónico, 50% igualmente lo empleaban en labores agrícolas. Es decir que el porcentaje restante de individuos que no lo empleaban directamente, pudieron haber tenido exposición por cercanía a los lugares donde se aplica el herbicida de forma manual o por las aspersiones aéreas con glifosato.

Se detectó que el departamento con el mayor número de individuos con glifosato y ácido amino-metil-fosfónico fue Putumayo, seguido por Guaviare, los cuales tienen amplia actividad agrícola y de cultivos ilícitos; por tanto, son zonas objeto del programa Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos con Glifosato.

Al relacionar los resultados cuantificados de glifosato y ácido amino-metil-fosfónico con los elementos de protección personal y las medidas de higiene industrial, aunque no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa, sí se describe el bajo uso de elementos de protección personal para ojos, vía respiratoria, tronco y miembros superiores e inferiores.

La sintomatología reportada en las encuestas relacionada con los niveles de glifosato y ácido amino-metil-fosfónico cuantificados, no dio tampoco asociaciones estadísticamente significativas. Los síntomas que con mayor frecuencia reportaron fueron cefalea, seguida por ardor ocular, fiebre, mareo y sequedad en la piel. Tanto la cefalea como el ardor ocular y la sequedad en la piel son manifestaciones que se pueden presentar por la exposición a glifosato; sin embargo, son muy inespecíficas y ocurren por exposición a múltiples sustancias químicas (34).

Al agrupar las manifestaciones clínicas por sistemas, los síntomas de piel, órganos de los

sentidos y neurológicos se relacionaron con niveles de 2 µg/L o mayores. Los síntomas en piel, como eritema y prurito, se pueden presentar por exposición a glifosato, al igual que los de los órganos de los sentidos, como enrojecimiento de los ojos y ardor ocular, ya que este herbicida tiene acción irritante sobre piel y mucosas. Respecto al sistema nervioso, el glifosato no lo afecta; el síntoma más frecuente fue la cefalea, la cual puede desencadenarse por innumerables causas.

Antecedentes toxicológicos como fumar o consumir licor, no se relacionaron con los niveles cuantificados de glifosato y de ácido amino-metil-fosfónico. Específicamente, el hábito de fumar no incrementa la absorción por esta vía, debido a que este plaguicida no es una sustancia volátil que ingrese fácilmente por inhalación. En relación con la vía de exposición, los individuos que tenían glifosato cuantificado refirieron la respiratoria y la dérmica, las cuales están relacionadas con el ingreso del herbicida, tanto por las aspersiones aéreas como por su uso en actividades agrícolas.

La exposición a plaguicidas con glifosato como ingrediente activo en actividades agrícolas, no produjo un aumento significativo de los niveles cuantificables de glifosato y ácido amino-metil-fosfónico en orina; es decir que el hecho de ser agricultor laboralmente expuesto a tales compuestos no se refleja en la detección de glifosato en orina o de su metabolito; esto se debe a la rápida excreción de este herbicida por el organismo (7-9).

Respecto al biomarcador de efecto, como es la determinación de la acetilcolinesterasa para evaluar la exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos (28), sólo el 8,7% de los que refirieron emplear estos plaguicidas presentaron valores anormales, a pesar de que fue el grupo químico más utilizado. Una limitación de nuestro estudio es que el valor de la actividad de la acetilcolinesterasa debe establecerse antes de la exposición a estas sustancias químicas y, al menos, con un seguimiento en las 72 horas siguientes a la terminación de la exposición. Por lo tanto,

el bajo porcentaje de individuos con valores anormales, puede deberse a que la muestra para la determinación de este biomarcador se tomó al mismo tiempo que se recolectaron las muestras para la determinación de glifosato y organoclorados, por lo que no se tuvo en cuenta el tiempo transcurrido entre la última exposición a organofosforados y carbamatos y la toma de la muestra. Ésta debe tomarse dentro de las primeras 72 horas después de terminada la exposición a este grupo de plaguicidas, debido a que la enzima comienza a regenerarse una vez cesa la exposición.

En los plaguicidas organoclorados, igualmente, se refleja la falta de uso de elementos de protección personal y la deficiencia de las medidas de higiene industrial. Aunque no se encontró una asociación estadísticamente significativa con las manifestaciones clínicas reportadas y su agrupación por sistemas, sí se evidenció que las manifestaciones del sistema nervioso (47,3%) fueron las que con mayor frecuencia mencionaron los individuos con organoclorados en suero, seguidas por las de piel, 40,2%. Esto se explica porque son plaguicidas altamente liposolubles, que se almacenan en órganos ricos en tejido graso, como el cerebro, y producen graves efectos neurotóxicos en el ser humano (28).

Aunque todos los plaguicidas organoclorados fueron prohibidos en el país a partir de 1993, por su alta persistencia, capacidad de biomagnificarse y por sus efectos neurotóxicos, los individuos del estudio reportaron el uso del tionil y el tiodan con endosulfán como ingrediente activo. Se encontraron en suero niveles de diez plaguicidas organoclorados; esto puede deberse a que son plaguicidas altamente persistentes y a que fueron ampliamente usados en nuestro país por 40 años, aproximadamente. Es importante resaltar que los individuos del estudio reportaron el uso actual de estos plaguicidas.

Los resultados de este trabajo ponen de manifiesto todos los riesgos asociados al uso de plaguicidas y la necesidad de fortalecer la vigilancia en salud pública sobre los potenciales efectos adversos sobre la salud que pueden producir estas sustancias químicas.

Se hace necesario que se capacite tanto a los trabajadores como a sus familias sobre los posibles efectos que puede desencadenar la exposición a plaguicidas y sobre las prácticas de manejo seguro de estas sustancias y, de esta manera, dar cumplimiento a lo establecido en el Decreto 1843 de 1991 acerca de las disposiciones sanitarias sobre uso y manejo de plaguicidas. También, se les debe sensibilizar con el objeto de que hagan un empleo racional de estos productos y de que reduzcan de manera significativa el uso de plaguicidas de categoría toxicológica I y II.

Es indispensable que se capacite al trabajador en el uso de elementos de protección personal y de medidas de higiene industrial, con el fin de que empleen ropa ligera de trabajo que recubra la mayor parte de la superficie corporal cuando se vaya a mezclar o aplicar plaguicidas, así como cuando limpien el equipo y los recipientes vacíos o evacúen los restos del plaguicida utilizado. Además, deben emplear guantes, botas y mascarillas adecuadas para la manipulación de los plaguicidas.

Se hace necesario un esfuerzo conjunto de los organismos de salud, entidades educativas, secretarías de salud y organismos de protección ambiental, con el objeto de desarrollar programas de vigilancia epidemiológica para los trabajadores del sector informal y para sus familias. Las secretarías de salud deben reforzar la implementación del protocolo de Vigilancia en Salud Pública de las Intoxicaciones por Plaguicidas, establecido por el Ministerio de la Protección Social y el Instituto Nacional de Salud.

El hallazgo de plaguicidas organoclorados evidencia el tráfico ilegal de estos productos pese a que, en la mayoría de países, han sido prohibidos o severamente restringidos, y su presencia deja ver la debilidad de los organismos de control estatal. Ante esta situación y el desconocimiento de la comunidad sobre los graves riesgos para la salud humana, animal y del ambiente, es necesario emprender campañas de divulgación masiva para advertir a la población sobre las implicaciones de su empleo.

Parte de las medidas de intervención de la problemática es el fomento del suministro de elementos de protección personal, particularmente en los trabajadores independientes o informales que no tienen recursos para adquirir dichos elementos.

No se encontró asociación con la detección de biomarcadores y el uso de alguna medida de protección personal, debido a que los trabajadores agrícolas expuestos a plaguicidas que participaron en el estudio no utilizan el conjunto de medidas de protección personal necesarias para la manipulación de los plaguicidas; su análisis se hizo de manera individual, con variaciones que van desde su ausencia hasta una utilización de 50% o menos de ellos. Es de anotar que muchos de los elementos referidos no son utilizados como medidas de protección en sí, sino que son de uso rutinario u obedecen a otras condiciones, como el empleo de las botas.

La metodología de este estudio permitió sólo la valoración de los efectos agudos. Después de hacer el análisis de la información, no se encontraron hallazgos concluyentes sobre la exposición al glifosato empleado en la erradicación de cultivos ilícitos y los efectos en la salud, debido a que se halló exposición ocupacional (uso agrícola) concomitante por la misma sustancia y por otras de mayor toxicidad que el herbicida empleado en el Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos con Glifosato.

Agradecimientos

A los directivos de las entidades territoriales de salud que respaldaron al equipo investigador del Instituto Nacional de Salud y, particularmente, a los funcionarios que realizaron el acompañamiento durante el desarrollo del trabajo de campo. Nuestro reconocimiento al Departamento Administrativo de Salud del Putumayo y a la epidemióloga Dyva Revelo Calderón; a la Secretaría de Salud de Santa Marta, por la colaboración de la epidemióloga Nazly Goenaga; a la Secretaría Departamental de Salud del Guaviare (E) y a la Directora de Salud Pública, Oveida Parra y Alba Colorado; a la

Dirección Seccional de Salud de Antioquia, a la epidemióloga Zulma del Campo Tabarez y a los técnicos de Salud Ambiental, Rosendo Orozco y Elidio Seguro.

Finalmente, agradecemos muy especialmente a la comunidad en general por haber contribuido con la realización de este estudio, al aceptar responder la encuesta y haber accedido a que se les tomaran las muestras para el mismo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses en esta publicación.

Financiación

Esta investigación fue financiada por el Ministerio de la Protección Social y el Instituto Nacional de Salud.

Referencias

- Internacional Programme on Chemical Safety (IPCS).** The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification. Geneva: World Health Organization; 2004.
- Salazar C, González G, Arcila O.** Guaviare. Población y territorio. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas, SINCHI, Ministerio del Medio Ambiente. Bogotá D.C.: TM Editores; 1999. p. 1-193.
- Grupo Factores de Riesgo Ambiental, Subdirección de Vigilancia y Control.** Intoxicaciones por sustancias químicas en Colombia notificadas al SIVIGILA. Bogotá D.C.: Instituto Nacional de Salud; 2007.
- Bernal HH, Paredes M.** Impacto ambiental ocasionado por las sustancias químicas, los cultivos ilícitos y actividades conexas. Santa Fe de Bogotá: Dirección Nacional de Estupefacientes; 2001. p. 42. Fecha de consulta: 21 de octubre de 2003. Disponible en: <http://www.dne.gov.co/?idcategoria=790>
- Ministerio de Salud.** Decreto 1843 del 22 de julio de 1991. Disposiciones sanitarias sobre uso y manejo de plaguicidas. Bogotá: Ministerio de Salud; 1991. p. 1-69.
- Dirección Nacional de Estupefacientes.** La lucha de Colombia contra las drogas ilícitas: acciones y Resultados. Bogotá D.C.: DNE; 2002.
- Solomon K, Aneón A, Cerdeira A, Marshall J, Sanín L.** Estudio de los efectos del programa de erradicación de cultivos ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida glifosato (PECI) y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente. Bogotá, D.C.: CICAD; 2005. Fecha de consulta: 22 de febrero de 2008. Disponible en: <http://www.dne.gov.co/index.php?idcategoria=792>
- Burger M, Fernández S.** Exposición al herbicida glifosato: aspectos clínicos toxicológicos. Rev Med Uruguay. 2004;20:202-7.
- Williams GM, Kroes R, Munro IC.** Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate for humans. Regul Toxicol Pharmacol. 2000;31:117-65.
- Devine MD, Duke SO, Fedtke C.** Physiology of herbicide action. Englewood Cliffs, NJ: PTR Prentice Hall; 1993.
- Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.** Información sobre glifosato. Uso y toxicología. Santa Fe de Bogotá: Ministerio de Salud, INS; 1992.
- United States Environmental Protection Agency (EPA).** Registration eligibility decision facts. Glyphosate. Publication No. EPA-738-F-93-011. Washington D.C.: EPA; 1993.
- Worthing CR, Hance RJ.** The pesticide manual. 9th edition. Surrey, Great Britain: The British Crop Protection Council; 1991. p. 459-60.
- Chang CY, Peng YC, Hung DZ, Hu WH, Yang DY, Lin TJ.** Clinical impact of upper gastrointestinal tract injuries in glyphosate-surfactant oral intoxication. Hum Exp Toxicol. 1999;18:475-8.
- Lee HL, Chen KW, Chi CH, Huang JJ, Tsai LM.** Clinical presentations and prognostic factors of a glyphosate - surfactant herbicide intoxication: a review of 131 cases. Acad Emerg Med. 2000;7:906-10.
- Monroy CM, Cortés AC, Sicard DM, Groot H.** Cito-toxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. Biomédica. 2005;25:335-45.
- Ministerio de Defensa.** Identificación del herbicida glifosato, propiedades y toxicidad. 2002. Fecha de consulta: 22 de febrero de 2008. Disponible en: http://www.dne.gov.co/recursos_user/documentos/Doc_tecnicos/glifosato.pdf.
- Unidad Administrativa Especial, Dirección Nacional de Estupefacientes, Ministerio de Justicia y del Derecho.** Identificación del herbicida a aplicar, propiedades y toxicidad. Plan de manejo ambiental para la aplicación del herbicida glifosato en la erradicación de cultivos ilícitos. Documento técnico. Santa Fe de Bogotá: Ministerio de Justicia y del Derecho; 1998.
- Environmental Protection Agency (EPA).** Consumer factsheet on: Glyphosate. Ground water and drinking water, 1995. Fecha de consulta: 22 de febrero de 2008. Disponible en: http://www.epa.gov/ogwdw000/contaminants/dw_contamts/glyphosa.html
- Jauhainen A, Räsänen K, Sarantila R, Nuutinen J, Kangas J.** Occupational exposure of forest workers to glyphosate during brush saw spraying work. Am Ind Hyg Assoc J. 1991;52:61-4.
- Cox C.** Herbicide factsheet: Glyphosate (Roundup). Journal of Pesticide Reform. 1998;18:3-17.

22. **University of Idaho, University of California at Davis, Institute for Environmental Toxicology, Michigan State University, National Agricultural.** Extension toxicology network. Pesticide information profiles. Glyphosate. 1996. Fecha de consulta: 22 de febrero de 2008. Disponible en: <http://extoxnet.orst.edu/pips/glyphosa.htm>
23. **De Ross A, Blair A, Rusiecki J, Hoppin J, Svec M, Dosemeci M, et al.** Cancer incidence among glyphosate-exposed pesticide applicators in the agricultural health study. *Environ Health Perspect.* 2005;113:49-54.
24. **Revelo D.** Efectos de la fumigación aérea con glifosato. Valle del Guamuez-San Miguel-Orito. Mocoa: Dasalud Putumayo, Oficina de Planeación, Sección Epidemiología; 2001. p. 24.
25. **Uribe C.** Supuestos efectos del glifosato en la salud humana. Clínica de Toxicología Uribe Cualla. Informe técnico. 2001. Fecha de consulta: 22 de febrero de 2008. Disponible en: <http://www.ciponline.org/colombia/wwwfuc1s.pdf>
26. **Limperos G, Ranta KE.** A rapid screening test for the determination of the approximate cholinesterase activity of human blood. *Science.* 1953;117:453-5.
27. **United States Environmental Protection Agency (EPA).** Manual of analytical methods for pesticides in humans and environmental samples. A compilation of methods selected for use in pesticide monitoring programs. Analysis of human blood or serum. Publication No. EPA-600/8-80-038. Section 5, A(3),(a). Atlanta, USA: U.S Government Printing Office; 1980. p. 1-7
28. **Córdoba D.** Toxicología. Cuarta Edición. Bogotá: Editorial Manual Moderno; 2000. p. 121-6.
29. **Organización Panamericana de la Salud.** Vigilancia sanitaria de plaguicidas: experiencia de Plagsalud en Centroamérica. Washington D.C: OPS; 2004.
30. **Grupo Regulación y Control de Plaguicidas Químicos de Uso Agrícola, Instituto Colombiano Agropecuario.** Comercialización de plaguicidas. Producción-ventas-importación-exportación. Bogotá: Editorial Produmedios; 2002.
31. **Acquavella J, Alexander B, Mandel J, Gustin C, Baker B, Chapman P, et al.** Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the Farm Family Exposure Study. *Environ Health Perspect.* 2004;112:321-6.
32. **Idrovo A.** Plaguicidas usados en la fumigación de cultivos ilícitos y salud humana: ¿una cuestión de ciencia o política? *Rev Salud Pública.* 2004;6:199-211.
33. **Nagami H, Nishigaki Y, Matsushima S, Matsushita T, Asanuma S, Yajima N, et al.** Hospital-based survey of pesticide poisoning in Japan, 1998-2002. *Int J Occup Environ Health.* 2005;11:180-4.
34. **Williams G, Kroes R, Munro I.** Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2000;31:117-65.

COMUNICACIÓN BREVE

Presencia de anticuerpos contra neuroreceptores cardiacos de acetilcolina muscarínicos tipo II en pacientes con enfermedad de Chagas e implantación de marcapasos

Nubia Catalina Tovar¹, María Clara Echeverry¹, Guillermo Mora²

¹ Laboratorio de Parasitología, Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

² Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. En diferentes tipos de afecciones cardiacas, incluida la enfermedad de Chagas, se ha descrito la presencia de anticuerpos que reconocen neuroreceptores cardiacos. La respuesta más frecuente es contra receptores de acetilcolina del tipo muscarínico subtipo II (anti-m2MACHR), que reconocen este receptor.

Objetivo. El objetivo del presente estudio fue establecer la frecuencia de anticuerpos anti-m2MACHR en un grupo de pacientes cardiopatas con implantación de marcapasos y enfermedad de Chagas.

Materiales y métodos. Cincuenta y dos pacientes con enfermedad de Chagas e implantación de marcapasos cardiaco fueron pareados por diagnóstico de implantación con 52 individuos con marcapaso y sin enfermedad de Chagas. La presencia de anticuerpos anti-m2MACHR fue estimada mediante ELISA e inmunoblot.

Resultados. El 32,7% de los casos presentaban anticuerpos contra el segundo dominio extracelular del receptor versus 3,8% de los controles ($p < 0,001$). El 51,9% de los casos presentaron anticuerpos contra el tercer dominio intracelular del receptor versus 19,2% de los controles ($p < 0,001$). No se encontraron diferencias clínicas entre los pacientes que presentan y los que no presentan anticuerpos anti-m2MACHR.

Conclusión. El odds ratio (OR) del presente estudio muestra una mayor probabilidad de presentar anticuerpos anti-m2MACHR en pacientes con implantación de marcapaso e infección por *Trypanosoma cruzi*, que en aquéllos con implantación que no presentan infección por el parásito. La presencia de anticuerpos anti-m2MACHR no está relacionada con ningún tipo de manifestación clínica de las evaluadas en este estudio.

Palabras clave: enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, receptores muscarínicos, marcapaso artificial, anticuerpos, corazón.

Presence of antibodies to cardiac neuroreceptors in patients with Chagas disease

Introduction. The presence of antibodies against cardiac neuroreceptors has been established in several kinds of heart diseases as well as in Chagas disease. The antibody type most frequently identified is that which recognizes the muscarinic acetyl choline receptor type II (anti-m2MACHR).

Objective. The frequency of the anti-m2MACHR was determined in a group of Colombian patients with permanent pacemaker implantation and Chagas disease.

Materials and methods. Fifty-two patients with Chagas disease and permanent heart pacemaker implantation were matched by implantation diagnosis with 52 individuals that required pacemaker, but without Chagas disease. The presence of antibodies that recognized the m2MACH was assessed in the two groups by ELISA and Western blot by using two peptide sequences of the (m2MACHR), the second extracellular domain (2e) and the third intracellular domain (3i).

Results. Serological response frequency against 2e-m2MACHR in Chagas patients was 32.7% compared with 3.8% ($p < 0.01$) in the controls; response against 3i-m2MACHR was 51.9% compared with 19.2% ($p < 0.01$) for the controls. No clinical differences were observed between

individuals that presented anti-m2MACHR and those who did not.

Conclusion. The frequency of anti-m2MACHR was higher in patients with Chagas disease for two of the receptor domains. Furthermore, patients with pacemaker therapy are more likely to have anti-m2MACHR and infection by *Trypanosoma cruzi*. The anti-m2MACHR response is not associated with any discernable clinical manifestation in this group of patients.

Key words: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*; receptors, muscarinic; pacemaker, artificial; antibodies, heart.

La regulación de la frecuencia y el inotropismo cardíaco la ejerce el sistema nervioso autónomo. Mediante este sistema, el gasto cardíaco responde a las condiciones fisiológicas variables del organismo. Las terminales del sistema nervioso autónomo del miocardio tienen neurorreceptores adrenérgicos (a y b adrenérgicos) y colinérgicos (muscarínicos) (1) que se encuentran presentes en cardiomiocitos y células ganglionares en proporciones diversas (2,3). Estos son del tipo de receptores acoplados a proteínas G (G-protein coupled receptors, GPCR), en los cuales el sitio de interacción con el agonista se encuentra en el segundo dominio extracelular y, el acople a la proteína G, en el tercer dominio intracelular (4).

En pacientes con enfermedad de Chagas con cardiopatía crónica y en fase indeterminada, se ha descrito la presencia de anticuerpos circulantes que reconocen los neurorreceptores β -adrenérgicos y colinérgicos muscarínicos cardíacos del tipo II (anti-m2MACHR) que tienen actividad funcional en modelos *in vitro* e *in vivo* (5-11).

La reactividad de los anticuerpos anti-m2MACHR ha sido descrita contra el tercer dominio intracelular del receptor (12), pero la mayoría de estudios se han centrado en la reactividad dada por el reconocimiento de una secuencia de 25 aminoácidos correspondiente al segundo aro extracelular del m2-MACHR (6,8,11,13) (figura 1). En ensayos *in vitro*, se ha evaluado la capacidad funcional de este reconocimiento

y se ha demostrado que el acople del receptor con los anticuerpos produce una respuesta fisiológica similar a la del ligando natural, dada por la disminución en la fuerza de contracción del tejido cardíaco (14), la variación en los niveles intracelulares de AMPc y GMPc (5,8-10), la supresión de corrientes de calcio (15,16) y la pérdida de la sensibilización del receptor (11).

Esto ha permitido postular una posible asociación entre el desarrollo de la cardiopatía y la presencia de anticuerpos que interactúan con los neurorreceptores. No obstante, la evidencia al respecto es contradictoria. Mientras algunos estudios concluyen que la presencia de anticuerpos anti-m2MACHR en pacientes con cardiopatía chagásica crónica está asociada a manifestaciones clínicas de bradicardia (5), disfunción del nervio vago (17), fibrilación auricular (13), enfermedad del nódulo (18) y arritmias ventriculares (19), otros demuestran que no existe disfunción cardíaca en los pacientes que presentan altos títulos de estos anticuerpos (20).

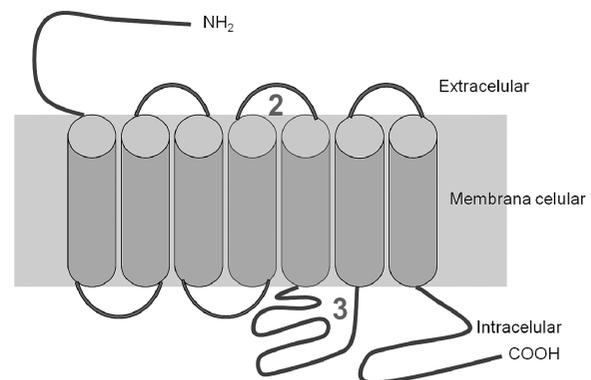


Figura 1. Diagrama del receptor muscarínico de acetilcolina tipo II. El número 2 señala el segundo aro extracelular del receptor; el número 3 señala el tercer aro intracelular de receptor.

Correspondencia:

María Clara Echeverry, División de Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, edificio 471, oficina 302, Ciudad Universitaria, Bogotá, D.C., Colombia. Teléfono: (571) 316 5000, extensión 15032 y 15033; fax: (571) 316 5000, extensión 15033
mcecheverryg@unal.edu.co

Recibido: 20/06/08; aceptado: 13/03/09

No obstante, la significancia de estos anticuerpos durante la infección por *Trypanosoma cruzi*, su grado de asociación con la enfermedad de Chagas y su utilidad pronóstica, permanecen sin ser aclarados.

El objetivo del presente estudio fue determinar la frecuencia de anticuerpos contra el tercer dominio intracelular (tdi-m2MACHR) y el segundo dominio extracelular del receptor (sde-m2MACHR), en una población de pacientes con cardiopatía chagásica crónica e infección por *T. cruzi*, en comparación con pacientes con cardiopatía de otro origen.

Materiales y métodos

Pacientes

El presente estudio corresponde a un estudio descriptivo, retrospectivo, con diseño de casos (52 pacientes serológicamente positivos para *T. cruzi*) y 52 controles (con serología negativa), apareados por el diagnóstico clínico que se hizo para adelantar la implantación del marcapasos.

Los pacientes fueron seleccionados de un estudio previo en el que se les practicaron pruebas serológicas para *T. cruzi* por las técnicas de IFI y ELISA, y se clasificaron clínicamente (21). Para la realización del estudio, se contó con el aval del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y la firma del consentimiento informado de cada uno de los pacientes, de acuerdo con lo reglamentado por la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud.

Materiales

Péptidos: se sintetizó un péptido correspondiente a la secuencia de aminoácidos del segundo aro extracelular del receptor de 168-VRTVEDGECYI QFFSNAAVTFGTAI-192, cuya identidad fue confirmada por espectrometría de masas ESI en la Emory University, PSN: 4653. Una proteína recombinante conformada por una proteína de fusión GST y un dominio correspondiente al tercer dominio intracelular del m2MACHR: 225-VEDGECYIQFFSNAAVTFGTAAAFYLPVIIMTV LYWHISRASKSRIKKDKKEPWANQDPVSPSLV QGRIVKPNNNNMPSSDDGLEHNKIQNGKAPR

DPVTENCVQGEEKESSNDSTSVSAVASNMRD DEI-356 (Acceso P08172) referencia AB5166 de la casa comercial Chemicon.

Los anticuerpos primarios correspondieron a un anticuerpo monoclonal contra el m2MACHR (22) y un anticuerpo policlonal contra el tdi-m2MACHR, referencia AB5166 marca Chemicon. Los anticuerpos secundarios se obtuvieron de la casa comercial ZIMED ref. 62-6520 y 62-7120. Kit Vector VIP (Vector Laboratories Ref: SK-4600). Los materiales de electroforesis y Western blot fueron suministrados por Biorad y, los demás reactivos, por SIGMA.

Determinación de anticuerpos contra el tercer dominio intracelular m2MACHR (tdi-m2MACHR) por Western blot

La proteína recombinante, referencia AB5166, descrita previamente y que contenía el tdi-m2MACHR, fue sometida a SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10% usando 100 ng por carril. Luego de la transferencia a papel de nitrocelulosa, se llevó a cabo el inmunoblot. La membrana fue bloqueada con una solución de TTBS (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, 0,9 % (w/v) NaCl, 0,1 % tween 20) con suplemento de leche descremada al 5% e incubada por una hora a temperatura ambiente.

Como control positivo se utilizó un anticuerpo policlonal contra el m2MACHR diluido 1:200 en TTBS con suplemento; los sueros de los pacientes fueron diluidos 1:20 en la misma solución.

El anticuerpo primario se incubó por 18 horas a 4°C con agitación constante, seguido de tres lavados con TTBS, de 10 minutos cada uno. El anticuerpo secundario anti-humano marcado con peroxidasa de rábano, fue diluido 1:3000 en TTBS con suplemento e incubado por una hora a temperatura ambiente con agitación constante; luego de lavada la membrana, la reacción se reveló colorimétricamente usando como sustrato el estuche Vector VIP para peroxidasa.

Como controles negativos se utilizaron sueros de cinco donantes sanos y con serología negativa para *T. cruzi*. Se consideró como resultado positivo la aparición de una banda a la misma altura del control positivo (50 kDa) (figura 1 y 2).

Determinación de anticuerpos contra el segundo dominio extracelular m2MACHR (*sdi-m2MACHR*) por ELISA

Se dispusieron 50 µl de una solución del péptido correspondiente al segundo aro extracelular del m2MACHR, a una concentración de 50 µg/ml en solución tampón de 100 mM de Na₂CO₃ pH 11,3, en cada pozo en una placa de 96 pozos. Se incubó 18 horas a 4°C. Luego de una hora de bloqueo (PBS: 10 mM de fosfatos, 140 mM de NaCl pH 7,3; con suplemento de tween al 0,2%, 1% de BSA), las placas se incubaron 18 horas con los sueros de los pacientes diluidos 1:60 en solución de bloqueo a 4°C.

Después de los lavados, se incubó el anticuerpo secundario anti-humano marcado con peroxidasa de rábano diluido 1:3000 en solución de bloqueo e incubado una hora a temperatura ambiente. La reacción colorimétrica se generó utilizando como sustrato TMB y la absorbancia se midió mediante un espectrofotómetro con

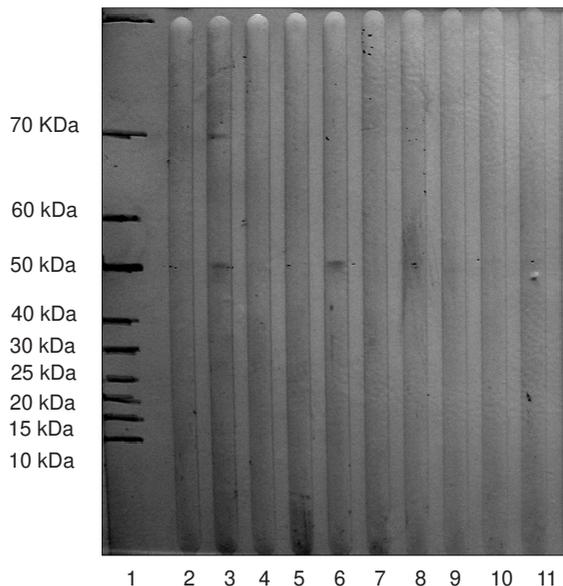


Figura 2. Determinación de anticuerpos contra el tercer dominio intracelular m2MACHR (*tdi-m2MACHR*) por inmunoblot; se presenta una fotografía de una membrana cuya reacción se ha revelado por el método colorimétrico, con reacción considerada como positiva contra el *tdi-m2MACHR* para el suero probado en el carril 6. En los carriles se encuentran los resultados de: 1, marcador de peso molecular; 2, control negativo; 3, control positivo, y 4-11, sueros de pacientes.

longitud de onda de 450 nm (9). Como controles negativos se utilizaron los mismos del inmunoblot. Se consideró como positiva la absorbancia 2,5 veces mayor que el promedio de la absorbancia de los controles negativos (13).

Análisis estadístico

La evaluación estadística se hizo por la prueba de ji al cuadrado con un nivel de confianza del 95%, analizando la distribución de anti-m2MACHR entre casos y controles. Se compararon las variables demográficas y clínicas entre casos y controles, y entre individuos con anticuerpos anti-m2MACHR para alguno de los dominios del receptor e individuos que no presentaron respuesta. La información se analizó mediante las herramientas dispuestas en Epi-Info, versión 3.3.2.

Resultados

El grupo de estudio estuvo conformado por 61,5% mujeres, con un promedio de edad de 60 y 59 años para los casos y controles, respectivamente, y un 38,5% de hombres, con un promedio de edad de 56 y 58 años para casos y controles, respectivamente. La distribución geográfica de la población en estudio fue heterogénea; en el grupo de casos, la mayoría provenía del departamento de Boyacá y, en el grupo de controles, la mayoría pertenecía al departamento de Cundinamarca (no se presentan los datos).

Se evidenció que el mayor porcentaje de pacientes presentaron diversos tipos de bloqueos aurículo-ventriculares como motivo para la implantación del marcapasos. En el grupo de los casos, el síntoma más frecuente antes de la implantación del marcapaso fue la disnea, mientras que, en el de los controles, fue el síncope. La enfermedad asociada más frecuentemente en el grupo de casos fue la hipertensión arterial sistémica y, en grupo de controles, fue la dislipidemia (cuadro 1). No hubo diferencias estadísticamente significativas en la distribución de estas variables comparando casos y controles, ni comparando los pacientes que presentaron anticuerpos m2MACHR con los que no los presentaron.

La evaluación de la presencia de anticuerpos contra los dominios funcionales del m2MACHR (figura 1) se adelantó por el método de inmuno-blot, para identificar reacciones contra el tercer dominio intracelular; en el carril 6 de la figura 2 se aprecia un ejemplo de lo que se consideró como una reacción positiva en esta prueba. El método ELISA se utilizó para identificar reacciones contra el segundo dominio extracelular. En la figura 3 se presentan los valores de las densidades ópticas obtenidas por ELISA. Debido a que se determinaron como positivos aquellos sueros que presentaron un valor de absorbancia 2,5 veces mayor que el promedio de los controles negativos de cada ensayo, en la figura se aprecia cómo algunos de los puntos que se consideran como negativos tienen densidades ópticas mayores que las de la mayoría de los positivos.

En el grupo de los casos, 51,9% (27 pacientes) presentó una reacción positiva contra el tercer

dominio del receptor *versus* 19,2% (10 pacientes) de los controles (cuadro 2). En los casos, 32,7% (17) de los pacientes presentó anticuerpos contra el segundo dominio extracelular del receptor *Vs.* 3,8% (2) de los controles. El 15,4% (8) de los casos presentaron anticuerpos para los dos dominios evaluados *versus* 1,9% (1) de los controles (cuadro 2). Se encontró una mayor probabilidad de presentar simultáneamente anticuerpos anti-m2MACHR contra los dos dominios en los casos que en los controles, como se muestra en el cuadro 2.

Debido a que el grupo de pacientes correspondía a quienes se les había implantado marcapasos por causas diversas, para evitar sesgos en el análisis por el diagnóstico de implantación del marcapaso, el grupo fue pareado por este factor. La distribución de esta variable evidencia que 71,1% de los pacientes tenía bloqueo aurículo-ventricular como causa de la implantación

Cuadro 1. Variables demográficas y clínicas de la población de estudio. Se describen las frecuencias simples para cada una de las variables evaluadas. Esta distribución de frecuencias no presenta significancia estadística en casos *Vs.* controles y, tampoco, en presencia *Vs.* ausencia de anticuerpos anti-m2MACHR.

Variables demográficas y clínicas		Enfermedad de Chagas (n=52)		Controles (n=52)		Valor p
		n	%	n	%	
Sexo	Femenino	32	61,5	32	61,5	0,32
	Masculino	20		20		0,32
Edad (años)	Mediana	61		61		0,6
Variables clínicas						
Diagnóstico de implantación del marcapasos	Bloqueo AV	37	71,1	37	71,1	0,33
	FA bloqueada	4	7,7	4	7,7	1,0
	Enfermedad del nódulo	4	7,7	4	7,7	0,08
	Hipersensibilidad carotídea	1	1,9	1	1,9	0,61
	Muerte súbita	6	11,5	6	11,5	0,32
Síntomas previos a la implantación	Asintomático	5	9,6	4	7,7	0,90
	Disnea	23	44,2	15	28,8	0,90
	Palpitaciones	4	7,7	8	15,4	0,60
	Pre-síncope	21	40,4	12	23,1	0,50
	Síncope	19	36,5	19	36,5	0,43
Enfermedades asociadas	HTA	22	42,3	24	46,2	1,0
	Diabetes mellitus	7	13,5	5	9,6	0,80
	Dislipidemias	18	34,6	26	50	0,10
	Tabaquismo	13	25	17	32,7	0,32
	Enfermedad coronaria	10	19,2	15	28,8	0,50

Bloqueo AV: bloqueo aurículo-ventricular completo o de segundo grado.

FA bloqueada: fibrilación auricular con bloqueo aurículo-ventricular.

HTA: hipertensión arterial; $p > 0,05$ para la comparación entre grupos de cada una de las variables.

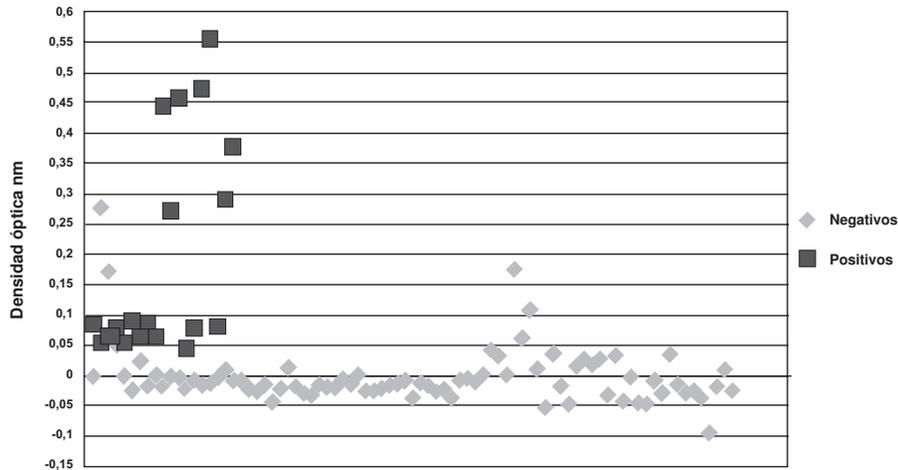


Figura 3. Dispersión de las densidades ópticas de las muestras evaluadas por ELISA para el sde-m2MACHr. Los rombos representan los valores de absorbancia de los sueros considerados como negativos y, los cuadros, los de los considerados positivos. Se establecieron como muestras positivas aquéllas que tuvieran un valor de absorbancia 2,5 veces mayor que el promedio de los controles negativos de cada ensayo.

Cuadro 2. Comparación de la distribución de anticuerpos anti-m2MACHr entre casos y controles.

		Enfermedad de Chagas (n=52)		Controles (n=52)		p ¹	OR
		%	n	%	n		
Anti- tdi-m2MACHr	+	51,9	27	19,2	10	0,0004	4,54
Anti- sde-m2MACHr	+	32,7	17	3,8	2	0,0001	12,14
Anti- tdi-m2MACHr y Anti- sde-m2MACHr	+	15,4	8	1,9	1	0,01	9,2

Anti-sde-m2MACHr: anticuerpos anti-m2MACHr que reconocen el segundo dominio extracelular del receptor.

Anti-tdi-m2MACHr: anticuerpos anti-m2MACHr que reconocen el tercer dominio intracelular del receptor.

¹p corregida por Fisher, intervalos de confianza del 95%

del dispositivo de marcapaso cardiaco. No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de anticuerpos anti-m2MACHr y el diagnóstico de implantación de marcapasos (no se presentan los datos).

La presencia de anticuerpos contra el m2MACHr no se encontró relacionada en ningún grado con las variables de persona (edad, sexo), lugar (procedencia), anormalidades clínicas previa implantación del marcapaso y funcionamiento del marcapasos.

Discusión

El presente estudio se basó en la comparación de la frecuencia de presentación de anticuerpos anti-m2MACHr en dos grupos de pacientes

cardiópatas con y sin cardiopatía chagásica crónica. El diseño experimental de casos y controles con pareo basado en el diagnóstico de implante del marcapaso, evidenció una mayor probabilidad de presentar anticuerpos anti-m2MACHr en pacientes cardiópatas con infección por *T. cruzi*.

Los resultados obtenidos en las diferentes pruebas realizadas sugieren que las personas con cardiopatía e infección por *T. cruzi* tienen una mayor probabilidad de presentar anticuerpos anti-m2MACHr. El presentar anticuerpos anti-m2MACHr contra el tercer dominio intracelular, es 4,5 veces más probable en casos de cardiopatía chagásica crónica que en pacientes con cardiopatía de otro origen, y es

12,1 veces más probable presentar anticuerpos anti-m2MACHR que reconocen el segundo dominio extracelular del receptor en casos de cardiopatía chagásica crónica que en pacientes con cardiopatía no asociada a la infección por *T. cruzi*.

En el análisis de la sintomatología previa a la implantación del marcapasos, los perfiles demográficos y los diagnósticos de implante, no se presentó ninguna diferencia significativa entre quienes presentaban anticuerpos anti-m2MACHR y aquéllos que no los presentaban (no se presentan los datos). Asimismo, es importante anotar que, a pesar del OR (*odds ratio*) alto para anticuerpos anti-m2MACHR e infección por *T. cruzi*, no todos los pacientes cardíopatas seropositivos para *T. cruzi*, presentaban estos anticuerpos. Por lo tanto, es controversial su relevancia como marcadores de pronóstico de desarrollo de cardiopatía por la infección con *T. cruzi*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio no están en total concordancia con los de otros autores. Altschüller *et al.* informaron, recientemente, que mediante un modelo de regresión lineal en 67 pacientes con cardiopatía chagásica crónica se evidenció interdependencia entre la presencia de anticuerpos anti-m2MACHR y la disfunción del nódulo sinusal (18). Cabe anotar que en el presente estudio sólo 7,7% de los pacientes presentaban disfunción sinusal; de éstos, ninguno presentó anticuerpos anti-m2MACHR, mientras que en el estudio mencionado el 46% de los pacientes presentaba este diagnóstico. Otros autores han sugerido que la presencia de anticuerpos anti-m2MACHR tiene un efecto inhibitorio sobre la función del nervio vago (13). No obstante, en este mismo estudio se concluye que éstos no están asociados con el nivel de disfunción ventricular y, por lo tanto, su relevancia fisiopatológica y pronóstica en el desarrollo de la cardiopatía chagásica continúa sin establecerse. Esta conclusión está acorde con lo planteado recientemente por Talvani, quien sustenta la imposibilidad de asociar la presencia de los anticuerpos anti-m2MACHR con el grado de disfunción cardíaca en ensayos clínicos (20).

En los trabajos realizados hasta la fecha, la frecuencia de anticuerpos contra el segundo dominio extracelular del m2MACHR en pacientes con enfermedad de Chagas, es mucho mayor que la encontrada en el presente estudio: 53% (en 32 pacientes) (19) y 78% (en 52 pacientes) (20), en comparación con el 32,7% (en 52 pacientes) informado aquí. Las frecuencias descritas por otros autores corresponden a pacientes de Argentina y Brasil.

Como algunos autores lo han postulado y como lo podría sugerir el OR (cuadro 2) encontrado en este trabajo, el parásito puede ser el causante de la producción de estos anticuerpos. No obstante, esta idea continúa siendo motivo de discusión.

Diversos autores sostienen la hipótesis de que la respuesta contra el sde-m2MACHR es producto de la reactividad cruzada entre regiones de proteínas ribosómicas del parásito que, por su homología en la secuencia primaria y la presencia de aminoácidos de carga negativa, producen IgG con capacidad de interacción con los receptores m2MACHR y β -adrenérgicos (23). Esto está en concordancia con la observación de la desaparición del efecto biológico sobre el tejido cardíaco por parte de anticuerpos anti-m2MACHR, cuando éstos son preincubados con regiones peptídicas de origen parasitario (24). En este mismo sentido, anticuerpos producidos contra el mayor antígeno de superficie del *T. cruzi*- cruzipain reaccionan contra la secuencia peptídica del sde-m2MACHR y compiten por el sitio de unión en el receptor con su antagonista quinuclidinil benzilato (25). Cremanschi informó, en el 2004, la producción de un anticuerpo monoclonal contra *T. cruzi* que reconocía tanto receptores β -adrenérgicos como m2MACHR en el tejido cardíaco de ratón (23).

En el presente estudio, a pesar de la mayor frecuencia de anticuerpos en casos de cardiopatía chagásica crónica, la hipótesis de que la génesis de estos anticuerpos es producto de la reactividad cruzada entre *T. cruzi* y el receptor no estaría en concordancia con el hallazgo de que 3,8% de los pacientes del grupo control presentaron anticuerpos anti-m2MACHR. Teniendo en cuenta que estos pacientes nunca

han entrado en contacto con el parásito (21), existe la posibilidad de que los anticuerpos sean generados por razones ajenas a la infección.

En estudios independientes se ha informado que 40% de los pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática (19) y 7,5% de pacientes con fibrilación auricular idiopática (14) presentan anticuerpos contra el sde-m2MChR. Esto es consistente con lo revisado por Fu (26), quien describió, a finales de los ochenta, la presencia de anticuerpos contra el sde-m2MChR en pacientes con cardiomiopatía dilatada. Esta variable no fue evaluada en el presente estudio; por lo tanto, no se puede descartar que el común denominador entre los pacientes que presentaron anticuerpos anti-m2MChR contra el segundo dominio, sea la cardiopatía dilatada.

En el presente estudio se determinó la frecuencia de los anticuerpos contra el tercer dominio intracelular del m2MChR, por Western blot, utilizando como antígeno una proteína de fusión de 50 kDa que contiene la parte central del tercer dominio intracelular del m2MChR (25). Los resultados obtenidos por este método mostraron una frecuencia de anticuerpos contra tdi-m2MChR en el grupo de los casos de 51,9% y, en el de los controles, de 19,2%, con una diferencia estadísticamente significativa. El tercer dominio intracelular del receptor es importante porque confiere especificidad para el acople de la proteína G y, además, porque es un sitio blanco de la fosforilación por cinasas (23). Retondaro, en 1996 (27), con un diseño similar y menor número de pacientes, describió una frecuencia de 48% de reactividad entre pacientes con cardiopatía chagásica crónica y asociación débil entre la presencia anticuerpos anti-m2MChR y el grado de compromiso cardíaco. La respuesta contra las secuencias peptídicas del tercer dominio intracelular del receptor también ha sido explicada por algunos autores por reactividad cruzada, gracias a la carga negativa de los aminoácidos (27).

No obstante, el hecho de que en el grupo control la frecuencia de los anticuerpos contra el tercer dominio intracelular sea seis veces mayor que la frecuencia de anticuerpos contra el segundo

dominio extracelular (cuadro 2), permitiría suponer que esta respuesta corresponde a una respuesta inespecífica de destrucción de cardiomiocitos por causas diversas, y el hecho de que sea 4,5 veces más probable encontrar estos anticuerpos en infección por *T. cruzi* estaría explicado por el alto grado de destrucción de tejido que conlleva la infección por este parásito (28).

Agradecimientos

A Neil Nathanson de la University of Washington, por la donación de anticuerpo monoclonal contra m2MChR; a Mauricio Rojas de Emory University, por la donación del péptido sintético; a Alberto Moren del Emory Vaccine Center, por el suministro de reactivos; a Irene Cerezo, por el apoyo logístico, y a Gustavo Rey, por el diseño y la digitalización de la base de datos.

Conflicto de intereses

Los autores de este artículo garantizamos que no tenemos conflictos de intereses.

Financiación

Este trabajo fue financiado por la División de Investigaciones, sede Bogotá, de la Universidad Nacional de Colombia, DIB Proyecto No20101006346. Programa de Jóvenes Investigadores 2007-Colciencias.

Referencias

1. **Abrams P, Andersson KE, Buccafusco JJ, Chapple C, de Groat WC, Fryer AD, et al.** Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *J Pharmacol.* 2006;148:565-78.
2. **Myslivecek J, Nováková M, Palkovits M, Krizanová O, Kvetnanský R.** Distribution of mRNA and binding sites of adrenoceptors and muscarinic receptors in the rat heart. *Life Sci.* 2006;79:112-20.
3. **Wang H, Han H, Zhang L, Shi H, Schram G, Nattel S, et al.** Expression of multiple subtypes of muscarinic receptors and cellular distribution in the human heart. *Mol Pharmacol.* 2001;59:1029-36.
4. **Pierce KL, Lefkowitz RJ.** Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2:727-33.
5. **Goin JC, Borda ES, Auger S, Storino R, Sterin L.** Cardiac M2 muscarinic cholinergic activation by human autoantibodies: association with bradycardia. *Heart.* 1999;82:273-8.

6. **Joensen L, Borda E, Kohout T, Perry S, García G, Sterin L.** *Trypanosoma cruzi* antigen that interacts with the β_1 -adrenergic receptor and modifies myocardial contractile activity. *Mol Biochem Parasitol.* 2003;127:169-77.
7. **Peter JC, Wallukat G, Tugler J, Maurice D, Roegel JC, Briand JP, et al.** Modulation of the M2 muscarinic acetylcholine receptor activity with monoclonal anti-M2 receptor antibody fragments. *J Biol Chem.* 2004;279:55697-706.
8. **Borda LE, Gorelik G, Genaro A, Goin JC, Borda ES.** Human chagasic IgG interacting with lymphocyte neurotransmitter receptor triggers intracellular signal transduction. *FASED J.* 1990;4:1661-7.
9. **Goin JC, Perez C, Borda E, Sterin BL.** Interaction of human chagasic IgG with the second extracellular loop of the human heart muscarinic acetylcholine receptor: functional and pathological implications. *FASED J.* 1997;10:77-83.
10. **Goin JC, Borda E, Leiros CP, Storino R, Sterin-Borda L.** Identification of antibodies with muscarinic cholinergic activity in human Chagas' disease: Pathological implications. *J Auton Nerv Syst.* 1994;47:45-52.
11. **Leiros C, Sterin-Borda L, Borda E, Goin JC, Hosey M.** Desensitization and sequestration of human M2 mAChRs by autoantibodies from patients with Chagas' disease. *J Biol Chem.* 1997;272:12989-93.
12. **Retondaro FC, dos Santos Costa PC, Pedrosa RC, Kurtenbach E.** Presence of antibodies against the third intracellular loop of the m2 muscarinic receptor in the sera of chronic chagasic patients. *FASEB J.* 1999;13:2015-20.
13. **Ribeiro AL, Giménez LE, Hernández CC, de Carvalho AC, Teixeira MM, Guedes VC, et al.** Early occurrence of anti-muscarinic autoantibodies and abnormal vagal modulation in Chagas disease. *Inter J Cardiol.* 2007; 117:59-63.
14. **Baba A, Yoshikawa T, Fukuda Y, Sugiyama T, Shimada M, Akaishi M, et al.** Autoantibodies against M2-muscarinic acetylcholine receptors: new upstream targets in atrial fibrillation in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 2004;25:1108-15.
15. **Del Corso C, Carvalho AC, Martino HF, Varanda WA.** Sera from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy decrease I_{Ca} in cardiomyocytes isolated from rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287:H1928-36.
16. **Hernández CC, Barcellos LC, Giménez LE, Cabarcas RA, García S, Pedrosa RC, et al.** Human chagasic IgGs bind to cardiac muscarinic receptors and impair L-type Ca²⁺ currents. *Cardiovasc Res.* 2003;58:55-65.
17. **Ribeiro AL, Giménez LE, Hernández CC, de Carvalho AC, Teixeira MM, Guedes VC, et al.** Early occurrence of anti-muscarinic autoantibodies and abnormal vagal modulation in Chagas disease. *Int J Cardiol.* 2007; 117:59-63.
18. **Corrêa MB, Pedrosa RC, Pereira BB, Corrêa WB, Medeiros A, Costa PC.** Chronic Chagas disease patients with sinus node dysfunction: is the presence of IgG antibodies with muscarinic agonist action independent of left ventricular dysfunction. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40:665-71.
19. **Medei E, Pedrosa RC, Benchimol PR, Costa PC, Hernández CC, Chaves EA, et al.** Human antibodies with muscarinic activity modulate ventricular repolarization: basis for electrical disturbance. *Int J Cardiol.* 2007;115:373-80.
20. **Talvani A, Rocha MO, Ribeiro AL, Borda E, Sterin-Borda L, Teixeira MM.** Levels of anti-M2 and anti-beta1 autoantibodies do not correlate with the degree of heart dysfunction in Chagas' heart disease. *Microbes Infect.* 2006;8:2459-64.
21. **Mora G, Echeverry M, Rey G, López M, Posada L, Rivas F.** Frecuencia de anticuerpos *anti-Trypanosoma cruzi* en pacientes portadores de marcapasos de la Clínica San Pedro Claver de Bogotá. *Biomédica.* 2007;27:483-9.
22. **Luetje C, Brumwel C, Gainer M, Peterson G, Schimerlik M, Nathanson N.** Isolation and characterization of monoclonal antibodies specific for the cardiac muscarinic acetylcholine receptor. *Biochemistry.* 1987;26:6892-6.
23. **Cremaschi G, Fernández MM, Gorelik G, Goin JC, Fossati CA, Zwirner NW, et al.** Modulatory effects on myocardial physiology induced by an anti-*Trypanosoma cruzi* monoclonal antibody involve recognition of major antigenic epitopes from beta1-adrenergic and M2-muscarinic cholinergic receptors without requiring receptor cross-linking. *J Neuroimmunol.* 2004;153:99-107.
24. **Masuda MO, Levin M, De Oliveira SF, Dos Santos PC, Bergami PL, Dos Santos NA, et al.** Functionally active cardiac antibodies in chronic Chagas' disease are specifically blocked by *Trypanosoma cruzi* antigens. *FASEB J.* 1998;12:1551-8.
25. **Sterin-Borda L, Giordanengo L, Joensen L, Gea S.** Cruzipain induces autoantibodies against cardiac muscarinic acetylcholine receptors. Functional and pathological implications. *Eur J Immunol.* 2003;33: 2459-68.
26. **Fu ML.** Characterization of anti-heart M2 muscarinic receptor antibodies -a combined clinical and experimental study. *Mol Cell Biochem.* 1996;163:343-7.
27. **Retondaro FC, Dos Santos PC, Pedrosa RC, Kurtenbach E.** Presence of antibodies against the third intracellular loop of the m2 muscarinic receptor in the sera of chronic chagasic patients. *FASEB J.* 1999;13:2015-20.
28. **Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV.** Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation.* 2007;115:1109-23.

REVISIÓN DE TEMA

Las metacaspasas y su rol en la vida y muerte de los parásitos protozoarios humanos

Iveth J. González

Departamento de Bioquímica, Universidad de Lausana, Epalinges, Suiza.

Las metacaspasas son proteasas de cisteína similares estructuralmente a las caspasas y cuyos genes están presentes en organismos carentes de caspasas, tales como plantas, levaduras y parásitos protozoarios.

El bien conocido papel de varias caspasas en la apoptosis de células de mamíferos, ha motivado el estudio del posible rol de las metacaspasas en la muerte celular programada de los organismos en los cuales se expresan. Así, por ejemplo, las metacaspasas de los parásitos protozoarios humanos de los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* han sido implicadas en muerte celular programada. Sin embargo, algunos estudios en *T. brucei* señalan que estas proteínas podrían estar involucradas en otras funciones biológicas tales como procesos de reciclaje. Los parásitos del género *Plasmodium* también expresan metacaspasas, pero aún se sabe poco sobre su función.

La presencia de más de una metacaspasa en algunos de estos microorganismos, ha llevado a especular que estas proteínas podrían tener funciones fisiológicamente redundantes o diferentes de acuerdo con su localización e interacción con otras moléculas. Los estudios recientes han demostrado que la especificidad catalítica de las metacaspasas difiere de aquélla de las caspasas. Esta característica, sumada a la ausencia de sus genes codificadores en el genoma de mamíferos, hace de las metacaspasas y de sus mecanismos de activación un área interesante de investigación en la identificación de nuevos blancos terapéuticos en los parásitos causantes de tripanosomiasis, leishmaniasis y malaria.

La presente revisión resume la información disponible sobre las metacaspasas y busca motivar la generación de masa crítica en este tema en los países hispanohablantes.

Palabras clave: caspasa, apoptosis, *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, malaria.

Metacaspases and their role in the life cycle of human protozoan parasites

Metacaspases are caspase-related cysteine-proteases that are present in organisms devoid of caspases such as plants, yeast, and protozoan parasites. Since caspases are important effector molecules in mammalian apoptosis, the possible role of metacaspases in programmed cell death has been evaluated in the organisms where they are expressed. In some species of the human protozoan parasites *Trypanosoma* spp. and *Leishmania* spp., metacaspases have been involved in programmed cell death, although a role of metacaspases in recycling processes in *T. brucei* has also been suggested. Metacaspases are also expressed in *Plasmodium* spp., however their role in these organisms is still unknown. More than one metacaspase gene is present in some of these parasites, which suggests that these proteins are physiologically redundant or have different functions depending on their localization and protein interactions. The catalytic activity of metacaspases is different from that of caspases—again noting that metacaspase genes are absent in mammals. These characteristics make metacaspases and their activating mechanisms interesting subjects of research in the development of new drug targets for the treatment of trypanosomiasis, leishmaniasis, and malaria. A summary of the literature on metacaspases is provided, and Latin American researchers are encouraged to more actively explore the metacaspase potential.

Key words: caspases, apoptosis, *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, malaria.

Las metacaspasas son un grupo de proteínas recientemente identificadas, similares a las caspasas (1). Las caspasas son una familia de proteasas de cisteína específicas de aspartato, importantes en los procesos inflamatorios y en el tipo de muerte celular programada, llamada apoptosis de células de mamíferos (2). Se caracterizan por ser expresadas como zimógenos catalíticamente inactivos y requerir de la escisión específica de sus subunidades p20 y p10, por sí mismas (autoprocesamiento de las caspasas iniciadoras) o por otras caspasas (caspasas efectoras) para polimerizarse y alcanzar su máxima actividad enzimática (3).

En la apoptosis, las caspasas son activadas tanto en la vía intrínseca como en la vía extrínseca de inducción de muerte celular.

En la vía intrínseca, en la cual la apoptosis puede ser inducida, entre otros factores, por estrés ambiental o por la ausencia de factores de crecimiento, se produce la liberación del citocromo C de la mitocondria, el cual, al interactuar con el factor 1 activador de proteasa apoptótica o APAF1, estimula la formación del apoptosoma y la posterior activación de la caspasa iniciadora, caspasa 9.

En la vía extrínseca, en la cual la apoptosis se inicia a partir de la interacción de un ligando extracelular con su respectivo receptor de superficie celular perteneciente a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (FNT), se produce el reclutamiento de factores citosólicos para la formación del complejo de señalización inductor de muerte, o DISC (*death-inducing signaling complex*), y posterior activación de la caspasa iniciadora, caspasa 8 (4). Las caspasas 9 y 8 activadas inician la cascada de activación de las caspasas efectoras 3, 6 y 7, las cuales cortan sus sustratos y producen las características clásicas de la apoptosis.

Correspondencia:

Iveth J. González, 3 avenue de l'avant-poste, 1005 Lausanne, Suisse.

Teléfono: (+4121) 311 9687

ivethgon@hotmail.com

Recibido: 08/07/08; aceptado:02/04/09

Las caspasas y sus proteínas homólogas han sido descritas en especies tan diversas como el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (5) y el díptero *Drosophila melanogaster* (6) y son esenciales para casi todas las formas de apoptosis de los metazoos. Sin embargo, no se han encontrado genes que codifiquen caspasas en plantas, levaduras, protozoos y procariotes, organismos en los cuales se han descrito algunas de las características morfológicas típicas de la apoptosis de mamíferos, tales como la condensación de la cromatina, la compactación del citoplasma y el núcleo celular, la ruptura internucleosómica del ADN y la formación de cuerpos apoptóticos (7). En estos organismos, en cambio, se encuentran las metacaspasas, proteínas que fueron identificadas a partir de un análisis de secuencia de genes en busca de moléculas similares a las caspasas (1,8).

Estructuralmente, las metacaspasas son similares a las caspasas en la presencia de la subunidad p20 y de la díada catalítica histidina/cisteína (H/C) conservadas en todas las caspasas (figura 1) (1). La composición de aminoácidos de las metacaspasas ha permitido clasificarlas en dos grupos principales: las metacaspasas tipo I, las cuales tienen pro-dominios con motivos repetitivos ricos en prolina y dedos de cinc, y las metacaspasas tipo II, que carecen de pro-dominios pero presentan una inserción de alrededor de 200 aminoácidos en el extremo C-terminal de la subunidad p20 (9).

En forma similar a las caspasas, algunas metacaspasas de plantas, levaduras y parásitos del género *Leishmania*, requieren de su autoprocesamiento para ser activas enzimáticamente (10-12). Sin embargo, a diferencia de las caspasas que cortan sus sustratos después de un residuo aspartato, las metacaspasas lo hacen después de los residuos arginina o lisina (10,12,13). Al parecer, esta especificidad de las metacaspasas está determinada por la presencia de varios residuos aspartato en el sitio catalítico, los cuales favorecen el reconocimiento selectivo de aminoácidos básicos en el sustrato (9). El descubrimiento de las metacaspasas en organismos en los cuales no hay genes de caspasas, y sus similitudes con estas últimas,

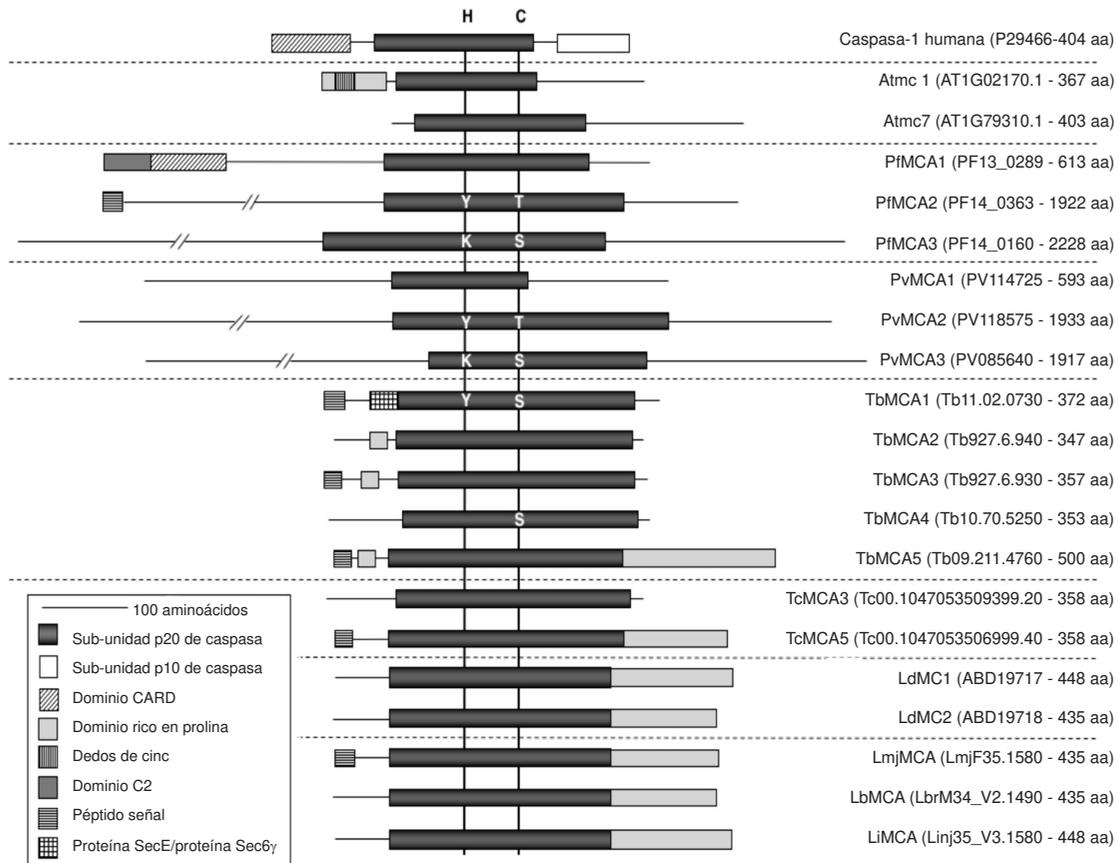


Figura 1. Diagrama esquemático de la estructura de las metacaspasas de parásitos protozoarios humanos. Los dominios constitutivos de las metacaspasas de *Plasmodium falciparum* (PfMCA1-PfMCA3), *Plasmodium vivax* (PvMCA1-PvMCA3), *Trypanosoma brucei* (TbMCA1-TbMCA5), *Trypanosoma cruzi* (TcMCA3 y TcMCA5), *Leishmania donovani* (LdMC1 y LdMC2), *Leishmania major* (LmjMCA), *Leishmania braziliensis* (LbMCA) y *Leishmania infantum* (LiMCA), se muestran en comparación con la caspasa-1 humana y dos metacaspasas, una tipo I (Atmc1) y una tipo II (Atmc7), de la planta *Arabidopsis thaliana*. Entre paréntesis se encuentra la identificación y la longitud en aminoácidos (aa) de cada proteína. Las líneas verticales denotan la posición de la díada catalítica de histidina (H) y cisteína (C). Las sustituciones de estos dos aminoácidos por tirosina (Y), treonina (T), lisina (K) y serina (S) están indicadas en las metacaspasas correspondientes. La presencia de algunos dominios proteicos en la estructura de estas metacaspasas, se ha propuesto a partir de sus secuencias de aminoácidos. **Dominio CARD:** dominio de reclutamiento de caspasas. **Dominio C2:** módulo de dirección a membranas dependiente de calcio. **Péptido señal:** secuencia de aminoácidos que define la localización intracelular de proteínas. **Proteína SecE/proteína Sec6 γ :** complejo proteico involucrado en el transporte intracelular de proteínas.

Esta figura está basada en secuencias de aminoácidos de dominio público disponibles en UniProtKB/Swiss-Prot (<http://www.expasy.org/sprot/>), The Arabidopsis Information Resource (<http://www.arabidopsis.org/>) y GeneDB (www.genedb.org).

han motivado su estudio con el fin de dilucidar su posible vinculación con procesos apoptóticos en organismos menos evolucionados.

Evaluación de la función biológica de las metacaspasas

Algunos análisis en diferentes organismos han sugerido que las metacaspasas podrían tener

una función similar a la de las caspasas en la muerte celular programada. Por un lado, en la ameba de vida libre *Acanthamoeba castellanii*, se recuperó una metacaspasa de tipo I de una biblioteca de expresión de proteínas de membrana celular implicadas en enquistamiento, un proceso que ha sido considerado como homólogo de la apoptosis (14).

Por otro lado, en el fitoplancton *Emiliana huxleyi*, la infección lítica viral aumentó la expresión de la metacaspasa EhMC de manera concomitante con la inducción de la lisis celular, también considerada una forma de muerte celular programada (15). De manera similar, la inducción de especies reactivas de oxígeno en el dinoflagelado marino *Pyrocystis lúnula*, estimuló la expresión del gen de metacaspasa de manera simultánea con un detrimento de la supervivencia celular (16).

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la proteína codificada por el único gen de metacaspasa presente en su genoma, la YCA1, ha sido implicada en la muerte programada de células envejecidas (11,17) y de células defectuosas en algunas funciones biológicas, como la “deubicuitinación” (18), el recambio de ARNm (19), la replicación de ADN (20) y la regulación de la expresión de genes (21). La YCA1 también se ha asociado con la muerte celular programada de células de levadura expuestas a diferentes tipos de estrés ambiental, como concentraciones tóxicas de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ácido acético y cloruro de sodio (11,22,23), choque térmico (24), hiperosmosis (25) y toxinas virales (26).

En algunas plantas, las metacaspasas han estado involucradas en muerte celular programada en procesos como la embriogénesis del abeto rojo *Picea abies* (27) y en la infección por hongos de la planta del tomate (28). Además, se utilizaron células de levadura, en las cuales se había eliminado el gen de la metacaspasa endógena, para demostrar que las metacaspasas Atmc1 (o AtMCP1b) y Atmc4 (o AtMCP2b) de la planta *Arabidopsis thaliana* cumplían el mismo rol de la YCA1 en la muerte celular programada de levaduras después de la exposición a H₂O₂ (29).

En contraste con estos resultados, algunos estudios han demostrado un posible rol de las metacaspasas en la supervivencia de hongos filamentosos. Por ejemplo, células de *Aspergillus fumigatus*, en las cuales se suprimieron los dos genes de metacaspasas ($\Delta casA/\Delta casB$), no crecieron en presencia de compuestos que alteraban la homeostasis del retículo endoplasmático, lo cual sugiere que estas

metacaspasas podrían ser importantes en el crecimiento celular en condiciones de estrés del retículo endoplasmático (30).

Metacaspasas de parásitos protozoarios

Los parásitos protozoarios humanos de los géneros *Plasmodium*, *Leishmania* y *Trypanosoma* poseen también genes que codifican metacaspasas (1). Estos pueden estar presentes de manera redundante en sus genomas, como sucede en *Plasmodium* spp. (tres genes por genoma), en *Trypanosoma* spp. (cinco genes en *T. brucei* y dos genes en *T. cruzi*, uno de ellos en múltiples copias) y en *Leishmania donovani* (dos genes), o como genes únicos, como sucede en otras especies de *Leishmania* (*L. major*, *L. braziliensis* y *L. infantum*) (figura 1).

En *Plasmodium* spp. sólo se han evaluado hasta el momento las metacaspasas 1 de *P. falciparum* (PfMCA1) y de *P. berghei*, parásito de malaria de roedores, (PbMC1) (31,32). De la metacaspasa PfMCA1 se sabe que, como las caspasas, se autoprocasa y posee un dominio de reclutamiento de caspasa, o CARD (*caspase recruitment domains*), en su porción amino-terminal (31). Por otro lado, parásitos de *P. berghei* en los cuales la secuencia codificadora de PbMC1 fue reemplazada por la proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP), permitieron demostrar que la metacaspasa PbMC1 se expresa en gametocitos femeninos y en estadios pre-eritrocíticos, pero no en estadios sanguíneos del parásito, y que la supresión del gen que codifica esta metacaspasa no produce ningún fenotipo especial en los parásitos siendo éstos todavía infectivos (32). A pesar de que no hay información adicional sobre la actividad enzimática y la función biológica de las metacaspasas de *Plasmodium* spp., se podría especular que la presencia de más de un gen de metacaspasa en estos parásitos garantizaría una redundancia funcional de estas proteínas con la capacidad de que unas puedan reemplazar a otras durante el ciclo de vida de los mismos.

En los parásitos responsables de las leishmaniasis, sólo se han estudiado las metacaspasas de *L. major* y *L. donovani*. La única metacaspasa de *L. major*, LmjMCA, fue expresada en células

de levadura en las cuales el gen endógeno de metacaspasa había sido suprimido ($\Delta YCA1$) (12). Tal como se mencionó anteriormente, la presencia del gen *YCA1* es necesaria para que suceda la muerte celular programada en las levaduras expuestas a estrés oxidativo (11). Los experimentos con LmjMCA en levadura permitieron demostrar, no sólo que esta metacaspasa cumple el mismo rol que *YCA1*, sino también, que la LmjMCA se autoprocasa de manera similar a las caspasas. La actividad enzimática de la LmjMCA expresada y purificada de levaduras fue evaluada con substratos sintéticos fluorescentes, con el fin de determinar su especificidad de aminoácido. Estos experimentos permitieron demostrar que esta metacaspasa no tiene actividad de caspasa (no es específica de aspartato), sino que, como las metacaspasas de la planta *A. Thaliana*, la LmjMCA es específica para arginina (12).

Algunos estudios desarrollados en *L. major* han permitido demostrar que la LmjMCA se expresa tanto en promastigotes como en amastigotes y que los intentos dirigidos a la generación de promastigotes con supresión del gen de LmjMCA han sido fallidos lo cual sugiere que este gen es esencial para la supervivencia del parásito (33). La LmjMCA fue localizada en diferentes compartimientos intracelulares del parásito dependiendo de la fase del ciclo celular en el cual se encontraba. Así, por ejemplo, esta proteína se encontró en vesículas citoplasmáticas no identificadas durante la interfase y asociada al cinetoplasto y al núcleo durante la mitosis (33). Además, el extremo N-terminal de LmjMCA posee un péptido señal cuya función de localización mitocondrial fue confirmada por medio de la expresión de este fragmento fusionado con GFP en parásitos. Por otro lado, el aumento de la expresión de LmjMCA en promastigotes de *L. major* produjo un importante retardo en el crecimiento de los parásitos con defectos en la citocinesis y la generación de parásitos con diferentes ploidías (33). Estos resultados sugieren que la LmjMCA podría tener más de una función en diferentes compartimientos celulares y estar asociada al ciclo celular de los parásitos de *L. major*, siendo

importante tanto en la vida como en la muerte de los mismos.

En *L. donovani* se identificaron dos genes de metacaspasa que codifican dos proteínas que comparten el 96% de la identidad de la secuencia de aminoácidos (LdMC1 y LdMC2) (13). Ambas se expresan de manera constitutiva; sin embargo, los niveles de expresión de LdMC1 fueron mayores en amastigotes axénicos que en promastigotes. En forma semejante a la LmjMCA, las metacaspasas de *L. donovani* no reconocen substratos sintéticos de caspasas, pero cortan substratos después de los residuos arginina o lisina, actividad que aumenta cuando los parásitos están expuestos a estrés oxidativo. Además, los parásitos en los cuales se indujo la expresión exagerada de estas metacaspasas, fueron significativamente más sensibles a la inducción de la muerte celular programada con H_2O_2 , en comparación con los parásitos de fenotipo salvaje, lo cual sugiere un posible rol de LdMC1 y LdMC2 en la muerte celular programada de *L. donovani*. A diferencia de LmjMCA, estas metacaspasas no se autoprocasaron, incluso después de la inducción de la muerte celular programada de los parásitos con H_2O_2 , y se localizaron en vesículas citoplasmáticas correspondientes a los acidocalcisomas del parásito, tanto en promastigotes como en amastigotes axénicos (13).

El genoma de *Trypanosoma cruzi*, el protozoario causante de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, posee dos genes de metacaspasa: *TcMCA3*, presente en 16 copias, y *TcMCA5*, presente como copia única (34). La proteína TcMCA3 se expresa en los cuatro principales estadios del desarrollo del parásito (epimastigotes, tripomastigotes metacíclicos, tripomastigotes celulares y amastigotes), mientras que la TcMCA5 se expresa sólo en epimastigotes (34). Ambas metacaspasas se localizaron en el citoplasma de epimastigotes en cultivo; sin embargo, su translocación hacia el núcleo se detectó luego de la inducción de la muerte celular programada de los parásitos con suero humano fresco, lo cual sugiere una función nuclear. Además, la expresión exagerada de la TcMCA5 en epimastigotes

produjo un aumento de la sensibilidad de estos parásitos a la inducción de la muerte celular programada con suero humano, al compararse con parásitos que expresaban la proteína en niveles fisiológicos (34). Estos resultados son una evidencia indirecta del posible rol de las metacaspasas de *T. cruzi* en la muerte celular programada. Sin embargo, hasta la fecha no se han publicado hallazgos adicionales con respecto a estas metacaspasas.

Se han descrito cinco genes de metacaspasa en *T. brucei*, el parásito responsable de la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño (35). Una de las primeras aproximaciones en el estudio de la función de las metacaspasas de *T. brucei* fue su expresión en células de levadura, en las cuales el gen endógeno de metacaspasa fue suprimido (36). De las cinco metacaspasas, sólo la metacaspasa 4 (TbMCA4) produjo manifestaciones fenotípicas detectables, como retardo del crecimiento, disfunción mitocondrial y muerte clónica de las levaduras. Al igual que la metacaspasa endógena YCA1, la TbMCA4 también fue localizada en el núcleo de las levaduras, con lo cual los autores de este estudio sugirieron que estas metacaspasas podrían controlar la traducción de genes en el núcleo, afectando la biogénesis de las mitocondrias (36).

Las metacaspasas TbMCA2, TbMCA3 y TbMCA5 también han sido estudiadas en el parásito (37). La expresión de la TbMCA5 se detectó *in vitro*, tanto en las formas procíclicas como en las formas sanguíneas, mientras que TbMCA2 y TbMCA3 se detectaron solamente en las formas sanguíneas de *T. brucei*. Las tres proteínas estuvieron asociadas de manera parcial a endosomas de reciclaje positivos para la proteína RAB11, los cuales están implicados en la degradación de la glicoproteína variante de superficie, o VSG (*variant surface glycoprotein*) (37). Con el fin de evaluar su función, la expresión de estas tres metacaspasas fue reducida por medio de la inducción de ARN de interferencia (ARNi) específico para cada gen y eliminada con la generación de parásitos en los cuales los tres genes habían sido suprimidos (37). La inducción de ARNi de manera simultánea para los tres genes produjo defectos en la citocinesis

y posterior muerte de los parásitos. Sin embargo, la inducción de ARNi y la supresión de los genes de estas tres metacaspasas de manera secuencial no fueron letales, lo cual sugiere la presencia de mecanismos de adaptación a la falta progresiva de dichas proteínas o la gradual sustitución funcional de las mismas por las otras dos metacaspasas de *T. brucei*, TbMCA1 y TbMCA4.

La reducción de la expresión de TbMCA2, TbMCA3 y TbMCA5 no afectó la función biológica de los endosomas de reciclaje positivos para RAB11 en los cuales se localizan, lo que indica que estas metacaspasas podrían tener una función asociada a ellos, pero diferente a los procesos de reciclaje conocidos hasta el momento. Con el fin de evaluar el rol de estas tres metacaspasas en la muerte celular programada, los parásitos en los cuales se suprimieron sus respectivos genes, se trataron con prostaglandina D2, conocido inductor de muerte celular programada en *T. brucei* (38). La ausencia simultánea de las tres metacaspasas no tuvo ningún efecto en la tasa de muerte de los parásitos, lo cual sugiere que éstas no participan en los mecanismos de muerte celular programada inducida por prostaglandina D2. Sin embargo, estos resultados no descartan su posible rol en la muerte celular programada inducida por otros mecanismos como el estrés oxidativo, ni el posible reemplazo de su función por parte de TbMCA1 y TbMCA4.

La sustitución natural de aminoácidos en la díada catalítica H/C de las metacaspasas TbMCA1 y TbMCA4 (figura 1) ha hecho que éstas se consideren como hipotéticamente inactivas. Sin embargo, la TbMCA4 produjo efectos cuando se expresó en levaduras, tal como se explicó anteriormente, y no hay estudios en los cuales se demuestre la inactividad de estas enzimas. Otras cisteínas presentes en la secuencia de aminoácidos de estas dos metacaspasas podrían reemplazar la función de la cisteína de la díada catalítica, tal como se ha demostrado en la metacaspasa AtMC9 de *A. thaliana* (39). En AtMC9, el residuo 29 de cisteína reemplaza la función de la cisteína 147 de la díada catalítica cuando esta última se encuentra nitrosilada. A

propósito de la actividad enzimática de las cinco metacaspasas de *T. brucei*, sólo se sabe que la TbMCA2 se autoprocasa y es específica de arginina y lisina como otras metacaspasas (40).

Las metacaspasas de parásitos protozoarios como posibles blancos de medicamentos

Una célula normal no es inmortal y su muerte puede ser inducida por factores externos o formar parte de un proceso fisiológico. Cuando una célula muere como resultado de un cambio ambiental violento, se produce la necrosis, una forma de muerte celular en la cual las células se destruyen, liberan su contenido y provocan una reacción inmunológica a su alrededor (41). Por otro lado, cuando una célula muere como parte de un proceso fisiológico, se produce la muerte celular programada, la cual es ejecutada por procesos activos en los cuales participan proteínas codificadas en el genoma de la célula. La muerte celular programada genera cuerpos apoptóticos que son fagocitados de manera silenciosa por células vecinas, lo cual evita la generación de una respuesta inflamatoria (42).

En los mamíferos, la muerte celular programada conocida como apoptosis, ha sido considerada como un mecanismo para contrarrestar la mitosis, para mantener la homeostasis del número de células durante la embriogénesis y el desarrollo, y para eliminar células con defectos moleculares como lesiones en el ADN (43). A pesar de que el rol de la muerte celular programada en los organismos unicelulares es todavía controvertido, se ha sugerido que ésta evolucionó inicialmente en organismos unicelulares como un mecanismo de defensa para mantener la posibilidad de clonación en una población con la selección positiva de microorganismos mejor adaptados al medio, para adaptar el número de microorganismos a los nutrientes disponibles y como un mecanismo de regulación del ciclo y diferenciación celulares (8).

En los parásitos protozoarios humanos, como aquéllos de los cuales se habla en esta revisión, la muerte celular programada se ha postulado como un mecanismo de control de la población de parásitos dentro del insecto vector y dentro de las células hospedadoras humanas, lo cual favorecería

la supervivencia de parásitos infectivos y mejor adaptados (44,45). Algunas características de la muerte celular programada también se han postulado como mediadoras de la evasión de la respuesta inmune, lo que permitiría la fagocitosis silenciosa de los parásitos por las células del sistema monocito-macrofágo humano y favorecería el establecimiento de una infección productiva (46,47). Dado que, al parecer, las metacaspasas hacen parte de los procesos responsables de la muerte celular programada de estos microorganismos, la clara identificación de su función biológica permitirá, no sólo dilucidar la manera en la que ocurre la muerte celular programada en estos organismos, sino, también, la generación de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a eliminar los parásitos por medio de la inducción de la muerte celular programada.

Mucho se ha aprendido respecto a las metacaspasas durante la última década. Sin embargo, su función biológica todavía no es clara en ninguno de los organismos en las cuales se expresan. Se hace evidente la necesidad de desarrollar estudios adicionales dirigidos a conocer los mecanismos de activación e inhibición de estas enzimas. En este sentido, la identificación de proteínas de interacción por medio de métodos como los ensayos de doble híbrido es promisorio. Esta estrategia experimental consistente en la tamización de las posibles interacciones de la proteína de interés con una serie de proteínas derivadas de una biblioteca de ADNc, al ser expresadas de manera simultánea en células de levadura, permitió, por ejemplo, identificar la serpina 1 (Atserpin1) como inhibidor específico de la metacaspasa AtMC9 de la planta *A. thaliana* (48). De igual manera, otras proteínas podrían identificarse como activadoras o como substratos de las metacaspasas, lo cual permitiría esclarecer las cascadas metabólicas y los procesos biológicos en los cuales ellas participan.

En los parásitos causantes de malaria, tripanosomiasis y leishmaniasis, la prioridad es la evaluación de las metacaspasas en sus estadios infecciosos, con el fin de validar estas proteínas como posibles blancos de medicamentos. Si se confirma que las metacaspasas son moléculas efectoras de la muerte celular programada de

estos microorganismos, deberán desarrollarse mecanismos de activación o de bloqueo de la inhibición endógena de metacaspasas para inducir su muerte celular programada. Si, por el contrario, las metacaspasas son vitales en el desarrollo de los parásitos, la generación de inhibidores específicos permitiría la eliminación de los mismos. La identificación de proteínas de interacción específicas de metacaspasas permitiría en el futuro la generación de substratos o inhibidores sintéticos de las mismas, que podrían ser utilizados como medicamentos.

Agradecimientos

La autora agradece a Mónica Rengifo por su colaboración en la redacción de esta revisión, a Pedro Romero, por su lectura crítica del texto y a Nicolas Fasel, por todo el apoyo brindado.

Conflictos de intereses

La autora declara no incurrir en ningún conflicto de interés mediante la publicación de esta revisión de tema.

Financiación

Universidad de Lausana, Suiza.

Referencias

1. Uren AG, O'Rourke K, Aravind LA, Pisabarro MT, Seshagiri S, Koonin EV, *et al.* Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell.* 2000;6:961-7.
2. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest.* 2005;115:2665-72.
3. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5:897-907.
4. MacFarlane M, Williams AC. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep.* 2004;5:674-8.
5. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene Ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell.* 1993;75:641-52.
6. Kumar S, Dumanis J. The fly caspases. *Cell Death Differ.* 2000;7:1039-44.
7. Debrabant A, Lee N, Bertholet S, Duncan R, Nakhasi HL. Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. *Int J Parasitol.* 2003;33:257-67.
8. Koonin EV, Aravind L. Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. *Cell Death Differ.* 2002;9:394-404.
9. Vercammen D, Declercq W, Vandenabeele P, van Breusegem F. Are metacaspases caspases? *J Cell Biol.* 2007;179:375-80.
10. Vercammen D, van de Cotte B, De Jaeger G, Eeckhout D, Casteels P, Vandepoele K, *et al.* Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. *J Biol Chem.* 2004;279:45329-36.
11. Madeo F, Herker E, Maldener C, Wissing S, Lachelt S, Herlan M, *et al.* A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell.* 2002;9:911-7.
12. González IJ, Desponds C, Schaff C, Mottram JC, Fasel N. *Leishmania major* metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity. *Int J Parasitol.* 2007;37:161-72.
13. Lee N, Gannavaram S, Selvapandiyan A, Debrabant A. Characterization of metacaspases with trypsin-like activity and their putative role in the programmed cell death in the protozoan parasite *Leishmania*. *Eukaryot Cell.* 2007;6:1745-57.
14. Trzyna WC, Legras XD, Cordingley JS. A type-1 metacaspase from *Acanthamoeba castellanii*. *Microbiol Res.* 2008;163:414-23.
15. Bidle KD, Haramaty L, Barcelos E Ramos J, Falkowski P. Viral activation and recruitment of metacaspases in the unicellular coccolithophore, *Emiliania huxleyi*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:6049-54.
16. Okamoto OK, Hastings JW. Genome-wide analysis of redox-regulated genes in a dinoflagellate. *Gene.* 2003;321:73-81.
17. Herker E, Jungwirth H, Lehmann KA, Maldener C, Frohlich KU, Wissing S, *et al.* Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol.* 2004;164:501-7.
18. Bettiga M, Calzari L, Orlandi I, Alberghina L, Vai M. Involvement of the yeast metacaspase Yca1 in ubp10Delta-programmed cell death. *FEMS Yeast Res.* 2004;5:141-7.
19. Mazzoni C, Herker E, Palermo V, Jungwirth H, Eisenberg T, Madeo F, *et al.* Yeast caspase 1 links messenger RNA stability to apoptosis in yeast. *EMBO Rep.* 2005;6:1076-81.
20. Weinberger M, Ramachandran L, Feng L, Sharma K, Sun X, Marchetti M, *et al.* Apoptosis in budding yeast caused by defects in initiation of DNA replication. *J Cell Sci.* 2005;118:3543-53.
21. Mitsui K, Nakagawa D, Nakamura M, Okamoto T, Tsurugi K. Valproic acid induces apoptosis dependent of Yca1p at concentrations that mildly affect the proliferation of yeast. *FEBS Lett.* 2005;579:723-7.

22. **Khan MA, Chock PB, Stadtman ER.** Knockout of caspase-like gene, YCA1, abrogates apoptosis and elevates oxidized proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:17326-31.
23. **Wadskog I, Maldener C, Proksch A, Madeo F, Adler L.** Yeast lacking the SRO7/SOP1-encoded tumor suppressor homologue show increased susceptibility to apoptosis-like cell death on exposure to NaCl stress. Mol Biol Cell. 2004;15:1436-44.
24. **Flower TR, Chesnokova LS, Froelich CA, Dixon C, Witt SN.** Heat shock prevents alpha-synuclein-induced apoptosis in a yeast model of Parkinson's disease. J Mol Biol. 2005;351:1081-100.
25. **Silva RD, Sotoca R, Johansson B, Ludovico P, Sansonetty F, Silva MT, et al.** Hyperosmotic stress induces metacaspase- and mitochondria-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol. 2005;58:824-34.
26. **Ivanovska I, Hardwick JM.** Viruses activate a genetically conserved cell death pathway in a unicellular organism. J Cell Biol. 2005;170:391-9.
27. **Suarez MF, Filonova LH, Smertenko A, Savenkov EI, Clapham DH, von Arnold S, et al.** Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. Curr Biol. 2004;14:R339-40.
28. **Hoeberichts FA, ten Have A, Woltering EJ.** A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves. Planta. 2003;217:517-22.
29. **Watanabe N, Lam E.** Two Arabidopsis metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in yeast. J Biol Chem. 2005;280:14691-9.
30. **Richie DL, Miley MD, Bhabhra R, Robson GD, Rhodes JC, Askew DS.** The *Aspergillus fumigatus* metacaspases CasA and CasB facilitate growth under conditions of endoplasmic reticulum stress. Mol Microbiol. 2007;63:591-604.
31. **Meslin B, Barnadas C, Boni V, Latour C, De Monbrison F, Kaiser K, et al.** Features of apoptosis in *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage through a putative role of PfMCA1 metacaspase-like protein. J Infect Dis. 2007;195:1852-9.
32. **Le Chat L, Sinden RE, Dessens JT.** The role of metacaspase 1 in *Plasmodium berghei* development and apoptosis. Mol Biochem Parasitol. 2007;153:41-7.
33. **Ambit A, Fasel N, Coombs GH, Mottram JC.** An essential role for the *Leishmania major* metacaspase in cell cycle progression. Cell Death Differ. 2008;15:113-22.
34. **Kosec G, Álvarez VE, Agüero F, Sánchez D, Dolinar M, Turk V, et al.** Metacaspases of *Trypanosoma cruzi*: possible candidates for programmed cell death mediators. Mol Biochem Parasitol. 2006;145:18-28.
35. **Mottram JC, Helms MJ, Coombs GH, Sajid M.** Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa. Trends Parasitol. 2003;19:182-7.
36. **Szallies A, Kubata BK, Duszenko M.** A metacaspase of *Trypanosoma brucei* causes loss of respiration competence and clonal death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 2002;517:144-50.
37. **Helms MJ, Ambit A, Appleton P, Tetley L, Coombs GH, Mottram JC.** Bloodstream form *Trypanosoma brucei* depend upon multiple metacaspases associated with RAB11-positive endosomes. J Cell Sci. 2006;119:1105-17.
38. **Figarella K, Rawer M, Uzcategui N L, Kubata BK, Lauber K, Madeo F, et al.** Prostaglandin D2 induces programmed cell death in *Trypanosoma brucei* bloodstream form. Cell Death Differ. 2005;12:335-46.
39. **Belenghi B, Romero-Puertas MC, Vercammen D, Brackenier A, Inze D, Delledonne M, et al.** Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. J Biol Chem. 2007;282:1352-8.
40. **Moss CX, Westrop GD, Juliano L, Coombs GH, Mottram JC.** Metacaspase 2 of *Trypanosoma brucei* is a calcium-dependent cysteine peptidase active without processing. FEBS Lett. 2007;581:5635-9.
41. **Jäättelä M.** Programmed cell death: many ways for cells to die decently. Ann Med. 2002;34:480-8.
42. **Bursch W.** Multiple cell death programs: Charon's lifts to Hades. FEMS Yeast Res. 2004;5:101-10.
43. **Vaux DL, Strasser A.** The molecular biology of apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93:2239-44.
44. **Lee N, Bertholet S, Debrabant A, Muller J, Duncan R, Nakhasi HL.** Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. Cell Death Differ. 2002;9:53-64.
45. **Lindoso JA, Cotrim PC, Goto H.** Apoptosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigotes in hamsters infected with visceral leishmaniasis. Int J Parasitol. 2004;34:1-4.
46. **Wanderley JL, Benjamin A, Real F, Bonomo A, Moreira ME, Barcinski MA.** Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/Leishmania interplay. Braz J Med Biol Res. 2005;38:807-12.
47. **van Zandbergen G, Bollinger A, Wenzel A, Kamhawi S, Voll R, Klinger M, et al.** *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103:13837-42.
48. **Vercammen D, Belenghi B, van de Cotte B, Beunens T, Gavigan JA, De Rycke R, et al.** Serpin1 of *Arabidopsis thaliana* is a suicide inhibitor for metacaspase 9. J Mol Biol. 2006;364:625-36.

Instrucciones para los autores

Biomédica es la revista del Instituto Nacional de Salud de Colombia cuyo fin primordial es la difusión de trabajos originales que contribuyan a ampliar los conocimientos en biomedicina.

Información general

Biomédica publicará 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 es de gran importancia.

Nota técnica: describe en detalle una técnica de laboratorio novedosa o modificaciones realizadas a 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.

Revisión de tema: presenta el estado actual del conocimiento sobre un tema; incluye dos categorías:

- solicitado directamente por el Comité Editorial a personas expertas en el tema;
- presentado por profesionales interesados en un tema particular; en este caso, se debe enviar una propuesta en la que se indique por qué el tema escogido es pertinente para los lectores de *Biomédica*, el cual debe incluir una breve descripción del contenido en la que se deben mencionar las referencias clave, las

publicaciones de los autores sobre el tema, la probable extensión del documento y el número aproximado de ilustraciones.

- La revisión debe incluir un resumen con énfasis en el significado de los hallazgos recientes, una introducción al tema señalando hitos pasados y desarrollos presentes, y los encabezamientos del texto con el objeto de hacer más provechosa su lectura. La revisión debe incluir un análisis crítico de la literatura y 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.

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 página aparte y debe acompañarse de un comentario actualizado sobre la entidad que se pretende ilustrar.

Presentación de casos: son ejemplos de casos clínicos de enfermedades que destacan alguna particularidad llamativa o señalan un hallazgo especial de las mismas, con una revisión breve de la literatura pertinente.

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 biomedicina.

Información general sobre los manuscritos

Todo material propuesto para publicación en *Biomédica* será revisado por el Comité Editorial y enviado para evaluación externa a dos evaluadores o pares científicos; para facilitar este paso, los autores deben enviar junto con el manuscrito, el nombre, afiliación y correo electrónico de cuatro posibles evaluadores. Los editores informarán al autor principal que su trabajo ha sido recibido; posteriormente, le harán llegar los comentarios de los evaluadores y le harán conocer la decisión final sobre la publicación de su manuscrito.

La revista *Biomédica* se reserva el derecho de aceptar o rechazar los artículos y hará sugerencias que tiendan a mejorar su presentación.

Una vez que el autor reciba los comentarios de los evaluadores, deberá proceder a contestarlos punto por punto y a incorporar las modificaciones correspondientes en el texto. 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 de los derechos de autor a la revista, la cual debe ser firmada por todos los autores.

Los originales de los artículos aceptados para publicación permanecerán en los archivos de la revista hasta por un año.

Preparación del manuscrito

Por favor, cíñase a las indicaciones del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (International Committee of Medical Journal Editors –ICMJE) que se encuentran publicadas como “Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals” en <http://www.icmje.org>. La versión en español se puede consultar en la Revista Panamericana de Salud Pública (Rev Panam Salud Pública 2004;15:41-57) en http://journal.paho.org/index.php?a_ID=531.

Después de realizadas la edición y la corrección de estilo, los autores recibirán las galeras del

artículo, las cuales deben ser cuidadosamente revisadas y devueltas al Editor en un término máximo de 48 horas.

Una vez realizada la publicación, el autor principal recibirá, libre de costo, cinco ejemplares de la revista.

El manuscrito debe incluir las siguientes secciones:

Hoja de presentación: debe incluir título, título corto para los encabezamientos de las páginas, título en inglés, nombres completos de los autores únicamente con el primer apellido, afiliación institucional y el nombre de la institución donde se llevó a cabo el trabajo. Además, se debe anotar el nombre del autor responsable de la correspondencia con su dirección completa, número telefónico y de fax y dirección electrónica.

Resúmenes y palabras clave: el trabajo debe presentar un resumen estructurado (introducción, objetivo, materiales y métodos, resultados y conclusión) en español y otro en inglés, cada uno no debe tener más de 250 palabras. No se permite el uso de referencias ni se recomienda la inclusión de siglas o acrónimos.

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>; 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, los cuadros y las leyendas de figuras y cuadros, debe estar escrito a doble espacio, por un solo lado de la hoja, sin dejar espacios extras entre párrafo y párrafo; deje un solo espacio después del punto y seguido o aparte. Use la fuente Arial de tamaño 12 y no justifique el texto. Use letra bastarda o cursiva para los términos científicos, por favor, no los subraye.

Formato electrónico: envíe el manuscrito en Word Perfect o MS Word como procesador de palabra.

Las gráficas elaboradas en *PowerPoint*, *MS Word* o *Word Perfect* son de baja resolución; sirven para el proceso de impresión únicamente si son imágenes de líneas, no tienen sombras, ni grises ni colores y se ha enviado una copia impresa en láser de alta calidad; por lo tanto, no incluya en formato electrónico este tipo de imágenes. 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 las remite en formato electrónico, se deben enviar en archivos CMYK en formato .eps (*encapsulated postscript*); la resolución óptima para los archivos CMYK es de 300 dpi si la imagen no tiene texto incluido; 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, conviértalos a uno de los formatos mencionados. No olvide incluir una lista de los archivos enviados y anotar el programa en que fueron hechos.

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 interés o si no los hay. Además, debe presentarse otro párrafo que incluya la fuente de financiación de la investigación adelantada.

Referencias bibliográficas: por favor, observe estrictamente las indicaciones de los requisitos uniformes para manuscritos del área biomédica. Asígnele un número a cada referencia citada del texto, así como a los cuadros y a las figuras en orden ascendente. Anote los números de las referencias entre paréntesis y no como índice (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 en el cuerpo del artículo entre paréntesis.

Consulte la lista de publicaciones periódicas del *Index Medicus* (<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>) para la abreviatura exacta de la revista citada; si la revista no aparece, escriba

el título completo de la revista. Transcriba únicamente los seis primeros autores del artículo, seguidos de *et al.* Se recomienda la inclusión de referencias nacionales y latinoamericanas para lo cual puede consultar Lilacs, Latindex, Sibra, el índice de Colciencias y otras fuentes bibliográficas pertinentes.

Cuadros y figuras: elabore los cuadros usando el programa del procesador de palabra que aparece como, utilidad de cuadros; absténgase de preparar archivos en columnas o tabulados en el texto mismo del manuscrito. Para las figuras (diagramas, dibujos o ilustraciones) en blanco y negro, envíe el original y dos copias de la ilustración correspondiente. Si son fotografías en blanco y negro, se deben enviar tres copias de excelente calidad; si son transparencias, envíe la diapositiva original y no una copia, junto con dos impresiones en papel (fotocopia o por escáner) de la misma imagen para facilitar el envío de este material a los evaluadores del manuscrito.

En las preparaciones de microscopio, recuerde que debe mencionar la coloración y el aumento según el objetivo utilizado, pero no incluya el valor del ocular.

Cuando se incluyan cuadros o figuras que ya han sido publicados, se requiere enviar la autorización del editor que tiene los derechos de autor para su reproducción en *Biomédica*.

Remisión del manuscrito

El manuscrito debe ser remitido con una carta firmada por todos los autores en la que conste que todos conocen y están de acuerdo con su contenido. Se debe mencionar, igualmente, que el manuscrito no ha sido publicado anteriormente ni se ha sometido a publicación en otra revista. El documento original y las dos copias exigidas deben ser remitidos a los editores a la siguiente dirección:

Revista Biomédica
Instituto Nacional de Salud
Avenida Calle 26 No.51-20, oficina B-245
Bogotá, D.C., Zona 6, Colombia, S.A.
o Apartado aéreo 80334 u 80080
Bogotá, D.C., Zona 6, Colombia, S.A.

BIOMÉDICA

Lista de verificación

Con el fin de comprobar que se han cumplido todas las instrucciones correspondientes a las normas de publicación de la revista *Biomédica*, le solicitamos nos devuelva debidamente diligenciada esta lista de verificación junto con su manuscrito.

Categoría

Artículo original _____	Comunicación breve _____	Nota técnica _____
Revisión de tema _____	Reseña histórica _____	Ensayo _____
Comentario _____	Imágenes en biomedicina _____	
Presentación de caso _____	Haga usted el diagnóstico _____	
Carta al editor _____	Reseña bibliográfica _____	

1- Presentación:

- _____ Texto escrito a doble espacio en fuente Arial de 12 puntos de tamaño, en una sola cara de la hoja, tamaño carta
- _____ Páginas numeradas consecutivamente en la esquina inferior derecha
- _____ Se remiten 3 copias impresas del artículo y una en medio magnético y se especifican los programas utilizados y las versiones, además de los nombres de archivo.

2- Título:

- _____ Se incluyen los títulos en español e inglés (máximo 165 caracteres).
- _____ Se incluye el título abreviado en español (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 correo electrónico.

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 es sólo para artículos originales y comunicaciones breves.

4- Palabras clave:

- _____ De 6 a 10 por artículo en cada idioma
- _____ Se incluyen las palabras clave en español e inglés (*key words*), indexadas en los Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS), <http://decs.bvs.br/E/homepagee.html>.

5- Estructura del artículo original:

- _____ Se incluyen los siguientes apartados:
- _____ Página de presentación: título en español, título en inglés, título abreviado en español, presentación de los autores y datos completos del autor de correspondencia.
- _____ Resúmenes: en español e inglés
- _____ Materiales y métodos

- ___ Resultados
- ___ Discusión
- ___ Agradecimientos
- ___ Declaración de conflicto de intereses
- ___ Fuente de financiación
- ___ Referencias
- ___ Cuadros y figuras con sus respectivas leyendas

6- Figuras:

- ___ Se incluye cada una en página aparte.

7- Cuadros:

- ___ Se adjuntan en hoja aparte, elaborados en el modelo más sencillo de tablas del programa Word y las copias en impresora láser.
- ___ Se ordenan secuencialmente.
- ___ Se incluye el título correspondiente.

8- Fotografías:

- ___ Se adjuntan tres copias.
- ___ Se señala la identificación de la misma y la orientación al respaldo.
- ___ Se acompañan del correspondiente pie de foto en hoja aparte.

9- Referencias:

- ___ Las citas se numeran según orden de aparición en el texto.
- ___ Se ordenan secuencialmente y en el formato adecuado, tal y como lo indican las normas de *Biomédica* en las instrucciones a los autores (<http://www.icmje.org/index.html>).
- ___ Cuando se citan referencias en los cuadros, éstas deben seguir el orden con el que se venía en el texto.

10- Abreviaturas y siglas:

- ___ Se anota entre paréntesis después de la primera vez cuando debe aparecer en forma completa y en el idioma original. Evite el uso y creación de siglas que no sean universalmente reconocidas.

11- Nomenclatura:

- ___ Los nombres 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, y, luego, se usa solamente la inicial del género y permanece el nombre completo de la especie.

12- Consideraciones generales:

- ___ Carta firmada por todos los autores
- ___ Incluye autorización del Comité de Ética para la experimentación en humanos.
- ___ Incluye autorización del Comité de Ética para la experimentación en animales.
- ___ Los autores deben certificarle al Comité Editorial que las personas mencionadas en los agradecimientos tienen conocimiento y están de acuerdo con aparecer en ellos.
- ___ Todos los manuscritos deben incluir declaración de conflicto de intereses y fuente de financiación.
- ___ Los decimales en español deben separarse de los enteros por comas, no por puntos.
- ___ Se envían los nombres de 4 evaluadores con sus respectivos datos.

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 purpose is to publish the results of original research that contributes meaningfully to knowledge in health and biomedical sciences.

General information

Biomédica will publish scientific papers written in Spanish or English, in the following categories:

Original articles: unpublished manuscripts resulting from biomedical research which presents new information about specific aspects and provides 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; includes two categories:

- (1) requested by the Editorial Board
- (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 *Biomedica*. It must

include a brief description, some key references, its probable size and the approximate number of illustrations.

In both categories, the review must include an abstract with emphasis on the significance of recent findings, a pointed introduction to the topic showing past landmarks and present developments, and appropriate subtitles with the purpose of facilitating reading of the paper. The review must include a critical review of published literature, as well as unpublished data by the authors. The development of the topic is left to the discretion of the authors, but the authors are advised to include tables, graphics and figures to provide a clearer understanding of the text.

Images in biomedicine: an illustrated paper (including photographs) which demonstrates via images 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 appears in a separate page and must be accompanied by an updated comment on the disease entity it highlights.

Case presentation: examples of diseases from clinical cases that have peculiar features of presentation or point to special features of diagnostic value along with a brief review of the pertinent literature.

Letters to the editor: readers can request explanations or present comments about the papers published in the journal. The decision concerning the publication of these letters is made at the discretion of the Editorial Board.

Book review: brief critical writings of books about health and biomedicine.

Manuscript general information

All manuscripts submitted for publication in *Biomédica* will be reviewed by the Editorial Board and sent for peer review to at least two experts. To facilitate this process, the authors must send the names and e-mail addresses of four suggested reviewers. The editors will inform the principal author that the paper has been received. Later, the Editorial Board will send him the reviewers' comments and inform him of the final decision concerning publication. Authors must include statements in the paper declaring potential conflicts of interest and indicating the financial sources for the research work.

Biomédica reserves the right to accept or reject the papers, and will make recommendations for improving their presentation.

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 the four weeks following the date sent; if *Biomédica* has not received the authors' reply by this date, 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 copyright transfer to be signed by all authors.

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 principal author will receive 5 free copies of the corresponding journal issue.

Preparation of the manuscript

Please follow the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors that are published as "Uniform requirements for

manuscripts submitted to biomedical journals" in <http://www.icmje.org/index.html>. A Spanish version is available in the website of the Revista Panamericana de Salud Pública (Rev Panam Salud Pública 2004;15: 41-57), http://journal.paho.org/index.php?a_ID=531

The manuscript must include the following sections:

Presentation page: In addition to the manuscript title and the running title for the page headlines, this section must include the complete names of authors, the institutional affiliation of each author, and the name of the institution in which the research was undertaken. It must also include the name of the corresponding author, along with postal address, telephone and fax numbers and e-mail address.

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. Use complete sentences. 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 in <http://www.nlm.nih.gov/mesh7meshhome.htm>, and the Spanish keywords in Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS) of the Latin American and Caribbean Health Sciences index, in <http://decs.bvs.br>

Text: All manuscripts including the presentation page, abstracts, references, tables and the headlines of figures and tables, must be written in double space by just one side of the page, without extra spaces between paragraphs. Leave only a single space after the end of each paragraph. Use Arial font size 12 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. Graphics made with the Power Point™or MS Word programs are not acceptable because of low resolution. They may be usable only if the images are composed of lines, without shadows, grays, or color. A printed copy from a high quality laser printer is an acceptable substitute. Do not include electronic images that do not fulfill these conditions. 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. If illustrations are in color and are mailed in electronic format, they must be sent in CMYK files in .eps (Encapsulated Postscript) 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 included in the submission along with the names of the programs in which they were formatted.

Conflicts of interests and financial support statements: Authors must place these statements before the bibliographic references as one paragraph that includes the conflict of interest declaration and a second paragraph with the financial support statement.

Bibliographic references: Strict adherence is required to the guidelines of the "Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals" available at www.icmje.org. A number is assigned to each reference in the order as it occurs in the manuscript, 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 the journals referenced. If the journal is not listed, write the complete title of the journal. 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.

Tables and figures: The tables must be formatted using the word processing tool for this purpose. Do not include columns or tabulations within the text of the manuscript. Include a separate page with the names of electronic files. For black and white figures (diagrams, drawings or illustrations), send an original and two copies. For black and white photographs, three copies of excellent quality must be sent. If they are transparencies, send the original plus two paper prints (photocopy or scanner), of the same image to facilitate mailing of the material. In microscopy preparations, indicate the stain used and the magnification according to the objective used; do not include the ocular magnification value.

Sending the manuscript

The manuscript has to be sent together with a letter signed by all authors in which each certifies knowledge of the manuscript content and agrees to its submission for publication to *Biomédica*. The cover letter must also indicate explicitly that the manuscript has neither been published previously, nor submitted for publication to any other journal. The original document and the two copies requested must be sent to the editors to the following address:

Revista Biomédica

Instituto Nacional de Salud
Avenida Calle 26 No. 51-20
Bogotá D.C., Zona 6, Colombia

Checklist for submitted manuscripts

For the purpose of verifying that authors have complied with the publication guidelines of Biomédica, to the corresponding author is requested to include this checklist along with your paper.

Category

Original article _____ Short communication _____ Technical note _____
Topic review _____ Historical paper _____ Essay _____
Commentary _____ Images in biomedicine _____
Case presentation _____ Make your own diagnosis _____
Letter to the editor _____ Book review _____

1. Presentation

- ___ Text written in double space, in Arial font size 12 point, on one side of the page, 8½ x 11 inch letter size.
- ___ Pages numbered consecutively
- ___ Mail three printed copies of the manuscript and an electronic file on 3.5" disk; please specify the programs and versions used; include page of the file names.

2. Title

- ___ Title in Spanish and English (maximum 165 characters)
- ___ Running title in the same language used in the text of your paper (Spanish or English (maximum 50 characters)
- ___ Include the authors' names with institutional affiliations; do not include current positions or academic titles.
- ___ The corresponding author must have provided correspondence information: name, postal address, phone number, fax number, e-mail address

3. Abstracts

- ___ Include a structured abstract both in Spanish and English, with a maximum length of 250 words and the following subtitles: Introduction, Objective, Materials and methods, Results, Conclusions. The inclusion of a structured abstract applies only for original articles and short communications.

4. Keywords (6 to 10 per manuscript in each language)

- ___ Include only keywords in Spanish and English which have been verified previously in the Medical Subject Headings (MeSH) of the Index Medicus in <http://www.nlm.nih.gov/mesh7meshhome.htm>, and, for the Spanish keywords, in Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS) of the Latin American and Caribbean Health Sciences index, in <http://decs.bvs.br>

5. Structure of an original article

- ___ Include the following parts:
 - ___ Introduction
 - ___ Materials and methods
 - ___ Results
 - ___ Discussion
 - ___ Acknowledgements
 - ___ Declaration of conflict of interests
 - ___ Financial support
 - ___ References

6. Figures

___ Include each one in a separate page.

7. Tables

___ Each table must be included in a separate page.

___ Tables must be made in the simplest table format of MS Word and printed by laser printer.

___ Number the tables consecutively in their order of appearance in the text.

___ Include the corresponding title for each table.

8. Photographs

___ Include three printed copies

___ On the back of each printed photograph, write its identification (figure number) and orientation.

___ The corresponding legend must be included in a separate page.

9. References

___ The references must be numbered consecutively according to the order of citation in the text.

___ Biomedica's guidelines for citing references must be followed strictly.

10. Use of abbreviations

___ The first time an abbreviated term appears in the text, the complete term must be written in its original language with the corresponding abbreviation in parenthesis.

11. Nomenclature

___ The names of genus and species are written in italics.

___ The scientific names of microorganisms names are written complete the first time they appear in the text, as well as in the title and in the abstracts; afterwards just use the first letter of the genus followed by a dot and the complete name of the species. Note that a genus name must be written in full if it forms the first word in a sentence.

12. General considerations:

___ Include a letter signed by all the authors.

___ If a paper presents results of research on human subjects or animals, an explicit statement that ethical clearance for conduct of the study was requested and obtained from an institutional Review Board. This statement must be included at the end of the Materials and methods section.

___ Authors must certify to the Editorial Board of Biomédica that the persons whose names have been identified in the Acknowledgements section are fully aware of this and agree to their inclusion.

___ All papers must include a Declaration of Conflicts of Interest and a statement of the financial sources.

___ In the Spanish version, decimal figures are separated with a comma (not with a dot) from the whole numbers.

___ Authors must include the names of four potential reviewers in the cover letter.