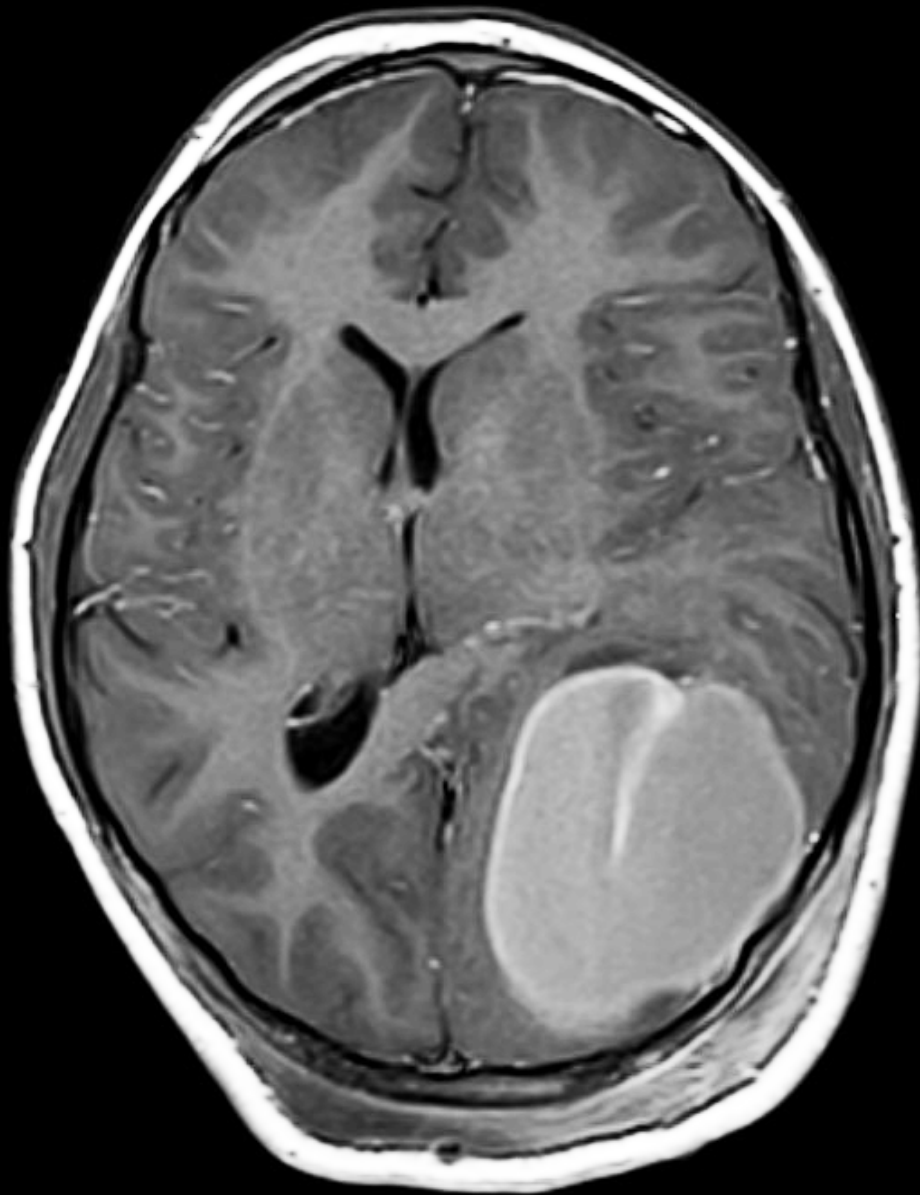


I-ISSN 2590-7379 (Electrónico)

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

Volumen 39, No. 3 - Septiembre de 2019, Bogotá, D.C., Colombia, S.A.



Portada: Metástasis cerebral de angiosarcoma cardíaco, resonancia magnética del cerebro después de la craneotomía, cortes axiales. Secuencia T₁ con gadolinio en la que se observan las lesiones con captación de la pared quística.

Resonador Philips 3, Tesla Ingenia™

Blair Ortiz, Grupo de Neurología Infantil, Universidad de Antioquia, Hospital San Vicente Fundación, Medellín, Colombia

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 39, No. 3 - Bogotá, D.C., Colombia - Septiembre de 2019

Comité Editorial

EDITORES	LUIS ALBERTO GÓMEZ Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia	CARLOS ARTURO HERNÁNDEZ Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia	RUBÉN SANTIAGO NICHOLLS Organización Panamericana de la Salud Washington, D.C., Estados Unidos
EDITORES ASOCIADOS	ENRIQUE ÁRDILA Bogotá, D.C., Colombia JOSÉ MORENO-MONTOYA Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud-FUCS Bogotá, D.C., Colombia JULIÁN ALFREDO FERNÁNDEZ-NIÑO Universidad del Norte Barranquilla, Colombia MIGUEL A. GUZMÁN † Investigador Emérito Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia	LEONARD MUNSTERMANN Yale University School of Medicine New Haven, CT, Estados Unidos OMAR SEGURA Federación Médica Colombiana Bogotá, D.C., Colombia ORLANDO TORRES-FERNÁNDEZ Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia RAÚL PARDO Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia	

Comité Científico

ARNOLDO BARBOSA Universidad del Tolima Ibagué, Colombia	ANDRÉS DE FRANCISCO Organización Mundial de la Salud Ginebra, Suiza	JOHN MARIO GONZÁLEZ Universidad de los Andes Bogotá, D.C., Colombia
ANTONIO BERMÚDEZ Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia	FERNANDO DE LA HOZ Universidad Nacional de Colombia Bogotá, D.C., Colombia	FELIPE GUHL Universidad de los Andes Bogotá, D.C., Colombia
JORGE H. BOTERO Universidad de Antioquia Medellín, Colombia	JOSÉ LUIS DI FABIO Organización Panamericana de la Salud Washington, D.C., Estados Unidos	ANTONIO IGLESIAS Universidad Nacional de Colombia Bogotá, D.C., Colombia
GUSTAVO ALONSO CABRERA Universidad de Antioquia Medellín, Colombia	JORGE HERNANDO DONADO Universidad Pontificia Bolivariana Medellín, Colombia	JORGE JARA Centers for Disease Control and Prevention, Regional Office for Central America and Panama, CDC-CAP Ciudad de Guatemala, Guatemala
VÍCTOR CÁRDENAS University of Texas El Paso, TX, Estados Unidos	CARLOS ANDRÉS FANDIÑO Universidad del Valle Cali, Colombia	ERNESTO JARAMILLO Organización Mundial de la Salud Ginebra, Suiza
ALBERTO CONCHA-EASTMAN Guatapé, Colombia	JOSÉ FIGUEROA World Health Organization Ginebra, Suiza	MARCELO LABRUNA Universidade de São Paulo São Paulo, Brasil
ZOILO CUÉLLAR Academia Nacional de Medicina Bogotá, D.C., Colombia	LUIS FERNANDO GARCÍA Universidad de Antioquia Medellín, Colombia	JAIRO LIZARAZO Hospital Universitario Erasmo Meoz Cúcuta, Colombia
LUIS GABRIEL CUERVO Organización Panamericana de la Salud Washington, D.C., Estados Unidos	ALBERTO GÓMEZ Pontificia Universidad Javeriana Bogotá, D.C., Colombia	JUAN GUILLERMO McEWEN Corporación para Investigaciones Biológicas Medellín, Colombia
PATRICIA DEL PORTILLO Corpogén Bogotá, D.C., Colombia	ENRIQUE GONZÁLEZ University of Texas Health Science Center at San Antonio San Antonio, TX, Estados Unidos	

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 Angeles
Los Angeles, CA, Estados Unidos

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

BLANCA RESTREPO
University of Texas
Brownsville, TX, Estados Unidos

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

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

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

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

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

GIOCONDA SAN BLAS
Instituto Venezolano de
Investigaciones Científicas
Caracas, Venezuela

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

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

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

ROBERT TESH
University of Texas
Galveston, TX, ESTADOS UNIDOS

BRUNO TRAVI
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

GUSTAVO VALBUENA
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

JUAN MIGUEL VILLALOBOS
Universidade Federal de Rondônia
Porto Velho, Brasil

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

CARLOS ARTURO HERNÁNDEZ
Edición y corrección de estilo

LINDA GRACE MOLANO
Asistencia editorial

MARTHA RENZA
Corrección de estilo

ELIZABETH GUZMÁN
Mercadeo digital

LUZ ÁNGELA SALGADO
Diagramación

© Instituto Nacional de Salud

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

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

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

Control de la tuberculosis multirresistente a fármacos: un objetivo posible <i>Jaime Robledo</i>	431
---	-----

Presentación de caso

Manifestaciones oculares de la enfermedad de Fabry en pacientes colombianos <i>Katherine Rothstein, Jubby M. Gálvez, Ángela M. Gutiérrez, Laura Rico, Eveling Criollo, Alejandra de-la-Torre</i>	434
Descripción clínico-radiológica de un angiosarcoma cardiaco con metástasis cerebral que simula un quiste hidatídico <i>Blair Ortiz, Carolina Hernández, Norma Carolina Barajas</i>	440

Ensayo

¿Responde la Resolución 8430 de 1993 a las necesidades actuales de la ética de la investigación en salud con seres humanos en Colombia? <i>Julio César Mateus, María Teresa Varela, Diana María Caicedo, Nhora Lucía Arias, Cruz Deisy Jaramillo</i> <i>Liliana Cristina Morales, Gloria Inés Palma</i>	448
---	-----

Artículo original

Evaluación del daño oxidativo y por metilación del ADN de pintores expuestos ocupacionalmente a solventes orgánicos y pinturas <i>Elizabeth Londoño-Velasco, Fabián Martínez-Perafán, Silvio Carvajal, Felipe García-Vallejo, Luz Stella Hoyos-Giraldo</i>	464
Conocimientos, actitudes y prácticas sobre dengue en estudiantes de escuelas rurales de un área endémica en Colombia <i>Diana Sarmiento-Senior, María Inés Matiz, Juan Felipe Jaramillo-Gómez, Víctor Alberto Olano, Sandra Lucía Vargas, Neal Alexander, Audrey Lenhart, Thor Axel Stenström, Hans Jörgen Overgaard</i>	478
El análogo de cumarina 3-metil-7H-furo[3,2-g]cromen-7-ona, un posible agente antiparkinsoniano <i>María del Pilar Olaya, Nadezdha Esperanza Vergel, José Luis López, María Dolores Viña, Mario Francisco Guerrero</i>	491
Análisis de costo-utilidad del desfibrilador cardioversor implantable para el tratamiento de pacientes colombianos con insuficiencia cardíaca isquémica o no isquémica de clase II o III según la <i>New York Heart Association</i> <i>Sara Atehortúa, Juan Manuel Senior, Paula Castro, Mateo Ceballos, Clara Saldarriaga, Nelson Giraldo, Guillermo Mora</i>	502
Resistencia a la metilicina y producción de biopelícula en aislamientos clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativa en México <i>Ayerim García, Carlos Martínez, Rosa Isela Juárez, René Téllez, Marco Antonio Paredes, María del Rocío Herrera, Silvia Giono</i>	513
Efecto del entrenamiento con intervalos de gran intensidad comparado con el entrenamiento continuo de intensidad moderada en el consumo máximo de oxígeno y la presión arterial en hombres sanos: estudio clínico aleatorio <i>Víctor Hugo Arboleda-Serna, Yuri Feito, Fredy Alonso Patiño-Villada, Astrid Viviana Vargas-Romero, Elkin Fernando Arango-Vélez</i>	524
Síndrome de desgaste profesional, índice de masa corporal y otros factores asociados con la labor de profesores de educación física de Ibagué, Colombia <i>Felipe Augusto Reyes-Oyola, Constanza Palomino-Devia, Néstor William Aponte-López</i>	537
La leptina promueve la expresión de Hic-5 y la formación de puntos de actina por la vía dependiente de FAK-Src en células epiteliales mamarias MCF10A. <i>Raúl Isaías-Tizapa, Erika Acosta, Arvey Tacuba-Saavedra, Miguel Mendoza-Catalán, Napoleón Navarro-Tito</i>	547
Incidencia de los problemas relacionados con los medicamentos antirretrovirales para el tratamiento de la infección por HIV en pacientes hospitalizados en el Hospital Santa Clara de Bogotá <i>Carlos Andrés Badillo, Lizeth Katherine Barrera, Gerson Arias, Gabriel Fernando Tribiño, Óscar Andrés Gamboa, Julio César García, Ana María Granada</i>	561
Encuesta sobre hipoglucemia en pacientes con diabetes tratados con insulina: la población colombiana del <i>International Operations Hypoglycemia Assessment Tool</i> <i>Ana M. Gómez, Luis G. Chica, Álvaro F. Burbano, Esdras M. Vásquez, Jorge A. Escobar, Paola M. Arias, Dora I. Molina</i>	576
Síntomas subagudos y crónicos de la fiebre de chikungunya en un grupo de personas adultas en Ibagué, Colombia <i>Juan Sebastián Sánchez, Ana María Cañón, Jadith Cristina Lombo</i>	587
Análisis de la variabilidad genética de una muestra de la población de Bogotá: hacia la constitución de un mapa de haplotipos <i>Juan David Caicedo, Alejandro Cáceres, Carlos E. Arboleda-Bustos, María Fernanda Mahecha, Jenny Ortega, Gonzalo Arboleda, Humberto Arboleda</i>	595
Estudio de las variantes alélicas <i>CYP2C9*2</i> y <i>CYP2C9*3</i> en muestras de población mestiza peruana <i>Ángel Tito Alvarado, Ana María Muñoz, Berta Loja, Jessica Michiko Miyasato, Jorge Antonio García, Roberto Andrés Cerro, Luis Abel Quiñones, Nelson Miguel Varela</i>	601
Cartas al editor	611

Contents

Editorial

- Multi-drug resistant tuberculosis: A reachable objective
Jaime Robledo 431

Case presentation

- Ocular findings in Fabry disease in Colombian patients
Katherine Rothstein, Jubby M. Gálvez, Ángela M. Gutiérrez, Laura Rico, Eveling Criollo, Alejandra de-la-Torre..... 434
- A radiological and clinical description of metastatic angiosarcoma simulating a hydatid cyst
Blair Ortiz, Carolina Hernández, Norma Carolina Barajas 440

Essay

- Does Resolution 8430 of 1993 respond to the current needs of ethics in health research with human beings in Colombia?
Julio César Mateus, María Teresa Varela, Diana María Caicedo, Nhora Lucía Arias, Cruz Deisy Jaramillo, Liliana Cristina Morales, Gloria Inés Palma 448

Original article

- Evaluation of oxidative and methylating DNA damage in painters occupationally exposed to organic solvents and paints
Elizabeth Londoño-Velasco, Fabián Martínez-Perafán, Silvio Carvajal, Felipe García-Vallejo, Luz Stella Hoyos-Giraldo 464
- Knowledge, attitudes, and practices about dengue among pupils from rural schools in an endemic area in Colombia
Diana Sarmiento-Senior, María Inés Matiz, Juan Felipe Jaramillo-Gómez, Víctor Alberto Olano, Sandra Lucía Vargas, Neal Alexander, Audrey Lenhart, Thor Axel Stenström, Hans Jörgen Overgaard 478
- Coumarin analogue 3-methyl-7H-furo[3,2-g] chromen-7-one as a possible antiparkinsonian agent
María del Pilar Olaya, Nadezdha Esperanza Vergel, José Luis López, María Dolores Viña, Mario Francisco Guerrero 491
- Cost-utility analysis of an implantable cardioverterdefibrillator for the treatment of patients with ischemic or non-ischemic New York Heart Association class II or III heart failure in Colombia
Sara Atehortúa, Juan Manuel Senior, Paula Castro, Mateo Ceballos, Clara Saldarriaga, Nelson Giraldo, Guillermo Mora 502
- Methicillin resistance and biofilm production in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* in México
Ayerim García, Carlos Martínez, Rosa Isela Juárez, René Téllez, Marco Antonio Paredes, María del Rocío Herrera, Silvia Giono 513
- Effects of high-intensity interval training compared to moderate-intensity continuous training on maximal oxygen consumption and blood pressure in healthy men: A randomized controlled trial
Víctor Hugo Arboleda-Serna, Yuri Feito, Fredy Alonso Patiño-Villada, Astrid Viviana Vargas-Romero, Elkin Fernando Arango-Vélez 524
- Burnout syndrome, body mass index and other factors related to the practice of physical education teachers in Ibagué, Colombia
Felipe Augusto Reyes-Oyola, Constanza Palomino-Devia, Néstor William Aponte-López 537
- Leptin induced Hic-5 expression and actin puncta formation by the FAK/Src-dependent pathway in MCF10A mammary epithelial cells.
Raúl Isaías-Tizapa, Erika Acosta, Arvey Tacuba-Saavedra, Miguel Mendoza-Catalán, Napoleón Navarro-Tito 547
- Incidence of antiretroviral drug-related problems in the treatment of HIV among hospitalized patients in the *Hospital Santa Clara*, Bogotá
Carlos Andrés Badillo, Lizeth Katherine Barrera, Gerson Arias, Gabriel Fernando Tribiño, Óscar Andrés Gamboa, Julio César García, Ana María Granada 561
- Survey on hypoglycemia among insulin-treated patients with diabetes: The Colombian International Operations Hypoglycemia Assessment Tool population
Ana M. Gómez, Luis G. Chica, Álvaro F. Burbano, Esdras M. Vásquez, Jorge A. Escobar, Paola M. Arias, Dora I. Molina 576
- ## Brief communication
- Subacute and chronic symptoms of chikungunya fever in a group of adults in Colombia
Juan Sebastián Sánchez, Ana María Cañón, Jadith Cristina Lombo..... 587
- Genetic variability analysis in a population from Bogotá: Towards a haplotype map
Juan David Caicedo, Alejandro Cáceres, Carlos E. Arboleda-Bustos, María Fernanda Mahecha, Jenny Ortega, Gonzalo Arboleda, Humberto Arboleda 595
- Study of the allelic variants *CYP2C9*2* and *CYP2C9*3* in samples of the Peruvian mestizo population
Ángel Tito Alvarado, Ana María Muñoz, Berta Loja, Jessica Michiko Miyasato, Jorge Antonio García, Roberto Andrés Cerro, Luis Abel Quiñones, Nelson Miguel Varela 601
- ## Letters to the editor
- 611

Editorial

Control de la tuberculosis multirresistente a fármacos: un objetivo posible

La tuberculosis multirresistente es un obstáculo real para alcanzar el control de la enfermedad en el 2030, tal como lo establecen los objetivos de desarrollo sostenible (1). La proyección de la situación actual al 2050, permite visualizar que el 25 % de las muertes atribuidas a la resistencia a los medicamentos serán por la tuberculosis y que *Mycobacterium tuberculosis* será el agente patógeno respiratorio con las mayores cifras de resistencia (2). Además, y no menos importante para los programas de salud pública y la economía de los países, el costo económico de una muerte por tuberculosis multirresistente fluctúa entre USD\$ 5.000 y USD\$ 55.000 (3). Frente a estas cifras, resulta paradójico que se cuente con los medios de diagnóstico, tratamiento y prevención para impedir este posible desenlace en el futuro.

El desarrollo de nuevas tecnologías moleculares para establecer la sensibilidad a los medicamentos, como el Xpert para la rifampicina y los ensayos de sondas en línea para la isoniacida y la rifampicina, permite obtener resultados en horas, en comparación con los días que tardan los métodos microbiológicos basados en cultivos. Por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) los ha avalado (4,5). El acceso universal a pruebas de sensibilidad y medicamentos de segunda línea puede disminuir la mortalidad en 73 % y la incidencia en 43 % en los próximos 30 años, según un estudio basado en un modelo (*modelling approach*) llevado a cabo en Moldavia, un país con alta prevalencia de tuberculosis multirresistente (6).

La implementación de estas tecnologías requiere conocer su desempeño, establecer los valores predictivos de la sensibilidad a medicamentos en el contexto de la población estudiada, calcular el tiempo que tardan en generar un resultado y la eficacia de su implementación, con el fin de evitar que el diagnóstico no se mejore y se incrementen los costos de la atención, así como sincronizar la obtención de los resultados con el comienzo oportuno de un tratamiento efectivo.

Los tratamientos de la tuberculosis multirresistente incluyen medicamentos más costosos que causan más reacciones secundarias, deben emplearse durante un tiempo más prolongado, y son menos efectivos y más costosos que los usados para la tuberculosis sensible a los fármacos. Una consecuencia directa de ello es el deficiente cumplimiento del tratamiento, con el consecuente aumento de la morbilidad y la mortalidad, el riesgo de desarrollar formas más resistentes, como la tuberculosis extremadamente resistente (TB-XDR), y la potencial transmisión de estas cepas a la comunidad. En la más reciente guía de la OMS para el tratamiento de la tuberculosis resistente a los fármacos se recomiendan nuevos medicamentos, se sugiere evitar otros por sus efectos tóxicos (inyectables, aminoglucósidos) y utilizar esquemas más cortos (9 a 12 meses en lugar de

18 a 20 meses) en los pacientes que cumplan con ciertas condiciones (7). Todavía es temprano para determinar a mediano y largo plazo el impacto de los nuevos medicamentos y de los tratamientos más cortos; sin embargo, un estudio en el que se evaluaron el resultado y los efectos secundarios de un tratamiento estandarizado de 9 meses en países de África, reportó 72,4 % de curación (8), que está muy por encima de la obtenida con los tratamientos convencionales más prolongados.

Los avances en el diagnóstico y en el tratamiento hacen parte de la solución para mejorar el control de la tuberculosis multirresistente; sin embargo, no serán suficientes para alcanzarlo si no se tienen en cuenta otros factores en el manejo de una enfermedad compleja y de amplio impacto social como la tuberculosis y sus formas resistentes a fármacos.

Entender por qué un paciente llega a desarrollar una forma resistente de la enfermedad y determinar los factores de riesgo es indispensable para diseñar estrategias de prevención y control más efectivas. En una revisión sistemática y metaanálisis reciente de estudios adelantados en varias regiones del mundo, se establecieron como los factores de riesgo más importantes el haber sido tratado por tuberculosis previamente, el tener una edad mayor de 40 años, el estar desempleado, el no tener seguro de salud, el presentar baciloscopia positiva, efectos secundarios del tratamiento, la infección por HIV o por enfermedad pulmonar obstructiva crónica, el incumplir el tratamiento y el estar infectado por cepas del tipo Beijing; asimismo, algunos factores se asociaron con regiones geográficas específicas. Los autores concluyeron que, además de abordar factores de riesgo universales como la enfermedad y el tratamiento previo, son necesarios estudios regionales sobre factores de riesgo específicos para diseñar estrategias efectivas de control (9).

Es necesario determinar, no solo los factores de riesgo, incluidos algunos de los condicionantes sociales de la enfermedad, sino que es imprescindible facilitar el acceso al tratamiento y la comunicación entre el personal de salud y los enfermos, así como garantizar la protección social de los pacientes con tuberculosis multirresistente que incluya el apoyo emocional, social y económico (10).

En el 2017 la OMS estimó que en Colombia se habían dado 420 casos de tuberculosis multirresistente a la rifampicina (11), de los cuales se diagnosticaron menos del 60 % (12). Aunque el programa nacional de tuberculosis se ha fortalecido con su red de laboratorios, lo cual ha mejorado la accesibilidad a las pruebas de sensibilidad a los fármacos (12), la brecha entre los casos estimados y los reportados es uno de los retos que debe priorizarse.

Sin embargo, no basta con hacer el diagnóstico, sino que, además de hacerlo, se le debe proveer al paciente el mejor tratamiento posible, algo que el país está todavía en mora de solucionar. Los lineamientos técnicos y operativos del programa nacional de tuberculosis próximos a ser publicados abordan el uso de nuevos fármacos y de tratamientos más cortos para la tuberculosis multirresistente, acordes con las más recientes guías de la OMS. Se espera que no haya limitaciones futuras de acceso y disponibilidad del tratamiento para su implementación, como ha ocurrido en el pasado.

La incorporación de nuevas tecnologías diagnósticas y de nuevos fármacos y esquemas de tratamiento basados en la mejor información disponible, así como la comprensión del entorno individual y social del paciente con tuberculosis multirresistente, son retos que debe abordar

el programa nacional de tuberculosis para garantizar que el diagnóstico oportuno y el tratamiento efectivo sean la mejor manera de controlar esta forma de la enfermedad en el futuro.

Jaime Robledo, M.D., Ph.D.

Unidad de Bacteriología y Micobacterias, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia; Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia

Referencias

1. Organización de las Naciones Unidas. Objetivos de desarrollo sostenible. Ginebra: Organización de las Naciones Unidas; 2015. p. 1-5. <http://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>
2. O'Neill J. Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. 2016. Fecha de consulta: 10 de agosto de 2019. Disponible en: <https://www.mendeley.com/catalogue/antimicrobial-resistance-tackling-crisis-health-wealth-nations/>
3. Reid MJA, Arinaminpathy N, Bloom A, Bloom BR, Boehme C, Chaisson R, *et al.* Building a tuberculosis-free world: The Lancet Commission on Tuberculosis. *Lancet*. 2019;393:1331-84. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30024-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30024-8)
4. World Health Organization. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children. Policy update. Geneva. 2013. Fecha de consulta: 10 de agosto de 2019. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112472/9789241506335_eng.pdf;jsessionid=F268607C867
5. World Health Organization. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). Policy statement. Geneva: 2008. Fecha de consulta: 13 de agosto de 2019. Disponible en: https://www.who.int/tb/features_archive/policy_statement.pdf
6. Vesga JF, Hallett TB, Reid MJA, Sachdeva KS, Rao R, Khaparde S, *et al.* Assessing tuberculosis control priorities in high-burden settings: A modelling approach. *Lancet Glob Health*. 2019;7:e585-95. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30037-3](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30037-3)
7. World Health Organization. Consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment. Geneva: 2019. Fecha de consulta: 13 de agosto de 2019. Disponible en: <http://apps.who.int/bookorders>
8. Trebucq A, Schwoebel V, Kashongwe Z, Bakayoko A, Kuaban C, Noeske J, *et al.* Treatment outcome with a short multidrug-resistant tuberculosis regimen in nine African countries. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2018;22:17-25. <https://doi.org/10.5588/ijtld.17.0498>
9. Pradipta IS, Forsman LD, Bruchfeld J, Hak E, Alffenaar JW. Risk factors of multidrug-resistant tuberculosis: A global systematic review and meta-analysis. *J Infect*. 2018;77:469-78. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.10.004>
10. Ballesteros JG, d'Auria de Lima MC, García JM, Gonzales RI, Sicsú AN, Mitano F, *et al.* Estratégias de controle e atenção à tuberculose multirresistente: uma revisão da literatura. *Rev Panam Salud Pública*. 2019;43:e20. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2019.20>
11. World Health Organization. Tuberculosis country profiles. 2017. Fecha de consulta: 10 de agosto de 2019. Disponible en: <http://www.who.int/tb/country/data/profiles/en/>
12. Ministerios de Salud y Protección Social, Organización Panamericana de la Salud. Plan estratégico "Hacia el fin de la tuberculosis", Colombia, 2016-2025. Bogotá: 2016. Fecha de consulta: 20 de agosto de 2019. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/INEC/INTOR/Plan-estrategico-fin-tuberculosis-colombia-2016-2025.pdf>

Case presentation

Ocular findings in Fabry disease in Colombian patients

Katherine Rothstein¹, Jubby M. Gálvez², Ángela M. Gutiérrez¹, Laura Rico², Eveling Criollo³, Alejandra de-la-Torre³

¹ Grupo de Investigación en Oftalmología, Escuela Superior de Oftalmología, Instituto Barraquer de América, Bogotá, D.C., Colombia

² Grupo de investigación Geniuros, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, D.C., Colombia

³ Grupo de Investigación en Neurociencias, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, D.C., Colombia

Fabry disease is a rare X-linked disorder caused by an alpha-galactosidase enzyme deficiency, which leads to a progressive lysosomal glycosphingolipids accumulation, mainly globotriaosylceramide, in multiple organism tissues including the eye.

This case series describes the first ophthalmological Colombian report of Fabry disease highlighting the importance of ocular signs as markers of the disease, useful in diagnosis and treatment to avoid long-term complications that lead to a morbi-mortality increment. We describe five cases of Fabry disease from Bogotá, Colombia, including a complete clinical history, ophthalmologic, optometric examination, and photographs. We found that all patients had refractive defects and that in all cases corneal verticillata pattern was found. Four patients presented with posterior capsule lens brown-beige deposits and four patients had conjunctival and retinal tortuous vessels.

A complete ophthalmologic examination is important for prompt diagnosis, which is key to starting a multidisciplinary treatment and reducing morbi-mortality.

Keywords: Fabry disease; alpha-Galactosidase; lysosomal storage diseases; corneal opacity; retinal vessels; lens capsule, crystalline.

Manifestaciones oculares de la enfermedad de Fabry en pacientes colombianos

La enfermedad de Fabry es un raro trastorno ligado al cromosoma X causado por deficiencia de la enzima alfa-galactosidasa y la consiguiente y progresiva acumulación lisosómica de glucoesfingolípidos, especialmente la globotriaosilceramida, en múltiples tejidos del organismo, incluido el ojo.

En este reporte se presenta la primera serie de casos de manifestaciones oculares de la enfermedad de Fabry en Colombia, resaltando la importancia de los signos oculares como ayuda para el diagnóstico temprano.

Se presentan cinco casos de la enfermedad en Bogotá y se da cuenta de las historias clínicas y los exámenes oftalmológicos y de optometría, y se incluyen fotografías. En todos los pacientes se hallaron errores de refracción y se evidenció el patrón de córnea *verticillata*. Cuatro pacientes presentaban depósitos de color café y castaño claro en la cápsula posterior del cristalino, y cuatro tenían tortuosidad vascular conjuntival y retiniana. El examen oftalmológico completo es importante para hacer un diagnóstico oportuno con el fin de iniciar el tratamiento multidisciplinario y reducir la morbimortalidad.

Palabras clave: enfermedad de Fabry; alfa-galactosidasa; enfermedades por almacenamiento lisosómico; opacidad de la córnea; vasos retinianos; cápsula del cristalino.

Fabry disease is a rare X-linked disorder caused by alpha-galactosidase deficiency which leads to a progressive lysosomal glycosphingolipids accumulation, mainly globotriaosylceramide (Gb3) (1) in endothelial and smooth muscle cells of several organs vessels including the eye (1-4).

Clinical manifestations begin during infancy and adolescence and include intermittent acroparesthesias (5), limbs chronic pain (3,6), "Fabry crises" (1,5), angiokeratomas (5,6), hypo-anhidrosis (5), gastrointestinal and cardiac abnormalities (1,5,7,8), cerebrovascular attacks, and ocular abnormalities (2,9,10).

The disease occurs primarily in the cornea, conjunctiva, lens, and retina. Ophthalmological features of Fabry disease have been described not only in the anterior segment but also in the posterior pole of the eye. Anterior segment

Received: 13/03/17
Accepted: 20/09/18
Published: 08/11/18

Citation:

Rothstein K, Gálvez JM, Gutiérrez AM, Rico L, Criollo E, de-la-Torre A. Ocular findings in Fabry disease in Colombian patients. *Biomédica*. 39;3:434-39. <https://doi.org/10.7705/biomedica.3841>

Corresponding author:

Alejandra de-la-Torre, Grupo de Investigación en Neurociencias, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Carrera 24 N° 63C-69, Bogotá, D.C., Colombia
Telephone: (+571) 297 0200, extension 3320
alejadelatorre@yahoo.com

Author contributions:

All the authors contributed equally to the definition and design of the article concepts and contents, the literature search, data collection and analysis, and manuscript drafting and revision.

Funding:

The authors had no funding to report.

Conflicts of interest:

The authors declare no conflicts of interest.

manifestations are aneurysmal vessels in the bulbar conjunctiva, cornea verticillata, and opacification of the lens. In the posterior segment, the most common features are vessel tortuosity and retinal vascular occlusions (1).

Early diagnosis is important to start a prompt enzyme replacement therapy (11,12) and to prevent new ocular complications and irreversible systemic organ damage, although enzyme replacement therapy does not reverse the established ocular manifestations of Fabry disease (2).

The purpose of this case series is to present the ocular findings of Fabry disease in a Colombian series of cases to improve diagnosis, remission, and early treatment of these patients, avoiding long-term complications that can increase morbidity and mortality.

Case series

Four male patients diagnosed with Fabry disease and a carrier woman, all from Bogotá, Colombia, were referred to a reference ophthalmologic center for evaluating their ophthalmological features. The diagnosis was previously made by geneticists considering the clinical findings by testing for deficient α -galactosidase A (α -GAL) enzyme activity and confirmed by DNA analysis of the α -GAL A gene. Four patients belonged to the same family: Three brothers and the mother identified as patients 1, 2, 3, and 4 (table 1).

All of the patients (or relatives/guardians) signed the assent and/or informed consent. A complete clinical record with family and personal history, optometric-ophthalmological examination and ocular photographic register of anterior and posterior segments of the eye were completed (table 1).

Refractive defects were found in all patients as composed myopic astigmatism, three with mixed astigmatism and amblyopia. They all had punctate brown-cream corneal deposits with a central corneal radiated pattern, which in advanced cases generated a verticillata pattern (figure 1).

Four patients had a wedge shape brown-cream deposit on the anterior internal lens capsule periphery, predominantly inferior (figure 2). All of them except for the carrier female presented with conjunctival and retinal vessels tortuosity (table 1). Four of the five patients presented the 'classic variant' of Fabry disease and only

Table 1. Demographic, systemic and ophthalmological findings in five Colombian patients with Fabry disease

Case	Gender	Age	Family history of Fabry disease	Neuropathy	Organs affected besides eye at the moment of the ophthalmic evaluation	Ametropy	Amblyopy	Cornea verticillata	Lens opacity	Conjunctival vascular tortuosity	Retinal tortuous vessels	Lacrimal abnormality
1	Male	14	Yes	No	No	Mixed astigmatism	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
2	Male	19	Yes	Yes	No	Simple myopic astigmatism	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
3	Female	38	Yes	No	No	Simple myopic astigmatism	No	Yes	No	No	No	No
4	Male	17	Yes	Yes	No	Mixed astigmatism	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
5	Male	43	No	No	Kidney	Simple myopic astigmatism/mixed astigmatism	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

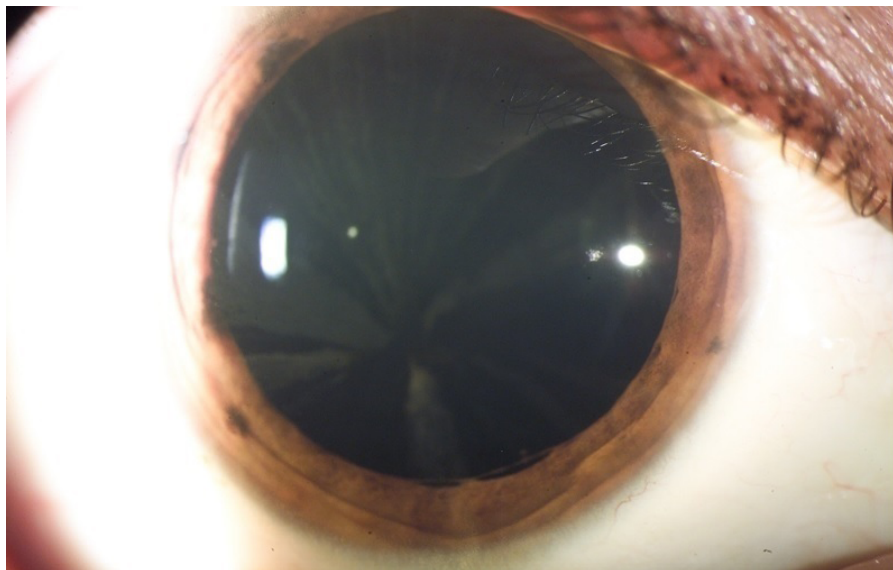


Figure 1. Cornea verticillata pattern characterized by brown-cream color deposits in a radiated pattern observed in patient 4

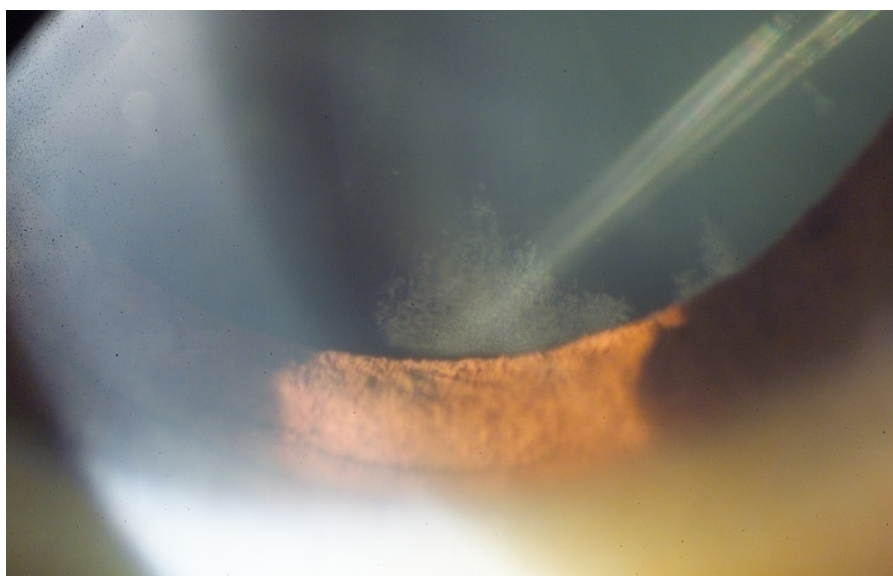


Figure 2. Lens opacity described as brown-cream deposits in the periphery of the anterior internal capsule of the lens observed in patient 2

one presented the 'kidney variant' with severe renal compromise requiring kidney transplantation (table 1). The starting time of enzyme replacement therapy was not specified in the clinical charts of the patients.

Discussion

Ophthalmological findings are common in Fabry disease compromising various ocular structures (1,2,8,9,13). In our case series, one of the most typical ocular findings was cornea verticillata pattern found in all of the patients; four out of five presented with lens opacity and with tortuosity and dilatation of retinal and conjunctival vessels. Although four of five presented with tortuous vessels, none of them developed retinal venous-arterial occlusions and none presented with optic disc edema.

Corneal epithelial-subepithelial deposits are the most important ocular manifestation (7) presenting in more than 95% of affected males and 88% of carrier females. The injury starts during infancy as a diffuse cloud, which progresses to cornea verticillata, characterized by radial, linear, symmetric, and bilateral cream to brown-gold color deposits (14).

Cornea verticillata is the most distinctive finding in females. All males in our case series presented cornea verticillata, as well as other ocular findings such as conjunctiva, lens, and retinal alterations. In contrast, the only woman among our patients presented cornea verticillata without the aforementioned findings. Cornea verticillata is rare in subjects without Fabry disease and, therefore, this finding has high diagnostic sensitivity and specificity, often related to disease severity (15).

Other causes of cornea verticillata are amiodarone prolonged therapy, aminoquinoline, atovaquone, subconjunctival gentamicin, gold salts, ibuprofen, indomethacin, naproxen, phenothiazine, tamoxifen, multiple myeloma, and environmental exposure to silica dust (16). All pathologies and/or drugs that can produce similar findings were discarded in the patients.

Vascular conjunctival abnormalities include vessel dilatation, tortuosity, and aneurysms, which are more common in the inferior bulbar conjunctiva (1,14). Vascular tortuosity is related with disease severity (17). Similarly, except for the female, all of our patients presented with conjunctival abnormalities.

In the literature, lens opacities are present in 70% of males and 35% of carrier females. Posterior opacities are the most common in both genders. Linear white opacities reveal the Gb3 epithelium deposits through the posterior suture lines known as Fabry cataracts, the only ocular diagnostic criteria (1). Anterior cataract, seen in 31% of males and 5% of females, is usually bilateral and wedge-shaped, with a variable density. Helix form, granular cream color deposits are found in the anterior capsule (4,14). According to this, lens opacities were observed in all four males of our case series. Figure 2 shows the linear-white opacities compatible with Fabry cataract.

The most common retinal finding is vascular tortuosity (1), found in 77% of males and 19% of carrier females. A narrowing of small vessels can cause a vascular-occlusive phenomenon secondary to Gb3 accumulation. Therefore, Fabry disease should be considered when a young patient presents a retinal or peripapillary vascular-occlusive event. Several patients have visual loss caused by retinal central artery-vein occlusion, ischemic optic neuropathy, optic atrophy, retinal ischemia or choroid perfusion defects (1). Although retinal vascular tortuosity was observed in four of our male patients, there were no vascular-occlusive events.

Increased blind-spot has been reported without an afferent disc defect or dyschromatopsia. Other findings include myopia, nerve fibers myelination, and disc edema (14,18). None of our patients had optic nerve alterations. All of them presented with refractive errors consistent with astigmatism and three of them with myopic astigmatism.

Because most ocular findings do not compromise visual acuity, patients rarely consult ophthalmologists. Nevertheless, when a characteristic Fabry sign is observed, it should be suspected and referred for a complete screening, especially when the patient is young, as in such cases ophthalmologists may identify an early-stage disease before complications appear. Ocular signs can

act as markers of the disease with diagnostic and prognostic implications. As the eye is an external organ easily investigated with minimally invasive technologies, it may be useful for monitoring the natural history of Fabry disease and its response to enzyme replacement therapy (17).

All the patients in this series were referred to our clinic with the diagnosis of Fabry disease for ophthalmological examination and ocular findings were present in all of them.

The clinical systemic presentation is heterogeneous and the signs and symptoms change with the age of the patient due to the slow progressiveness of the disease (17,19). Three of our patients were male siblings under 20 years of age who presented with acroparesthesia, neuropathic pain, joint and abdominal pain crisis, and dyshidrosis. They did not report cardiac, respiratory symptoms or stroke, probably because such symptoms often appear at a later age (19). Patient 5, the oldest in the case series (43 years-old), had a renal variant, several of the symptoms already mentioned, such as pain attacks, and was under enzymatic treatment. Additionally, he was taking immunosuppressant medications for post-transplant management.

An exhaustive ophthalmological assessment offers an important opportunity for early diagnosis. Any patient with corneal opacity, cornea verticillata or Fabry cataract in association with retinal vessels tortuosity, conjunctival telangiectasia or lens opacities should have a detailed evaluation and appraisal of family history. If there is a high risk of Fabry disease, the patient should be referred to a geneticist for evaluation and genetic counseling. If it is confirmed, the patient can be treated and multidisciplinary management should be started before irreversible complications appear (19). The treatment does not depend only on the diagnosis; rather, since each patient is different, the treatment pathway should be adjusted and managed according to the individual.

Greater awareness of Fabry disease among optometrists and ophthalmologists could reduce diagnostic delays and decrease early mortality of these patients.

References

1. Germain DP. Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5:30. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-30>
2. Sodi A, Ioannidis AS, Mehta A, Davey C, Beck M, Pitz S. Ocular manifestations of Fabry's disease: Data from the Fabry Outcome Survey. *Br J Ophthalmol.* 2007;91:210-4. <https://doi.org/10.1136/bjo.2006.100602>
3. Nguyen TT, Gin T, Nicholls K, Low M, Galanos J, Crawford A. Ophthalmological manifestations of Fabry disease: A survey of patients at the Royal Melbourne Fabry Disease Treatment Centre. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2005;33:164-8. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2005.00990.x>
4. Samiy N. Ocular features of Fabry disease: Diagnosis of a treatable life-threatening disorder. *Surv Ophthalmol.* 2008;53:416-23. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2008.04.005>
5. Banikazemi M, Bultas J, Waldek S, Wilcox WR, Whitley CB, McDonald M, *et al.* Fabry Disease Clinical Trial Study Group. Agalsidase-beta therapy for advanced fabry disease: A randomized trial. *Ann Intern Med.* 2007;146:77-86. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-146-2-200701160-00148>
6. Pintos-Morell G, Beck M. Fabry disease in children and the effects of enzyme replacement treatment. *Eur J Pediatr.* 2009;168:1355-63. <https://doi.org/10.1007/s00431-009-0937-9>
7. Marci M, Duro G, Tuttolomondo A, Pinto A, Cirrincione V, Sanfilippo N. Delayed diagnosis of Fabry disease presenting as myocardial ischaemia. *Hellenic J Cardiol.* 2012;53:77-9.

8. Hirano K, Murata K, Miyagawa A, Terasaki H, Saigusa J, Nagasaka T, *et al.* Histopathologic findings of cornea verticillata in a woman heterozygous for Fabry's disease. *Cornea*. 2001;20:233-6.
9. Sher NA, Reiff W, Letson RD, Desnick RJ. Central retinal artery occlusion complicating Fabry's disease. *Arch Ophthalmol*. 1978;96:815-7. <https://doi.org/10.1001/archophth.1978.03910050421003>
10. Hauser AC, Lorenz M, Voigtländer T, Födinger M, Sunder-Plassmann G. Results of an ophthalmologic screening programme for identification of cases with Anderson-Fabry disease. *Ophthalmologica*. 2004;218:207-9. <https://doi.org/10.1159/000076846>
11. Lidove O, Joly D, Barbey F, Bekri S, Alexandra JF, Peigne V, *et al.* Clinical results of enzyme replacement therapy in Fabry disease: A comprehensive review of literature. *Int J Clin Pract*. 2007;61:293-302. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2006.01237.x>
12. Ramaswami U, Parini R, Pintos-Morell G, Kalkum G, Kampmann C, Beck M. Fabry disease in children and response to enzyme replacement therapy: Results from the Fabry Outcome Survey. *Clin Genet*. 2012;81:485-90. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01671.x>
13. Eng CM, Fletcher J, Wilcox WR, Waldek S, Scott CR, Sillence DO, *et al.* Fabry disease: Baseline medical characteristics of a cohort of 1765 males and females in the Fabry Registry. *J Inher Metab Dis*. 2007;30:184-92. <https://doi.org/10.1007/s10545-007-0521-2>
14. Sher NA, Letson RD, Desnick RJ. The ocular manifestations in Fabry's disease. *Arch Ophthalmol*. 1979;97:671-6. <http://doi.org/10.1001/archophth.1979.01020010327008>
15. Pitz S, Kalkum G, Arash L, Karabul N, Sodi A, Larroque S, *et al.* Ocular signs correlate well with disease severity and genotype in Fabry disease. *PLoS One*. 2015;10:e0120814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120814>
16. D'Amico DJ, Kenyon KR, Ruskin JN. Amiodarone keratopathy: Drug-induced lipid storage disease. *Arch Ophthalmol*. 1981;99:257-61. <https://doi.org/10.1001/archophth.1981.03930010259007>
17. Mehta A, Ricci R, Widmer U, Dehout F, García de Lorenzo A, Kampmann C, *et al.* Fabry disease defined: Baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey. *Eur J Clin Invest*. 2004;34:236-42. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2004.01309.x>
18. Orssaud C, Dufier J, Germain D. Ocular manifestations in Fabry disease: A survey of 32 hemizygous male patients. *Ophthalmic Genet*. 2003;24:129-39.
19. Sivley MD. Fabry disease: A review of ophthalmic and systemic manifestations. *Optom Vis Sci*. 2013;90:e63-78. <https://doi.org/10.1097/OPX.0b013e31827ec7eb>

Presentación de caso

Descripción clínico-radiológica de un angiosarcoma cardiaco con metástasis cerebral que simula un quiste hidatídico

Blair Ortiz¹, Carolina Hernández², Norma Carolina Barajas¹

¹ Grupo de Neurología Infantil, Universidad de Antioquia; Hospital San Vicente Fundación, Medellín, Colombia

² Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Los angiosarcomas son sarcomas malignos que se originan en las células endoteliales vasculares. Su diagnóstico diferencial es muy amplio debido a su parecido con otras enfermedades, como las parasitarias, y usualmente es un diagnóstico por exclusión. La neurocisticercosis y la hidatidosis cerebral son parasitosis intestinales que pueden comprometer el sistema nervioso central y tienen mayor incidencia en los países suramericanos. El diagnóstico se establece a partir del perfil epidemiológico, el estudio parasitológico, la apariencia radiológica de las lesiones y el estudio de histopatología del espécimen. Se presenta el caso de una adolescente con factores de riesgo para parasitosis y neuroimágenes sugestivas de hidatidosis cerebral, cuyo diagnóstico definitivo fue angiosarcoma cardiaco metastásico.

Palabras clave: hemangiosarcoma; equinococosis; convulsiones; hipertensión intracraneal.

A radiological and clinical description of metastatic angiosarcoma simulating a hydatid cyst

Angiosarcoma is the most malignant sarcoma originating in endothelial vascular cells. It has a wide differential diagnosis due to its similarities with other entities, such as parasitic diseases. More often, angiosarcoma is diagnosed by exclusion. Neurocysticercosis and hydatid disease, or echinococcosis, are parasitic infections that may involve the central nervous system and their incidence is higher in South American countries. Diagnosis is established based on the epidemiological profile, the parasitological examination, the radiological appearance of the lesions, and the histopathology analysis of specimens. We present the case of a female adolescent with parasitosis risk factors whose neuroimages suggested cerebral hydatid cysts and who was finally diagnosed with cardiac metastatic angiosarcoma.

Keywords: Hemangiosarcoma; echinococcosis; seizures; intracranial hypertension.

Las lesiones quísticas cerebrales se presentan con una sintomatología y un síndrome neurológico muy similares, dependiente del efecto de masa y la ocupación de espacio e independiente de la etiología.

El diagnóstico diferencial es amplio e incluye enfermedades neoplásicas, vasculares e infecciosas, siendo las más importantes las ocasionadas por parásitos. El diagnóstico y el tratamiento representan todo un reto clínico.

La hidatidosis cerebral o equinococosis es una parasitosis infrecuente en Colombia, y la neurocisticercosis es una infección de mayor prevalencia, endémica en ciertas regiones plenamente identificadas por sus antecedentes culturales y de salubridad.

Se presenta el caso de una adolescente con síndrome de hipertensión endocraneana crónica, convulsiones motoras generalizadas y lesiones nodulares en el miembro inferior izquierdo. En la imagenología cerebral se observaron lesiones quísticas gigantes que sugerían la presencia de parásitos intestinales. Sin embargo, en el estudio de histopatología de las lesiones cerebrales y de la extremidad se confirmó un angiosarcoma.

Se discuten las consideraciones diagnósticas y terapéuticas relevantes, así como el potencial parecido clínico con otras enfermedades más frecuentes.

Recibido: 24/05/18
Aceptado: 28/01/19
Publicado: 30/01/19

Citación:

Ortiz B, Hernández C, Barajas NC. Descripción clínico-radiológica de un angiosarcoma cardiaco con metástasis cerebral que simula un quiste hidatídico. *Biomédica*. 2019;39:440-7.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.4335>

Correspondencia:

Blair Ortiz, Carrera 32 N° 7B sur-52, interior 128, Medellín, Colombia
Teléfono: (300) 404 3964
blairortiz@hotmail.com

Contribución de los autores:

Todos los autores contribuyeron a recopilar la información relevante, a darle continuidad histórica al manuscrito, a analizar los datos clínicos y los resultados de laboratorio, a hacer la búsqueda bibliográfica ampliada y a actualizar el concepto médico de esta enfermedad.

Financiación:

No se recibieron recursos económicos para esta publicación.

Conflicto de intereses:

Los autores no tienen conflicto de intereses.

Presentación de caso

Una adolescente de 14 años de edad procedente de la zona urbana del municipio de El Bagre, departamento de Antioquia, fue evaluada en el Servicio de Urgencias por presentar un cuadro clínico de cuatro meses de evolución con cefalea diaria grave, opresiva, de localización posterior, predominantemente matutina y de varias horas de duración, con vómito en proyectil, diplopía y con antecedentes de dos convulsiones motoras de inicio no presenciado con propagación bilateral.

La paciente procedía de una región de la periferia ribereña, con condiciones higiénicas precarias, endémica para parasitosis intestinales, desnutrición y tuberculosis.

En el examen neurológico se encontró una agudeza visual de 20/200, con percepción de la luz, el color y el movimiento, con hemianopsia homónima contralateral derecha, papiledema bilateral, vasos retinales ingurgitados, escasas hemorragias petequiales peripapilares, y dos nódulos semiduros y móviles en el miembro inferior izquierdo y riesgo nutricional.

Se le diagnosticó un síndrome de hipertensión endocraneana, probablemente secundario a una lesión que ocupaba el espacio occipital izquierdo, y convulsiones sintomáticas agudas. En la tomografía computarizada de cráneo se reportaron lesiones de aspecto quístico en la región parieto-occipital izquierda, con edema perilesional y efecto compresivo sobre el parénquima adyacente (figura 1). Se le practicó una craniectomía y se obtuvieron biopsias por incisión.

Se ordenó una resonancia magnética cerebral simple y contrastada en la que se observaron tres lesiones quísticas en los cuadrantes posteriores, la mayor de ellas en la región parieto-occipital izquierda (figura 2). En las secuencias de espectroscopia se conservaba la relación entre colina y N-acetil aspartato, sin picos de colina ni de lactato en algunos vóxeles, lo que sugería la presencia de una condición no neoplásica.

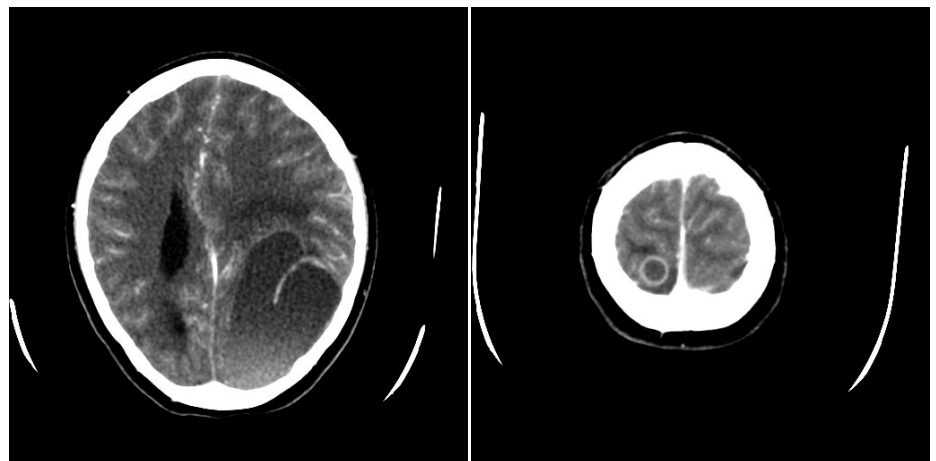


Figura 1. Tomografía computarizada contrastada de cráneo antes de la cirugía, cortes axiales. Se evidencian dos lesiones hipodensas gigantes en la región parieto-occipital izquierda, con edema perilesional y efecto compresivo sobre el parénquima adyacente. En la región parieto-occipital derecha aparece otra lesión hiperdensa más pequeña y de aspecto quístico.

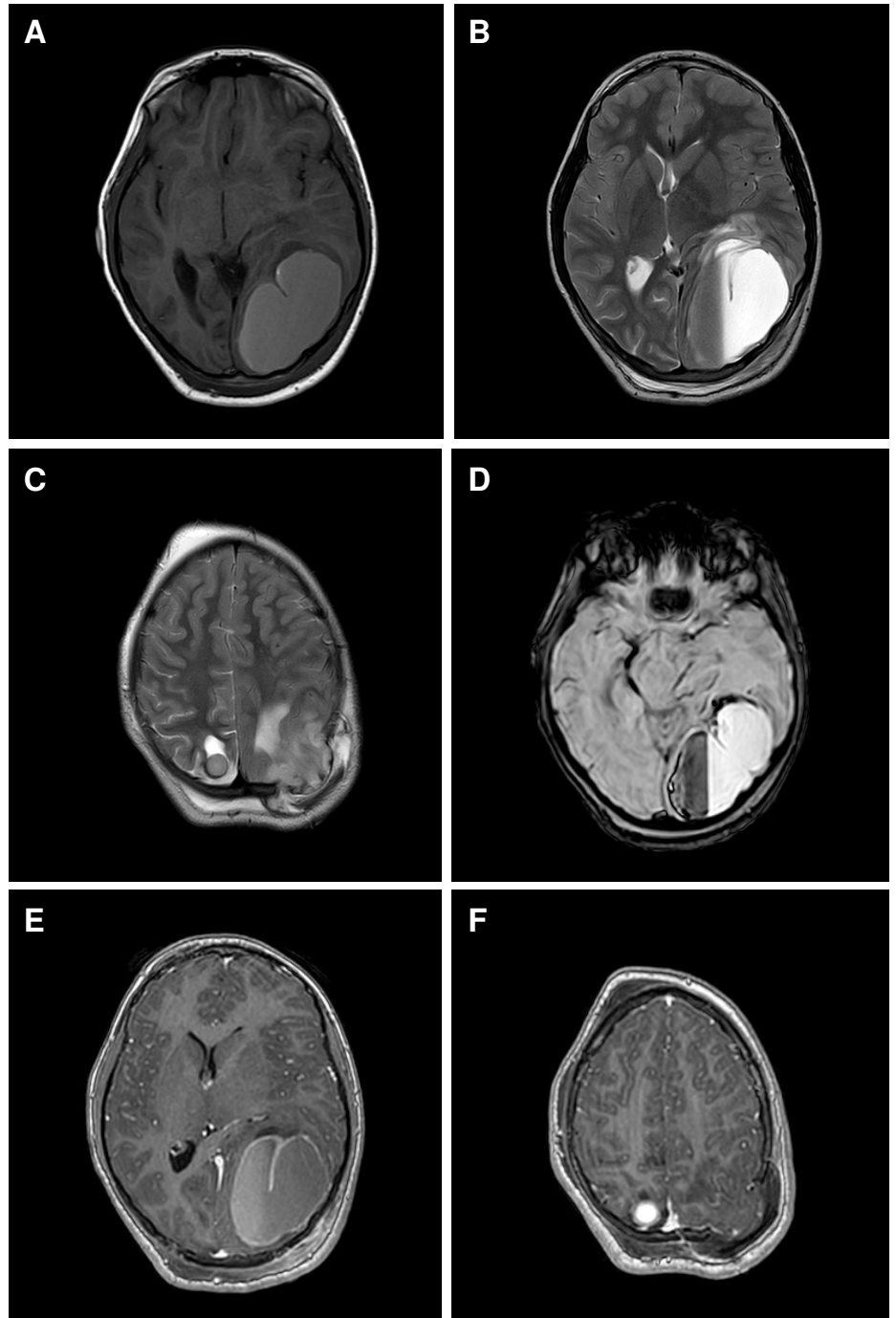


Figura 2. Resonancia magnética neural cerebral después de la craneotomía, cortes axiales. **A.** Secuencia T1 en la que se observan lesiones quísticas gigantes en el cuadrante posterior izquierdo de 7 x 4,5 cm, tabicadas y con efecto compresivo. **B.** Secuencia T2 en la que se aprecian lesiones quísticas gigantes en el cuadrante posterior izquierdo y ligero edema perilesional. **C.** Secuencia T2 que evidencia lesión quística hemorrágica redondeada de 13 x 12 mm en el lóbulo occipital derecho, con herniación del parénquima cerebral a través de craneotomía parietal izquierda. **D.** Secuencia de sensibilidad en la que se observa la lesión quística parieto-occipital izquierda con contenido hemorrágico. **E.** y **F.** Secuencia T1 con gadolinio en la que se observan las lesiones con captación de la pared quística

Bajo la sospecha de parasitosis cerebral, se solicitaron exámenes de Western Blot y ELISA para la detección de cisticercos, con resultados negativos, así como un examen coprológico directo y por concentración seriada que no revelaron parásitos intestinales, y el estudio de histopatología de las biopsias tomadas en el miembro inferior izquierdo. En las biopsias de cerebro y de la extremidad izquierda se reportó un tumor de alto grado de malignidad, con tinción positiva para el tipo de sarcoma.

Mediante la ecocardiografía se detectó una lesión intracavitaria infiltrante del ventrículo izquierdo y con la angiorresonancia cardiaca, una masa isointensa en el músculo en las secuencias de cine, hiperintensa en T2, y con áreas de restricción de la difusión y captación heterogénea del contraste en las imágenes tempranas y tardías (figura 3).

Se diagnosticó angiosarcoma cardiovascular metastásico, y en la junta de especialistas se decidió administrar quimioterapia con ifosfamida, doxorubicina, mesna y pegfilgrastim.

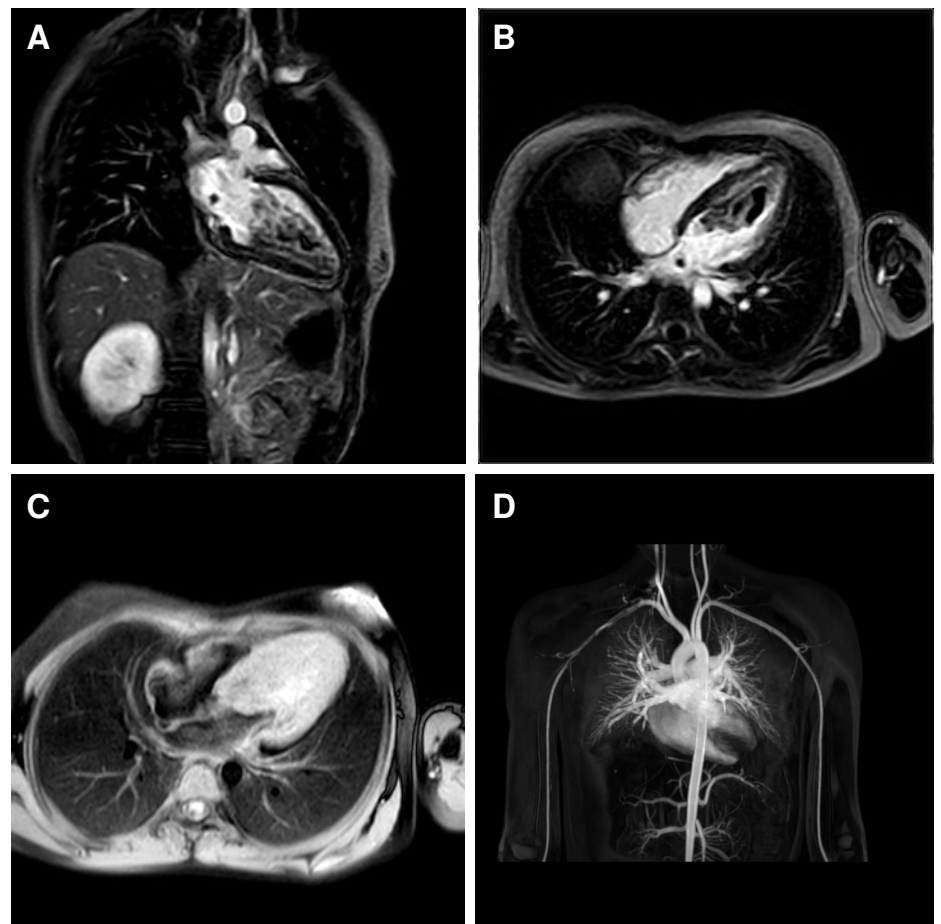


Figura 3. Angiorresonancia cardiaca utilizando resonador de 1,5 teslas, técnica de adquisición de secuencias luego de la administración de gadolinio y selección de imágenes de realce temprano y tardío. **A.** Corte coronal en la que se observa masa intracavitaria de 15 mm en el ventrículo izquierdo. **B y C.** Corte axial en el que se aprecia la extensión de la masa descrita y otra adyacente con características de lesión tumoral en la llegada de la vena pulmonar inferior izquierda. La masa era móvil, obliteraba el tracto de salida del ventrículo izquierdo, protruía a través de la válvula aórtica y no tenía plano de separación con el músculo de la pared del tabique. Tenía escaso derrame pericárdico. **D.** Angiorresonancia tridimensional en la que se observa masa intracavitaria del ventrículo izquierdo con infiltración de la pared del tabique y el ápice, la cual atraviesa hacia la aorta a través de la válvula aórtica, generando obstrucción del tracto de salida.

Discusión

Las lesiones quísticas cerebrales son frecuentes y se convierten en un reto diagnóstico, especialmente en los países en desarrollo, como Colombia, donde las enfermedades parasitarias son una de las primeras opciones dado su estatus epidemiológico.

Los angiosarcomas son sarcomas malignos que se originan en las células endoteliales vasculares. Pueden generarse en cualquier región del cuerpo, aunque se encuentran más comúnmente en la piel, las mamas, el hígado y en tejidos profundos y en menos del 5 % de los casos se localizan en la aurícula o el ventrículo izquierdo; en Colombia, no se han informado en edad pediátrica.

La paciente de este caso procedía de una zona con condiciones precarias de salubridad, donde es probable la presencia del complejo teniasis-cisticercosis, que en el humano afecta principalmente el sistema nervioso central.

La neurocisticercosis es una cestodiasis causada por la larva de *Taenia solium*, la cual se adquiere por el consumo de huevos con embriones del parásito, aguas impotables, frutas y vegetales crudos, o directamente por la vía ano-mano-boca de personas con teniasis (1). Una vez ingeridos los huevos, en el intestino humano se libera el embrión hexacanto, el cual penetra la pared intestinal y alcanza la circulación sanguínea para luego alojarse en diferentes órganos y tejidos donde se desarrolla el estadio de cisticerco o larva y se forman vesículas únicas o múltiples que pueden permanecer viables durante años (2).

En Colombia se han reportado prevalencias de neurocisticercosis de hasta 82,2 % (3); sin embargo, su diagnóstico no es sencillo y requiere la combinación de pruebas clínicas, de laboratorio e imagenología, como la tomografía computarizada craneal, la resonancia magnética cerebral, el análisis directo del líquido cefalorraquídeo, la prueba ELISA y el inmunoensayo (4).

La neurocisticercosis es la enfermedad parasitaria más común del sistema nervioso central y debería considerarse en el diagnóstico diferencial de las metástasis cerebrales, especialmente en pacientes de países endémicos, ya que puede mimetizarse como glioma, abscesos cerebrales o quistes aracnoideos, o parecer metástasis. En la resonancia magnética cerebral, la neurocisticercosis aparece en forma de quistes de pared delgada con edema que, a diferencia de las metástasis, no se realzan con el contraste. El diámetro de las lesiones es menor de 20 mm y a veces se observa un nódulo mural que corresponde al escólex invaginado y constituye un hallazgo patognomónico. El 15 % de los pacientes presenta un único quiste en el sistema nervioso central (5).

Pese a la alta sensibilidad de las pruebas serológicas para la detección de antígenos o anticuerpos, una de las grandes desventajas es el elevado porcentaje de reacciones cruzadas, especialmente en la cisticercosis y otras infecciones helmínticas, entre ellas la hidatidosis (6). El inmunoensayo tiene un valor predictivo negativo importante y arroja hasta un 40 % de falsos positivos por reacción cruzada con otras teniasis, cestodiasis y tricuriasis. Las pruebas serológicas de la paciente de este caso fueron negativas.

La hidatidosis cerebral es una parasitosis causada por la larva de varias especies del cestodo *Echinococcus*, que se adquiere al consumir huevos con embriones provenientes de alimentos contaminados con heces de animales carnívoros que fungen como huéspedes definitivos (7). Una vez ingeridos los huevos de *Echinococcus*, el embrión hexacanto se libera en el intestino

delgado humano, atraviesa la pared intestinal y la circulación lo lleva a los órganos, principalmente hígado o pulmón, donde se establece y crece hasta desarrollar quistes de 1 a 15 cm de tamaño.

El diagnóstico de la hidatidosis cerebral se basa en la presentación clínica, los factores de riesgo para el contagio y, primordialmente, el análisis radiológico. En Colombia, las pruebas serológicas para la hidatidosis no están disponibles debido a que esta cestodiasis es relativamente infrecuente, a diferencia de su mayor incidencia en países del cono sur como Argentina, Chile y Uruguay (8), países con condiciones medioambientales y ganaderas favorables para la propagación larvaria del *Echinococcus*.

Los quistes hidatídicos intracraneales aislados son poco comunes, y producen síntomas que se manifiestan entre 2 semanas y 6 años, especialmente cefalea y vómito, en el 87 % de los pacientes. En la tomografía computarizada craneal los quistes se ven bien delimitados, con una pared fina, lisa y sin realce con el contraste (9,10).

Una vez se efectúa el retiro completo del quiste por medio de técnicas directas y con base en el estudio de histopatología, es posible llegar a observar las características morfológicas propias del quiste hidatídico: las tres membranas y los protoescólices internos (11).

La lesión cerebral detectada en la paciente mediante resonancia magnética simple y contrastada es muy similar a la causada por la infección con *Echinococcus granulosus*; sin por ello descartar la neurocisticercosis; sin embargo, en este caso los resultados negativos del inmunoensayo para cisticercosis descartaron esta parasitosis. La paciente recibió manejo con albendazol a la espera del reporte de patología de las lesiones cerebrales y los nódulos del miembro inferior izquierdo, en el cual se describió una lesión tumoral de alto grado compatible con angiosarcoma.

Con base en este hallazgo se hicieron otros estudios para buscar el sitio primario de la neoplasia y mediante la ecocardiografía y la angiorresonancia cardíaca se halló una masa intracardiaca dependiente del ventrículo izquierdo. El presente caso clínico resalta la importancia de no conformarse con la impresión diagnóstica inicial y hacer uso de todos los métodos diagnósticos al alcance del médico.

El angiosarcoma es una neoplasia muy agresiva, con un alto índice mitótico y capacidad de hacer metástasis por vía hematogena y linfática (12). Los angiosarcomas primarios o metastásicos del sistema nervioso central son raros, con una incidencia en adultos de menos del 1 % (13). El compromiso del sistema nervioso central se manifiesta con un déficit neurológico múltiple, de rápido inicio y acompañado de hemorragia intracraneana. Cuando el angiosarcoma es cardiovascular, el sitio primario suele ser la aurícula derecha (35 % de los casos) y aparece con metástasis en el sistema nervioso central (14). En el caso descrito la paciente tenía el tumor primario en el ventrículo izquierdo, lo que constituye el primer reporte de esta localización según lo encontrado en la búsqueda de publicaciones médicas indexadas.

Según la *American Medical Association*, la incidencia general de los sarcomas cardíacos primarios es de 0,07 % (15). En general, el 25 % de los tumores cardíacos son malignos, el 95 % de los malignos son sarcomas, y el 30 % de los sarcomas corresponde a una angiosarcoma primario (16). El angiosarcoma es un tumor muy agresivo, el 80 % de los pacientes presenta

metástasis en el momento del diagnóstico y el 90 % sobrevive menos de nueve meses después del diagnóstico (17). Las lesiones metastásicas generalmente se diagnostican antes del angiosarcoma cardíaco (16).

El astrocitoma pilocítico, los endimomas, los hemangioblastomas y los xantastrocitomas pleomórficos son algunos de los tumores cerebrales primarios que pueden ser quísticos y remedar una parasitosis intestinal. En una revisión de casos de quistes encontrados mediante neuroimágenes se encontró que las metástasis quísticas cerebrales son relativamente raras, aunque la degeneración quística de las metástasis cerebrales es común en los cánceres de pulmón, seno, páncreas, riñón y en el melanoma (11).

El tratamiento convencional del angiosarcoma consiste en la resección quirúrgica, la quimioterapia y la radioterapia (18). Con frecuencia, el angiosarcoma está ubicado en órganos vitales y su resección no es factible, como en el caso de nuestra paciente (19), por lo que el tratamiento definitivo es solo paliativo (20).

El presente reporte de caso llama la atención sobre la necesidad de considerar el angiosarcoma con metástasis cerebral como diagnóstico diferencial de las lesiones quísticas en el sistema nervioso central y de incluirlo en los algoritmos de diagnóstico.

Agradecimientos

A la paciente y a su familia por facilitar todo el historial clínico y los resultados de las ayudas diagnósticas a los investigadores, así como su aprobación para publicar la información del caso.

Referencias

1. White AC Jr. Neurocysticercosis: Updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. *Annu Rev Med.* 2000;51:187-206. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.51.1.187>
2. Del Brutto OH. Neurocysticercosis. *Handb Clin Neurol.* 2014;121:1445-59. <https://doi.org/10.1177/1941874414533351>
3. Montero Y, Rojas R. Estudio retrospectivo de la seroprevalencia de neurocysticercosis en Colombia. 2006. Fecha de consulta: 6 de enero de 2019. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis170.pdf>
4. Carpio A, Agnes F, Romeo M, Pharm D, Abraham R, Fandiño J, *et al.* New diagnostic criteria for neurocysticercosis: Reliability and validity. *Ann Neurol.* 2016;80:434-42. <https://doi.org/10.1002/ana.24732>
5. Troiani C, Barbosa Lopes CC, Scardovelli CA, Nai GA. Cystic brain metastases radiologically simulating neurocysticercosis. *Sao Paulo Med J.* 2011;129:352-6. <https://doi.org/10.1590/S1516-31802011000500011>
6. Liance M, Janin V, Bresson-Hadni S, Vuitton D, Houin R, Piarroux R. Immunodiagnosis of Echinococcus infections: Confirmatory testing and species differentiation by a new commercial Western Blot. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3718-21.
7. Botero D, Restrepo M. Parasitosis humana. Tercera edición. Medellín: Editorial Corporación para Investigaciones Biológicas; 2005. p. 719.
8. Flores AA, Rodríguez P. Estandarización de la prueba de ELISA para el inmunodiagnóstico de hidatidosis humana empleando antígenos de producción local. *Gac Med Bol* 2006;29:5-10.
9. Duishanbai S, Jiafu D, Guo H, Liu C, Liu B, Aishalong M, *et al.* Intracranial hydatid cyst in children: Report of 30 cases. *Childs Nerv Syst.* 2010;26:821-7. <https://doi.org/10.1007/s00381-009-1008-2>
10. Imperato A, Consales A, Ravegnani M, Castagnola E, Bandettini R, Rossi A. Primary hydatid cyst of the brain in a child: A case report. *Pol J Radiol.* 2016;81:578-82. <https://doi.org/10.12659/PJR.898619>

11. Kim M, Cheok S, Chung LK, Cheok S, Ung N, Thill K, *et al*. Characteristics and treatments of large cystic brain metastasis: Radiosurgery and stereotactic aspiration. *Brain Tumor Res Treat* .2015;3:1-7. <https://doi.org/10.14791/btrt.2015.3.1.1>
12. Lin CT, Ducis K, Tucker S, Tranmer B. Metastatic cardiac angiosarcoma to the lung, spine, and brain: A case report and review of the literature. *World Neurosurg*. 2017;107:1049. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2017.08.023>
13. Jung S-H, Jung T-Y, Joo S-P, Kim HS. Rapid clinical course of cerebral metastatic angiosarcoma from the heart. *J Korean Neurosurg Soc*. 2012;51:47-50. <https://doi.org/10.3340/jkns.2012.51.1.47>
14. Vaquero J, Martínez R, Coca S, Oya S, Burgos R. Cerebral metastasis from angiosarcoma of the heart, case report. *Neurosurg*. 1990;73:633-5. <https://doi.org/10.3171/jns.1990.73.4.0633>
15. Kurian KC, Weisshaar D, Parekh H, Parekh H, Berry GJ, Reitz B. Primary cardiac angiosarcoma: Case report and review of the literature. *Cardiovasc Pathol*. 2006;15:110-2. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2005.10.003>
16. Orlandi A, Ferlosi A, Roselli M, Chairello L, Spagnoli LG. Cardiac sarcomas, an update. *J Thorac Oncol*. 2010;5:1483-9. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181e59a91>
17. Patel SD, Peterson A, Bartczac A, Lee S, Chojnowski S, Gajewski P, *et al*. Primary cardiac angiosarcoma – a review. *Med Sci Monit*. 2014;20:103-9. <https://doi.org/10.12659/MSM.889875>
18. Frota JD, Lucchese FA, Leães P, Valente LA, Viera MS, Blacher SI. Primary cardiac angiosarcoma. A therapeutical dilemma. *Arq Bras Cardiol*. 2002;78:589-91. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2002000600006>
19. Fernandes F, Soufen H, Ianni B, Arteaga E, Ramires F, Mady C. Primary neoplasms of the heart clinical and histological presentation of 50 cases. *Arq Bras Cardiol*. 2001;76:235-7. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2001000300006>
20. Jung S, Jung T, Joo S, Kim H. Rapid clinical course of cerebral metastatic angiosarcoma from heart. *J Korean Neurosurg Soc*. 2012;51:47-50. <https://doi.org/10.3340/jkns.2012.51.1.47>

Ensayo

¿Responde la Resolución 8430 de 1993 a las necesidades actuales de la ética de la investigación en salud con seres humanos en Colombia?

Julio César Mateus^{1,2,3}, María Teresa Varela^{2,4}, Diana María Caicedo^{2,5}, Nhora Lucía Arias^{2,6}, Cruz Deisy Jaramillo^{2,6}, Liliana Cristina Morales^{1,2}, Gloria Inés Palma¹

¹ Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia

² Doctorado en Salud, Escuela de Salud Pública, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia

³ Grupo iDIES, Fundación Universidad del Valle, Cali, Colombia

⁴ Grupo de Investigación en Salud y Calidad de Vida, Departamento de Sociales, Facultad de Humanidades y Ciencias Sociales, Pontificia Universidad Javeriana, Cali, Colombia

⁵ Grupo de Epidemiología y Salud Poblacional, Universidad del Valle, Cali, Colombia

⁶ Programa de Enfermería, Universidad Libre de Cali, Cali, Colombia

La verificación del cumplimiento de los principios éticos en la investigación en salud legítima su ejercicio ante la sociedad y posibilita la resolución de dilemas éticos frente a nuevos intereses y métodos de investigación.

En Colombia, la Resolución 8430 de 1993 es una de las principales pautas éticas que regulan la investigación en salud. Dado que no ha sido revisada ni actualizada desde su adopción, se hace necesario valorar su vigencia y suficiencia para abordar los potenciales dilemas éticos que se plantean actualmente en la investigación en salud en el país.

En este contexto, se detallan algunos vacíos y contradicciones, así como aspectos que requieren de una revisión profunda, a partir de una concepción amplia de las áreas y los métodos de investigación en salud.

Tras discutir las principales falencias e imprecisiones, se proponen alternativas para que la Resolución responda a las necesidades actuales del país frente a la ética en investigación en salud con seres humanos.

Palabras clave: bioética; códigos de ética; ética en investigación; revisión ética; discusiones bioéticas; ética basada en principios.

Does Resolution 8430 of 1993 respond to the current needs of ethics in health research with human beings in Colombia?

Verifying the compliance with the ethical principles of health research legitimizes its exercise in the eyes of the society and allows for the resolution of ethical dilemmas that emerge from new research interests and methods.

Resolution 8430 of 1993 is one of the main ethical guidelines governing health research on human beings in Colombia. Considering that the resolution has not been revised or updated since its promulgation it becomes necessary to evaluate its current validity and adequacy to address the potential ethical dilemmas in the existing country's health research.

Some gaps, contradictions, and aspects that require a deep review are detailed in this paper from a wide conception of health research areas and methods. After discussing the main weaknesses and inaccuracies, some alternatives are proposed to adjust the resolution to the present needs in health research with human beings.

Keywords: Bioethics; codes of ethics; ethics, research; ethical review; bioethical issues; principle-based ethics.

El descubrimiento de los experimentos llevados a cabo en seres humanos durante el régimen nazi y algunos incidentes ocurridos en la posguerra, como la exposición de prisioneros a condiciones extremas de baja presión atmosférica, supresión de oxígeno, hipotermia, tóxicos y quemaduras; la generación intencional de heridas o enfermedades tropicales para la posterior prueba de vacunas o medicamentos; la aplicación de dosis letales de medicamentos; los experimentos psicológicos; las pruebas radiactivas secretas, y el estudio Tuskegee sobre sífilis, entre otros (1-4), motivaron declaraciones mundiales mediante las cuales se estableció una serie de principios éticos frente a comportamientos socialmente inaceptables cuando se investiga con seres humanos.

Recibido: 13/02/18

Aceptado: 20/02/19

Publicado: 20/02/19

Citación:

Mateus JC, Varela MT, Caicedo DM, Arias NL, Jaramillo CD, Morales LC, *et al.* ¿Responde la Resolución 8430 de 1993 a las necesidades actuales de la ética de la investigación en salud con seres humanos en Colombia? *Biomédica.* 2019;39:448-63. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4333>

Correspondencia:

Julio César Mateus, Calle 1C N° 66B-98, Cali, Colombia
Teléfono: (572) 376 3582
julio.mateus@correounivalle.edu.co

Contribución de los autores:

Todos los autores participaron en la revisión documental, en la discusión de los hallazgos, conclusiones y recomendaciones, y en la redacción del manuscrito.

Financiación:

Los fondos para la elaboración del manuscrito fueron aportados por las instituciones participantes.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Los principios éticos son criterios de decisión, esto es, guías para definir las conductas que una comunidad científica debe considerar en torno a lo que se debe hacer y lo que no en las situaciones que enfrenta en su quehacer. Estos principios se recogen en pautas, códigos o declaraciones éticas. En la mayoría de dichas pautas, los principios éticos comunes son el respeto a las personas –también denominado autonomía personal–, la beneficencia y la justicia (4-9).

Las pautas éticas constituyen un marco de referencia para evaluar los métodos de la investigación en seres humanos antes de implementarlos y predecir los efectos que podrían tener sobre los participantes (4-9). Su aplicación busca el equilibrio entre los derechos de los participantes y los beneficios de los hallazgos científicos, y no se limita a aspectos formales referentes al consentimiento informado, como podría pensarse, sino que abarca aspectos que incluyen a los investigadores, la calidad y la pertinencia del protocolo de la investigación y el uso que se propone para los resultados, entre otros (10). Además, se orientan a prevenir la ejecución de nuevas investigaciones que no tengan en cuenta la seguridad y la libre decisión de los participantes. En ese sentido, se exige que los responsables de las decisiones, el personal de salud que hace uso de los hallazgos de la investigación y los investigadores que la generan se ciñan a dichos principios éticos básicos, y se mantenga el equilibrio entre el rigor científico y el respeto a las personas (11,12).

Para verificar que las investigaciones en seres humanos tengan en cuenta los principios éticos establecidos, se requiere que los comités de ética revisen los protocolos de investigación antes y durante su implementación para constatar la calidad científica del estudio, la probidad del financiador, el nivel de riesgo que asumirán los participantes y los procedimientos que se implementarán para minimizarlos o atenderlos. Asimismo, los comités de ética deben contribuir a salvaguardar la dignidad, los derechos, la seguridad y el bienestar de los participantes de una investigación; proporcionar una evaluación independiente, competente y oportuna de la ética de los estudios propuestos, y hacer un seguimiento regular del aspecto ético de los estudios que recibieron su aval (13). Cuando esta verificación se hace de manera independiente, se contribuye a la legitimidad de la investigación ante la sociedad en general.

Ahora bien, dados los avances científicos, las nuevas prácticas de investigación y la creciente diversidad de los métodos, han surgido nuevos dilemas éticos al aplicar los principios establecidos que exigen determinar la seguridad, la efectividad, la eficacia, la accesibilidad y la calidad de tales innovaciones (7,8,14-16). Los dilemas éticos pueden entenderse como situaciones en las que se hace presente un aparente conflicto operativo entre dos principios éticos, de tal forma que el cumplimiento de uno de ellos implica la transgresión del otro (17). Algunos dilemas éticos se relacionan con el conflicto inherente entre la atención en salud de la población y la del individuo, la comercialización de la ciencia, el papel del médico como investigador y el del sanador, la deshumanización de la ciencia, y la salvaguarda de la confidencialidad, entre otros (18,19).

Muchos de los dilemas éticos surgen en el momento de verificar y evaluar el cumplimiento de los principios éticos en los protocolos de investigación biomédica, de salud pública o de investigación en los servicios de salud (20), así como en los de la atención individual o la intervención comunitaria. No obstante, las pautas éticas hasta ahora establecidas no resuelven todos los dilemas éticos relacionados con la investigación.

Ante este dinamismo, se ha impuesto la necesidad permanente de revisar, actualizar, investigar y especificar la aplicación de estos principios en los diferentes ámbitos y en la generación de la información científica (7,8,15,21-24), lo que ha impulsado la investigación y la innovación en este campo, así como la revisión y el reforzamiento de las pautas éticas, para evitar su desactualización e insuficiencia. Además, cada vez se hace más necesaria una pedagogía que facilite la aplicación práctica de dichos principios (24-32).

Asimismo, las orientaciones nacionales frente a la investigación deben contemplar normas claras conformes con los lineamientos éticos de protección de las personas y las comunidades vulnerables (5,8) que proporcionen un marco analítico para la resolución de los dilemas éticos en el proceso de investigación en humanos (6,33).

En Colombia, además de las pautas éticas internacionales, como la Declaración de Helsinki (5), las guías del *Council for International Organizations of Medical Sciences* (CIOMS) (7-9), y la Declaración de Bioética y Derechos Humanos de la Unesco (34), los comités de ética tienen como referencia normativa para evaluar los protocolos la Resolución 8430 de 1993, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud (35), y la Resolución 2378 de 2008, en la que se adoptan las buenas prácticas clínicas para las instituciones que hacen investigaciones con medicamentos en seres humanos (36). Otro referente es la Ley 1374 de 2010, que crea el Consejo Nacional de Bioética y determina su integración, funciones, organización y financiación (37). Si bien esta ley dispuso la creación del mencionado Consejo desde el 2010, su decreto reglamentario (Decreto 384) (38) solo fue sancionado en el 2017 y actualmente continúa su proceso de conformación con los integrantes elegidos. La ausencia de este Consejo ha tenido efectos en la regulación actual de la investigación con seres humanos en Colombia, especialmente la Resolución 8430 de 1993, tal como lo analizaron en profundidad Rueda, *et al.* (39).

En un esfuerzo por aportar a este tema, recientemente el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias) adoptó la política sobre ética de la investigación, bioética e integridad científica (Resolución 0314 de 2018), en cuya formulación participaron las partes interesadas del Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (40). En dicha Resolución se presenta un diagnóstico de la situación en el país, se definen sus objetivos y alcance, sus principios y mecanismos de seguimiento y evaluación, y se propone una ruta para fomentar la reflexión en torno a la necesidad de poner la ciencia, la tecnología y la innovación a tono con los lineamientos éticos y las buenas prácticas científicas.

En la coyuntura actual, caracterizada por un acelerado incremento en el número de grupos de investigación en el país (41), por la ampliación de las áreas de investigación, la introducción de nuevos procedimientos y una mayor demanda para la evaluación de los protocolos de investigación por parte de los comités de ética de las instituciones, resulta pertinente analizar algunos vacíos de las normas que rigen la investigación en salud en Colombia, específicamente la Resolución 8430 de 1993.

Dicha Resolución incluye aspectos generales sobre administración, bioética, bioseguridad y uso de animales y participantes humanos en la investigación. Los títulos I y II, relativos a las “disposiciones generales” y “la investigación en seres humanos”, son el objeto concreto de la discusión que

se propone en el presente artículo. Dado que la Resolución rige desde 1993 y no ha sido actualizada o modificada, es necesario valorar su vigencia y su suficiencia para abordar los potenciales dilemas éticos que se plantean actualmente en la investigación biomédica y de salud pública con sus correspondientes métodos cualitativos, cuantitativos o mixtos, así como en la práctica de la salud pública (25,28,30,42,43). Asimismo, es preciso explorar los potenciales efectos de los hallazgos de esta valoración a la luz de las pautas éticas aceptadas internacionalmente.

Para ello, deben definirse, en primer lugar, algunos conceptos inherentes al tema para, posteriormente, profundizar en el análisis de la Resolución.

Marco de conceptos y principios éticos básicos

En esta aproximación al marco conceptual de la ética de la investigación en salud, deben considerarse, ante todo, las definiciones de ética y bioética.

La ética se define desde la perspectiva civil y profesional como un conjunto de normas morales que rigen la conducta de la persona en cualquier ámbito de la vida, en tanto que, desde el ámbito filosófico, se la define como la disciplina que sienta los fundamentos de los valores morales (44).

Por otra parte, la bioética se entiende como “el uso creativo del diálogo para formular, articular y, en lo posible, resolver los dilemas que plantean la investigación y la intervención sobre la vida, la salud y el medio ambiente” (44). Según la UNESCO, la bioética conlleva un análisis de las cuestiones éticas planteadas por el desarrollo de las ciencias de la vida y la tecnología, y sus aplicaciones en salud en todas sus dimensiones (34). Desde un punto de vista práctico, la bioética aborda los conflictos éticos que surgen en el desarrollo de las ciencias de la vida (45).

Investigación en salud y bioética

Es innegable la relación existente entre la investigación en diferentes áreas, incluida la salud, y el desarrollo general, y no solo económico, de una comunidad. Desde una perspectiva bioética es preciso comprender que la investigación en salud se relaciona con el desarrollo científico y tecnológico en el campo de la atención y el cuidado de la vida y la salud de una comunidad (46), pero también con el desarrollo humano. El desarrollo entendido como “la ampliación de las libertades de las personas en cuanto a su capacidad y posibilidad de alcanzar y hacer efectivas metas que son valiosas para ellas” (47), y unido a otros valores humanos como la autonomía de la persona, la igualdad y el respeto mutuo, se relaciona con la dignidad humana, concepto este central en la bioética (46).

Dado el impacto de la investigación en el desarrollo, esta se convierte en un tema de interés social por su repercusión en la vida humana, así como en un instrumento y una actividad sujetos al control político. Es por esto que la ética de la investigación debe tener en cuenta que la sociedad establece y define las conductas de quienes generan y usan los resultados de la investigación, no solo según las normas internacionales, sino también según las regulaciones nacionales que adaptan las pautas éticas a la cultura de cada comunidad (48-51). Además, la investigación debe estar regulada por el Estado para garantizar que dentro de su territorio las actividades de investigación se ajusten a los principios éticos, incorporen los intereses sociales y protejan a los individuos y las comunidades participantes.

La interacción de estas dimensiones sociales y políticas determina cómo se hace la investigación, los valores que deben considerarse en su desarrollo y cómo dichos valores influyen en las conductas que se esperan de los investigadores y de quienes usan la información (52). Es en esta interrelación que la bioética define su objeto y adquiere su sentido (53).

Actualmente, el interés de la bioética en la investigación no solo se centra en conocer cómo se hace la investigación y sus potenciales efectos sobre los participantes, sino también en el uso que le será dado al conocimiento que genera (27,54).

Ética de la generación y uso de los hallazgos científicos

En la generación de información científica en salud, se han desarrollado métodos cuantitativos y cualitativos que pueden emplearse por separado o en combinación según los objetivos que se persigan (12,55). A lo largo de los años se han suscitado expectativas y controversias en torno a la concepción de la investigación y la aplicación de sus resultados en salud. Asuntos como la investigación experimental en contextos de bajos recursos o con grupos vulnerables, los estudios multinacionales, las nuevas tecnologías en salud que pueden evaluarse, los estudios epidemiológicos, sociales y de salud pública, así como la investigación aplicada, la comunitaria y aquella que emplea métodos mixtos, han suscitado nuevas reflexiones en torno al cumplimiento de los principios éticos básicos o la evaluación de los efectos del posible uso de los hallazgos (9,21,30,42,56). Por ello, hoy las evaluaciones de los comités institucionales de ética no se limitan a valorar los protocolos de investigación de manera genérica y uniforme, sino que tienen en cuenta los métodos utilizados y la distinción entre investigación individual y colectiva, es decir, si se trata de la aplicación de los hallazgos científicos en la práctica de la atención individual en salud o de su uso en contextos colectivos.

Los principios éticos básicos

En el ámbito internacional se han adoptado diversas declaraciones sobre la integridad y la protección de los participantes en los estudios de investigación, las cuales se fundan en los principios éticos básicos universalmente aceptados por la comunidad científica (4-8). Estos principios, publicados inicialmente en el Informe Belmont en 1979 (6), fueron producto de la discusión sobre los problemas éticos de la investigación experimental llevada a cabo por la *National Commission for the Protection of Human Subjects of Biomedical and Behavioral Research*, e incluyen el respeto a las personas, la beneficencia y la justicia, tal como se definen a continuación.

El principio de respeto por las personas reconoce la capacidad de los individuos para sopesar la información ofrecida por los investigadores y decidir sobre la conveniencia de participar o no en una investigación. Incluye, además, el trato digno y la protección de la autonomía disminuida o deteriorada y la exigencia de hacer investigación biomédica científicamente válida y pertinente. El principio de beneficencia se refiere a la obligación ética de maximizar el beneficio y minimizar el daño, privilegiando el bienestar de los sujetos de la investigación frente a los intereses de la ciencia y la sociedad. Por último, el principio de justicia establece la distribución equitativa de riesgos y beneficios para quienes participan en una investigación (6).

Aspectos críticos de la Resolución 8430 de 1993

Una vez definidos los conceptos centrales, nuestro análisis se centra en los títulos I y II de la Resolución 8430 de 1993 (35), relacionados con las disposiciones generales y la investigación con seres humanos, respectivamente, y en la discusión sobre si la Resolución responde a las necesidades actuales de la ética en investigación en salud con seres humanos en Colombia. Si bien la Resolución establece requisitos para la investigación en salud, se enfoca fundamentalmente en la investigación clínica de carácter experimental, y dado que esta es solo uno de los tipos de investigación en salud, los aspectos abordados son insuficientes para otro tipo de investigaciones biomédicas y de salud pública que requieren directrices acordes con sus necesidades.

En cuanto a la investigación en salud pública, en las disposiciones generales (Título I) de la Resolución debería determinarse lo que se considera una investigación en salud pública para evitar imprecisiones. En este sentido, los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) de Estados Unidos actualizaron en el 2010 la definición de investigación en salud pública para diferenciarla de otras actividades de salud pública que no se consideran investigación (57). La definición señala que el propósito de la investigación en salud pública es desarrollar o contribuir a la generación de conocimiento para mejorar la práctica en salud pública, por lo tanto, dicho conocimiento debe poder aplicarse a la comunidad. Estas características diferencian la investigación en salud pública de las actividades encaminadas a la prevención, la detección y el control de un problema de salud, o a mejorar un programa de salud pública o los servicios de salud, ya que los beneficios de estas actividades son exclusivos para el participante y los datos recolectados son para evaluar o hacer seguimiento de un programa o servicio. Así, se establece que las actividades relacionadas con la vigilancia en salud pública, la atención de emergencias, el seguimiento y la evaluación de programas, no se consideran investigación, a pesar de que podrían generar estudios que contribuyan a generar nuevos conocimientos generalizables (57). En este sentido, es recomendable avanzar hacia una definición semejante en Colombia para orientar de forma más precisa las normas éticas de la investigación en salud pública.

Por otro lado, en el Título II se mencionan aspectos relacionados con los principios éticos; sin embargo, no se los menciona como rectores de la investigación ni se definen sus fundamentos. En el artículo 5 se enfatiza que en toda investigación deberá prevalecer el criterio del respeto a la dignidad de la persona, pero no se lo enuncia como un principio ético sino como un criterio, lo que constituye una diferencia importante, pues le da un estatus diferente. Además, se menciona la protección de los derechos y el bienestar del sujeto de estudio, pero no se hace una referencia clara y más ilustrativa de los principios de beneficencia, no maleficencia y justicia. En este sentido, sería pertinente incluir la definición de dichos principios en la Resolución para darles la importancia requerida.

Por otra parte, en el artículo 6 se establecen los criterios que deben guiar la investigación en seres humanos. En el literal f, por ejemplo, se establece que esta debe realizarse bajo la responsabilidad de una entidad de salud, directriz que restringe la investigación únicamente a los servicios de atención y es específica para los estudios en ámbitos clínicos y, por ende, coarta la posibilidad de llevar a cabo estudios en otros ámbitos como los

centros académicos, que no están dedicados a la atención de personas, los contextos comunitarios y los grupos de investigación social, entre otros, lo que podría entorpecer la conformación de redes de investigación entre grupos de diferentes sectores. Por lo tanto, es necesario que las pautas éticas nacionales también reconozcan las capacidades de investigación de instituciones que no están involucradas en la atención de personas y permitan la creación de redes de investigación interdisciplinarias, pues gran parte del conocimiento indispensable para la promoción de la salud y la prevención primaria se genera por fuera de los ámbitos hospitalarios.

Por otro lado, en el artículo 11 de la Resolución se clasifican las investigaciones según el riesgo para los participantes como sin riesgo, con riesgo mínimo y con riesgo mayor que el mínimo. La investigación sin riesgo, frente a la cual cabe mencionar que ninguna otra norma o declaración internacional la plantea, se define como aquella en que no se identifica a los participantes, o en la que no se tratan aspectos sensibles de la conducta, o en la cual se aplican técnicas de revisión documental retrospectivas, revisión de historias clínicas, entrevistas, cuestionarios y otras que no entrañan ningún tipo de riesgo para los participantes. Con esta definición se asume que el uso de la revisión documental, de cuestionarios y de entrevistas nunca pondría en riesgo el anonimato y la autodeterminación de los participantes. Otra asunción importante es que si los investigadores o revisores del protocolo de investigación consideran que los cuestionarios o entrevistas no plantean temas sensibles para los participantes, ello es suficiente para afirmar que, efectivamente, tal situación no se dará. Este planteamiento desconoce la complejidad de los procesos psicológicos que pueden darse en un entrevistado en el momento de responder a las preguntas del investigador y, por lo tanto, el riesgo de perturbarlo (58). Así, no es infrecuente que para algunos individuos un interrogante resulte sensible y para otros no lo sea, incluso preguntas sobre la identificación o que indaguen la composición familiar, aparentemente neutras, pueden despertar sensibilidades en algunas personas o en determinados contextos, con los consecuentes riesgos psicosociales (59). En este sentido, es necesario tener en cuenta la clasificación de los riesgos en los lineamientos internacionales para reconsiderar la que está vigente en Colombia.

Otro aspecto que debe considerarse a la hora de determinar el riesgo al que pueden estar expuestos los participantes de una investigación en salud, es que la Resolución 8430 responsabiliza al investigador por dicha clasificación (artículo 10), lo cual puede traducirse en una evaluación deficiente del riesgo, dado el interés de los investigadores por llevar a cabo sus proyectos. En este contexto, las normas nacionales deberían tener en cuenta lo planteado en las pautas del CIOMS (8), en las cuales se especifica que son los comités de ética los que deben evaluar el riesgo como parte integral de la ponderación requerida para establecer el equilibrio entre este y los beneficios para los participantes.

En la evaluación del riesgo, los investigadores y los comités de ética se enfrentan a decisiones y asuntos relacionados con la inclusión o la exclusión de ciertos grupos poblacionales considerados especiales. Las poblaciones especiales son aquellas en las que convergen condiciones de vulnerabilidad, dependencia, capacidad o aptitud (60).

Si bien la Resolución 8430 no incorpora el concepto de vulnerabilidad, regula la investigación en algunas poblaciones especiales, como los grupos subordinados, las personas con discapacidad y los menores de edad, así

como las mujeres embarazadas, el feto y los embriones, pero no incluye a los ancianos y a las mujeres en general, algo que en nuestro contexto podría ser pertinente. La vulnerabilidad es una de las situaciones en las que podrían estar las poblaciones especiales, pero no es necesariamente lo que las define (60). El término 'vulnerabilidad' alude a una incapacidad sustancial para proteger los propios intereses debido a impedimentos como la imposibilidad de otorgar el consentimiento informado, la falta de medios alternativos para conseguir atención médica u otros servicios de alto costo, o la pertenencia como miembro subordinado de un grupo jerárquico (7), lo que implica que están más expuestos a los riesgos y tienen menos capacidad para defenderse contra los abusos (61). Se consideran vulnerables los individuos o grupos que no pueden ejercer plenamente su autonomía, pues son relativa o absolutamente incapaces de proteger sus propios intereses y su integridad personal (62).

En cuanto a los grupos subordinados, la Resolución incluye a estudiantes, trabajadores de laboratorios y hospitales, empleados y miembros de las fuerzas armadas, internos en reclusorios o centros de readaptación social y otros grupos especiales de la población, en los que el consentimiento informado puede verse influenciado por alguna autoridad. Sin embargo, no contempla el hecho de que una justificación importante para estudiar este tipo de participantes es el interés específico en mejorar sus condiciones de vida, lo cual violaría el principio de beneficencia de estos grupos. En este sentido, la Resolución debería especificar los parámetros del proceso de obtención del consentimiento informado en estos casos y solicitar de forma explícita que se aclare cómo la investigación puede brindarles beneficios.

Con respecto a la discapacidad, la Resolución la asume como un todo, sin hacer distinción entre la física y la mental, ni considerar sus niveles. En este contexto, es importante tener en cuenta que el ejercicio de la autonomía de una persona con discapacidad participante en una investigación se verá afectada, en mayor o en menor medida, por el tipo y el grado de compromiso de su discapacidad, pues no todas las personas con discapacidad mental tienen dificultades para elegir, y no todas aquellas con discapacidad física están posibilitadas para hacerlo. En cuanto a la gradualidad de la discapacidad, se sabe que las personas no son completamente capaces o incapaces de elegir; además, el riesgo que se asume debe ser proporcional a la capacidad, ya que cuanto mayor sea este, mayor deberá ser la exigencia de capacidad (63). En consecuencia, las normas nacionales deberían contemplar, en primera instancia, si la decisión sobre la participación puede ser asumida o no por el participante mismo, o si se le delega a su representante legal. En este sentido, cuando los beneficios de la investigación son explícitos, sería necesario evaluar si una persona en situación de discapacidad tiene la capacidad suficiente para analizar y comprender los riesgos que conlleva su participación, o si dicha decisión se debe delegar en su representante legal.

Asimismo, el artículo 25 de la Resolución plantea que en los estudios con personas en condición de discapacidad, además del consentimiento informado del representante legal, deberá obtenerse la certificación de un neurólogo, un psiquiatra o un psicólogo sobre la capacidad de entendimiento, razonamiento y lógica de la persona, lo cual plantea varios aspectos problemáticos.

En primer lugar, si bien se menciona el tipo de profesionales que pueden realizar dicha evaluación, no se establece el tipo de valoración que deben hacer, ni se define explícitamente lo que debe entenderse por cada aspecto objeto de la evaluación. De hecho, las propuestas de evaluación

cognitiva reconocidas a nivel internacional señalan otro tipo de criterios. Por ejemplo, desde la perspectiva psiquiátrica se plantea la comprensión de la información sobre lo que implica participar en el estudio; el análisis de la información frente a la situación de la persona y las consecuencias de la decisión; la utilización de la información relevante para comparar las diferentes alternativas y sus consecuencias, y la comunicación adecuada de la opción elegida. Desde la perspectiva neurológica y psicológica, no deben ignorarse los sustratos biológicos de los aspectos psicológicos involucrados en la adopción de decisiones y, por lo tanto, deben evaluarse los procesos cognitivos de atención, memoria, lenguaje, percepción espacial, cálculo y comunicación, razonamiento y actividad emotiva y afectiva (63-66).

Un segundo aspecto se refiere al tipo de instrumento de medida empleado en la investigación. En torno a este aspecto, hay un debate en curso sobre cómo debe evaluarse la capacidad cognitiva, para cuya medición se utilizan pruebas neuropsicológicas, así como protocolos de evaluación de la capacidad generales y específicos, cada uno con sus alcances y limitaciones; los protocolos generales son los más aceptados y desarrollados, pues incorporan sistemas de puntuación y, en algunos casos, escenarios hipotéticos de evaluación (66).

En cualquier caso, independientemente de la clasificación que se use, la evaluación de estos aspectos es en extremo difícil. Además, el uso de los instrumentos más idóneos implica altos costos y una logística muy compleja, por lo que en la Resolución no se debería exigir dicha valoración de manera indiscriminada, pues en los casos en los que haya un diagnóstico legal de discapacidad o una razón clara para sospechar que el participante no puede tomar por sí solo la decisión de participar (63), el representante legal puede firmar. Al obviarse esta valoración, se disminuirían las exigencias financieras y logísticas de los proyectos de investigación.

Otro aspecto de la Resolución que amerita consideración es que equipara a los menores de edad con las personas discapacitadas y se establecen las mismas disposiciones para la evaluación de la capacidad cognitiva de ambos grupos. Según Ventura, *et al.* (63), en el caso de los menores de edad no debe hablarse de capacidad sino de madurez, y dicha madurez puede variar de manera importante entre culturas. Mientras que la capacidad de decisión de una persona adulta siempre se presupone, y es su incapacidad la que debe demostrarse (67), en la evaluación de la capacidad cognitiva de los menores esto se invierte, de manera que lo que debe demostrarse es si el menor tiene la capacidad, es decir, si es lo suficientemente maduro para decidir sobre su participación en una investigación (63).

Dado que actualmente el menor de edad se concibe como un sujeto activo, “se le reconoce progresivamente autonomía para gestionar y participar en los asuntos que le afectan” (68). Además, la minoría de edad no implica que los menores sean tratados como participantes incapaces, pero dado que pueden ser más vulnerables al condicionamiento de sus decisiones, en la Resolución debería incorporarse un apartado específico que se ajuste a las características especiales que demanda su participación en investigaciones con diferentes niveles de riesgo, aspecto que no se plantea, más allá de mencionar que el consentimiento informado debe ser firmado por los padres o el representante legal, y que al menor se le debe pedir su asentimiento. En la investigación con menores de edad en el país, hoy se plantea la necesidad de hacer una reflexión profunda sobre la protección de sus derechos que se refleje en las regulaciones sobre el tema.

Por otro lado, en el capítulo IV de la Resolución, se establecen las consideraciones éticas para la investigación con mujeres en edad fértil y en embarazo, consideraciones que suscitan reflexiones sobre su autonomía y el trato justo por parte de los investigadores. En primer lugar, en el artículo 29 se plantea que las mujeres en edad fértil pueden participar en estudios con un riesgo mayor que el mínimo si se certifica que no están embarazadas al inicio de la investigación o que es posible disminuir el riesgo de embarazo una vez el estudio esté en marcha, lo que es una directriz vaga por la poca información sobre la gestión de los riesgos y los beneficios de la participación, y puede limitar el acceso de esta población a los eventuales beneficios de los estudios. Históricamente, esta falta de información ha llevado a discriminar a las mujeres a la hora de participar en la investigación clínica (69), pues ha prevalecido el paternalismo. Con el ánimo de proteger la salud del feto, las mujeres quedan excluidas de los estudios, lo que ha impedido ampliar el conocimiento sobre la seguridad y los potenciales beneficios de las investigaciones en esta población.

En el artículo 30 de la Resolución se restringe la autonomía de la mujer para tomar la decisión de participar en una investigación, puesto que si está embarazada, en trabajo de parto, puerperio o lactancia, se establece que “se requiere obtener el consentimiento informado de la mujer y de su cónyuge o compañero...” y dicho consentimiento solo se podrá dispensar “en caso de incapacidad o imposibilidad fehaciente o manifiesta para proporcionarlo; porque el compañero no se haga cargo de la mujer o, bien, cuando exista riesgo inminente para la salud o la vida de la mujer, embrión, feto o recién nacido.” La Resolución debería hacer énfasis, en cambio, en que dicha decisión debe recaer principalmente en la mujer, una vez se le suministre la información suficiente para comprender los riesgos y beneficios a corto, mediano y largo plazo. Además, debe plantearse que es responsabilidad del investigador verificar que se respete la autonomía de la mujer, advirtiendo si la investigación conlleva riesgos para el embarazo y evaluando o previendo acciones que los disminuyan en caso de un potencial efecto adverso (7-9), y sin interferir en las decisiones que las participantes tomen sobre su maternidad en caso de que la investigación tenga pocos riesgos para el embarazo.

La obligación del consentimiento del cónyuge o compañero para la participación de una mujer embarazada en una investigación, se contrapone al principio de respeto a la mujer, dado que desconoce su autonomía para decidir. Si bien el padre biológico del embrión o feto es merecedor de respeto, el hecho de que se supedite la participación de una mujer a esta condición pone en cuestión su capacidad de decisión como persona. En aquellas condiciones en que la investigación esté relacionada con la salud del feto, la decisión sobre la participación en el estudio competiría tanto a la madre como al padre, pero la decisión de este último no debe estar por encima de la decisión de la mujer. Además, el artículo en mención tiene connotaciones discriminatorias cuando estipula las situaciones en las cuales se dispensaría el consentimiento del cónyuge o compañero. No es aceptable que la legislación condicione la participación de la mujer embarazada a la decisión del cónyuge. Por tal motivo, la Resolución debería incorporar pautas relativas al respeto por la autonomía de la mujer.

En este mismo artículo se contempla que el consentimiento del cónyuge puede obviarse cuando hay riesgo inminente para la salud o la vida de la mujer, el embrión, el feto o el recién nacido, planteamiento que se aplicaría a los procesos de atención clínica más que a las actividades de investigación,

pues en este caso el consentimiento se solicita antes de incorporar a la mujer al estudio, cuando aún no existe ningún riesgo inminente para la salud o la vida. En este contexto, es recomendable especificar si las pautas deben regir el desarrollo de las investigaciones, diferenciándolas claramente de las aplicables a los procesos de atención clínica.

Por su parte, en el artículo 31 se plantea que los estudios en mujeres embarazadas deberán ser precedidos por estudios en mujeres no embarazadas para demostrar su seguridad. Esta disposición de la Resolución asume que hay similitud entre la psicología y la fisiología de las mujeres, independientemente de si están embarazadas o no, algo que ha sido rebatido en la literatura especializada. En consecuencia, debe admitirse que es posible hacer estudios en mujeres embarazadas sin necesidad de hacerlos previamente en mujeres no embarazadas cuando lo que se investiga solo puede estudiarse en las primeras.

Como se mencionó anteriormente, las mujeres, especialmente las embarazadas, históricamente se han visto excluidas de las investigaciones con el argumento de que debe protegerse la salud materna y perinatal. Infortunadamente, ello ha resultado en un mal mayor, pues se las expone a intervenciones, en especial farmacológicas, cuyos beneficios o potenciales daños son desconocidos. Hoy se aducen varias razones por las cuales se debe incrementar la participación de mujeres embarazadas como sujeto de las investigaciones, entre ellas, la necesidad de desarrollar sistemas de detección temprana de riesgos y enfermedades del embarazo y de tratamientos eficaces para enfermedades propias del embarazo que aún producen morbimortalidad materna y perinatal, especialmente en mujeres de escasos recursos; así como del mejoramiento de la seguridad del feto; el manejo racional de la prescripción farmacológica para favorecer el embarazo y limitar la tendencia actual de precaución extrema en el uso de fármacos en las mujeres embarazadas, una mejor representatividad de los intereses de las mujeres embarazadas en el campo de la investigación, y un mayor acceso a los beneficios de la investigación (70). En definitiva, se requiere que el país aborde este debate y reflexione sobre cómo promover la participación de las mujeres embarazadas en la investigación y sus potenciales beneficios, manteniendo un equilibrio entre la importancia del conocimiento que se espera generar y la seguridad de madres e hijos.

Por otro lado, debe incluirse en la Resolución la clasificación de los grupos poblacionales especiales, y especificar los criterios y los procedimientos para promover evaluaciones más integrales y detalladas. La actual Resolución no contempla la participación de los adultos mayores, las personas en situación médica crítica o en coma, los enfermos terminales ni las minorías. En concordancia con los principios de justicia y de respeto, estos grupos deberían ser contemplados como sujetos de la investigación, pues los hallazgos pueden aportar a la comprensión de sus condiciones propias y a la generación de posibles beneficios a diferentes niveles. No obstante, deben aclararse aspectos como la representatividad, el consentimiento informado y el manejo de la información.

Con respecto a los tipos de estudios, si bien la Resolución no los menciona explícitamente, sí hace consideraciones relativas a la investigación cuantitativa, haciendo especial énfasis en los estudios clínicos experimentales, aunque dejando de lado los estudios observacionales (6) y cualitativos en salud (71,72), que cada vez son más frecuentes y pertinentes.

Si bien los aspectos éticos que se plantean para la investigación en general, son también aplicables a la investigación cualitativa (71), hay desafíos éticos particulares que deben tenerse en cuenta dada la complejidad que los caracteriza en términos de sus problemas, sus métodos y la divulgación de sus resultados (72). Entre estos, cabe mencionar la forma de acceder a los individuos, los grupos y las comunidades; la manera de influir sobre estos; las consideraciones de los participantes en torno a sus conceptos y significados en ambientes naturales, y el diálogo entre investigador y participante, el cual sucede en un espacio intersubjetivo de involucramiento, entre otros.

En la Resolución tampoco se contempla la investigación experimental por fuera de los escenarios clínicos (73), lo cual ha dificultado la implementación de este tipo de investigaciones que brindan conocimientos básicos para el desarrollo de programas de promoción de la salud y de prevención primaria y secundaria de la enfermedad.

Para finalizar, tampoco se establece en la Resolución un organigrama con las funciones y mecanismos de implementación, y no se señalan de manera precisa las instituciones involucradas en el cumplimiento y la supervisión de estas normas. Se espera que la creación del Consejo Nacional de Bioética, hoy en curso, favorezca la consolidación de un sistema nacional que incorpore la evaluación ética de los protocolos de investigación en seres humanos, supervise la implementación de las normas, y brinde asesoría, asistencia técnica y educación continua en los territorios. Este Consejo Nacional tendría, entonces, que encargarse de evaluar periódicamente la vigencia y la suficiencia de las normas éticas, entre ellas la Resolución 8430, para proponer actualizaciones oportunas.

Conclusiones

La Resolución 8430, que rige actualmente la investigación en salud con seres humanos en el país, se formuló en 1993 y no contempla aspectos éticos de la investigación surgidos en las últimas décadas a nivel internacional y en el contexto nacional en particular. Por ello, se hace necesaria una revisión y una actualización que permitan la reflexión y la incorporación de pautas para la aplicación de los principios y el manejo de dilemas éticos que ya han sido concertados en el ámbito internacional.

Con respecto a la suficiencia de la Resolución, es evidente que los temas que incorpora y las pautas que establece no cubren todo el espectro de la investigación en salud en seres humanos, y en algunos de los asuntos lo reglamentado es insuficiente. En este artículo se resaltan algunos vacíos y contradicciones, así como algunos aspectos que requieren de una revisión profunda, de manera que la legislación responda a las necesidades actuales de la ética en investigación en salud con seres humanos en Colombia. Se señala, asimismo, la necesidad de incorporar la definición de los principios éticos sobre los cuales debe fundamentarse la investigación; de ampliar su alcance para abordar todos los tipos de investigación en salud más allá de los de carácter experimental y las áreas de investigación más allá de la investigación clínica; de revisar aquello que se considera investigación sin riesgo; de hacer consideraciones sobre las poblaciones especiales y su autonomía para participar en las investigaciones, así como sobre los aspectos logísticos y los actores involucrados en la supervisión de las pautas éticas. Se espera que la creación del Consejo Nacional de Bioética permita avanzar en este sentido, con el fin de aportar al ejercicio de la investigación en salud en Colombia con calidad y ética.

Las normas de un país en torno a la investigación en salud deben ser suficientes para abordar los temas éticos tradicionales y aquellos emergentes, de manera que haya un soporte amplio y suficiente para la labor de los comités de ética. Para ello, sería beneficioso contar con un espacio ampliamente participativo de interacción periódica en torno a la bioética, que incorpore al Consejo Nacional de Bioética, a representantes de los comités de ética de investigación y a diferentes sectores de la sociedad civil que, desde diversas perspectivas culturales y disciplinarias, discutan la norma nacional a la luz de los dilemas éticos detectados en la revisión de los protocolos de investigación y de las actualizaciones con las pautas éticas internacionales. Dicha deliberación contribuiría a que quienes formulan las políticas públicas puedan actualizar las resoluciones pertinentes y generar indicaciones operativas para los comités de ética de la investigación de las instituciones.

Referencias

- Gamble VN. Under the shadow of Tuskegee: African Americans and health care. *Am J Public Health.* 1997;87:1773-8. <https://doi.org/10.2105/AJPH.87.11.1773>
- Riquelme H. La medicina bajo el nazismo: una aproximación histórico-cultural. Segunda parte. *Medicina UPB.* 2004;22:27-47.
- Geiderman JM. Ethics seminars: Physician complicity in the holocaust: Historical review and reflections on emergency medicine in the 21st century, Part I. *Acad Emerg Med.* 2002;9:223-31. <https://doi.org/10.1197/aemj.9.3.223>
- Tribunal Internacional de Nuremberg. Código de Nuremberg. 1947. Fecha de consulta: 30 de mayo de 2017. Disponible en: <http://www.bioeticanet.info/documentos/Nuremberg.pdf>
- Asociación Médica Mundial. Declaración de Helsinki de la AMM - Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. 2013. Fecha de consulta: 30 de mayo de 2017. Disponible en: <https://www.wma.net/es/policias-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>
- National Commission for the Protection of Human Subjects of Biomedical and Behavioral Research. Informe Belmont. Principios y guías éticas para la protección de los sujetos humanos de investigación. 1979. Fecha de consulta: 30 de mayo de 2017. Disponible en: http://www.conbioetica-mexico.salud.gob.mx/descargas/pdf/normatividad/normatinternacional/10_INTL_Informe_Belmont.pdf
- Council for International Organizations of Medical Sciences, Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud - CIOMS. Pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos. Ginebra: Programa Regional de Bioética OPS/OMS; 2002.
- Council for International Organizations of Medical Sciences, Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud - CIOMS. International ethical guidelines for epidemiological studies. Ginebra: WHO; 2008.
- Council for International Organizations of Medical Sciences, Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud - CIOMS. Pautas éticas internacionales para la investigación relacionada con la salud con seres humanos. Cuarta edición. Ginebra: OMS; 2016. p. 134.
- Lopera MM. Revisión comentada de la legislación colombiana en ética de la investigación en salud. *Biomédica.* 2017;37:577-89. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3333>
- Emanuel E. ¿Qué hace que la investigación clínica sea ética? Siete requisitos éticos. En: Lolas F, Quezada Á, editores. Pautas éticas de investigación en sujetos humanos: nuevas perspectivas. Santiago de Chile: Programa Regional de Bioética OPS/OMS; 1999. p. 83-96.
- Hek G, Moule P. Making sense of research. An introduction for health and social care practitioners. Third edition. Los Angeles: SAGE Publications; 2006. p. 34-44.
- Organización Mundial de la Salud - OMS. Guías operacionales para comités de ética que evalúan investigación biomédica. Ginebra: OMS; 2000. p. 40.
- Bayer R, Fairchild A. The genesis of public health ethics. *Bioethics.* 2004;18:473-92. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8519.2004.00412.x>
- Kottow M, Carvajal Y. Bioética y precaución. Santiago de Chile: Universidad de Chile; 2011. p. 36.

16. da Silva PR, Barrera García RC, da Silva R. Aspectos éticos y legales de la investigación científica en Brasil. *Acta Bioeth.* 2010;16:61-9. <https://doi.org/10.4067/S1726-569X2010000100009>
17. McConnell T. Moral Dilemmas. The Stanford Encyclopedia of Philosophy. 2002. Fecha de consulta: 20 de octubre de 2018. Disponible en: <https://plato.stanford.edu/entries/moral-dilemmas/#ConMorDil>
18. Gómez AI, Latorre C, Carreño JN. Dilemas éticos en las relaciones entre la industria farmacéutica y los profesionales de la salud. *Persona y Bioética.* 2007;11:23-38.
19. Grinyer A. Ethical dilemmas in nonclinical health research from a UK perspective. *Nurs Ethics.* 2001;8:123-32. <https://doi.org/10.1177/096973300100800205>
20. Koski G. Rethinking research ethics, again: Casuistry, pronesis, and the continuing challenges of human research. *Am J Bioeth.* 2010;10:37-9. <https://doi.org/10.1080/15265161.2010.526444>
21. Hyder AA, Rattani A, Krubiner C, Bachani AM, Tran NT. Ethical review of health systems research in low- and middle-income countries: A conceptual exploration. *Am J Bioeth.* 2014;14:28-37. <https://doi.org/10.1080/15265161.2013.868950>
22. Meneu R. Aspectos y cuestiones de la salud pública susceptibles de una particular y específica consideración ética. En: Segura A, editor. *Ética y Salud Pública.* Barcelona: Fundació Víctor Grífols i Lucas; 2012. p. 10-33.
23. Lolas F, Quezada A, Rodríguez E. *Investigación en Salud. Dimensión ética.* Chile: CIED, Universidad de Chile; 2006.
24. O'Neill P. The evolution of research ethics in Canada: Current developments. *Can Psychol.* 2011;52:180-4. <https://doi.org/10.1037/a0024391>
25. Noreña A, Alcaraz-Móreno N, Rojas J, Rebolledo-Malpica D. Aplicabilidad de los criterios de rigor y éticos en la investigación cualitativa. *Aquichan.* 2012;12:263-74. <https://doi.org/10.5294/aqui.2012.12.3.5>
26. Bell N. Research ethics code of practice: Summary version. *Child Geogr.* 2008;6:95-108. <https://doi.org/10.1080/14733280701791975>
27. Rhodes R. Rethinking research ethics. *Am J Bioeth.* 2010;10:19-36. <https://doi.org/10.1080/15265160590900678>
28. Simpson B. Ethical moments: Future directions for ethical review and ethnography. *J R Anthropol Inst.* 2011;17:377-93. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9655.2011.01685.x>
29. Tulchinsky T, Jennings B, Viehbeck S. Integrating ethics in public health education: The process of developing case studies. *Public Health Rev.* 2015;36:1-10. <https://doi.org/10.1186/s40985-015-0002-3>
30. Tulchinsky TH, Flahault A. Why a theme issue on public health ethics? *Public Health Rev.* 2012;34:7-17. <https://doi.org/10.1007/BF03391653>
31. Alfano SL, Piedrahíta LE, Uscinski KT, Palma GI. Strengthening capacity for human research protections: A joint initiative of Yale University, CIDEIM, and UniValle. *IRB.* 2012;34:16-20.
32. Barchi F, Kasimatis Singleton M, Merz JF. Fostering IRB Collaboration for Review of International Research. *Am J Bioeth.* 2014;14:3-8. <https://doi.org/10.1080/15265161.2014.892168>
33. Sachs B. Going from principles to rules in research ethics. *Bioethics.* 2011;25:9-20. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8519.2009.01744.x>
34. UNESCO. Declaración universal sobre Bioética y Derechos Humanos. 2005. Fecha de consulta: 20 de octubre de 2018. Disponible en: http://portal.unesco.org/es/ev.php-URL_ID=31058&URL_DO=DO_TOPIC&URL_SECTION=201.html
35. Ministerio de Salud. Resolución 8430 de 1993. Fecha de consulta: 30 de mayo de 2017. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/RESOLUCION-8430-DE-1993.PDF>
36. Ministerio de la Protección Social. Resolución 2378 de 2008. Fecha de consulta: 30 de mayo de 2017. Disponible en: https://www.invima.gov.co/images/pdf/medicamentos/resoluciones/resolucion2378_2008.pdf
37. Congreso de la República. Ley 1374 de 2010. Fecha de consulta: 30 de mayo de 2017. Disponible en: http://www.secretariasenado.gov.co/senado/basedoc/ley_1374_2010.html

38. Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación - Colciencias. Decreto 384 de 2017. Fecha de consulta: 20 de agosto de 2017. Disponible en: <http://www.colciencias.gov.co/sites/default/files/upload/reglamentacion/decreto384-2017.pdf>
39. Rueda G, Monsore N. Impacto de la ausencia del Consejo Nacional de Bioética Colombiano. *Rev Latinoam Bioet.* 2015;2:144-55.
40. Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – Colciencias. Resolución 0314 de 2018. Política de Ética de la Investigación, Bioética e Integridad Científica. 2018. Fecha de consulta: 20 de agosto de 2018. Disponible en: http://www.colciencias.gov.co/sites/default/files/upload/reglamentacion/resolucion_0314-2018.pdf
41. Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – Colciencias. Grupos de Investigación, fortalecimiento y consolidación. Informe proceso y resultados convocatoria 640 de 2014. Bogotá: Colciencias; 2014. Fecha de consulta: 5 de octubre de 2015. Disponible en: http://legadoweb.colciencias.gov.co/programa_estrategia/grupos-de-investigaci-n-fortalecimiento-y-consolidaci-n
42. Pace TN. *Bioethics. Issues and Dilemmas.* New York: Nova Science Publishers, Inc.; 2010. p. 55-73.
43. Weed D. Precaution, prevention, and public health ethics. *J Med Philos.* 2004; 29:313-32. <https://doi.org/10.1080/03605310490500527>
44. Lolas F, Quezada A, Rodríguez E. Investigación en salud: dimensión ética. Centro Interdisciplinario de Estudios en Bioética (CIEB), Universidad de Chile; 2006. Fecha de consulta: 15 de octubre de 2018. Disponible en: <http://www.saludcapital.gov.co/Capacitaciones%20%20Comit%20de%20etica%20para%20la%20Investigacin/6%20Sesi%C3%B3n%2016%20julio%202014/INV.%20EN%20POBLACIONES%20VULNERABLES-LATINAMERICA.pdf>
45. Hardy AE, Roveló JE. Moral, ética y bioética. Un punto de vista práctico. *Medicina e Investigación.* 2015;3:79-84. <https://doi.org/10.1016/j.mei.2015.02.007>
46. Tealdi JC. *Diccionario latinoamericano de bioética.* Bogotá: UNESCO - Red Latinoamericana y del Caribe de Bioética. Bogotá, D.C.: Universidad Nacional de Colombia; 2008. p. 348-71.
47. Sen A. *Development as freedom.* Oxford: Oxford University Press; 1999.
48. Shore N, Brazauskas R, Drew E, Wong KA, Moy L, Baden AC, *et al.* Understanding community-based processes for research ethics review: A national study. *Am J Public Health.* 2011;101:S359-64. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2010.194340>
49. Pfeiffer ML. Responsabilidad social en la investigación con humanos. *Derecho PUCP.* 2012;69:225-44.
50. Burns KEA, Magyarody N, Jiang D, Wald R. Attitudes and views of the general public towards research participation. *Intern Med J.* 2013;43:531-40. <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2011.02433.x>
51. Dresser R. Research subjects' voices: The missing element in research ethics. *Anaesth Intensive Care.* 2015;43:297-9.
52. Lagos-Bossman K, Rodríguez-Yunta E. Ciencia e investigación. En: Lolas F, Quezada A, Rodríguez E, editores. *Investigación en Salud Dimensión Ética.* Chile: CIED, Universidad de Chile; 2006. p. 25-38.
53. Álvarez J, Lolas F, Outomuro D. Introducción. En: Lolas F, Quezada A, Rodríguez E, editores. *Investigación en Salud Dimensión Ética.* Chile: CIED, Universidad de Chile; 2006. p. 15-23.
54. Bozeman B, Slade C, Hirsch P. Ethics in research and practice. *Am J Public Health.* 2009;99:1549-56. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2008.152389>
55. Pineda E, de Alvarado E. *Metodología de la investigación.* 3ª edición. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 2008.
56. Chameau J-L, Ballhaus WF, Lin HS. *Emerging and readily available technologies and national security — A framework for addressing ethical, legal, and societal issues.* Washington, DC: The National Academies Press; 2014.
57. Department of Health and Social Sciences. Distinguishing public health research and public health nonresearch, Policy 557. 2010. Fecha de consulta: octubre 5 de 2018. Disponible en: <https://www.cdc.gov/od/science/integrity/docs/cdc-policy-distinguishing-public-health-research-nonresearch.pdf>

58. Tourangeau R, Rips L, Rasinski K. *The Psychology of Survey Response*. Cambridge: Cambridge University Press; 2000. p. 230-88.
59. Aday L. *Designing and conducting health surveys*. 2nd edition. San Francisco: Jossey-Bass; 1996. p. 222-60.
60. Montoya G. Poblaciones especiales en investigación biomédica. En: Lolas F, Quezada A, Rodríguez E, editores. *Investigación en salud: dimensión ética*. Centro Interdisciplinario de Estudios en Bioética (CIEB). Chile: Universidad de Chile; 2006.
61. Morais TC, Monteiro PS. Los conceptos de vulnerabilidad humana y la integridad individual para la bioética. *Rev Bioet*. 2017;25:311-9. <https://doi.org/10.1590/1983-80422017252191>
62. Macklin R. Bioethics, vulnerability, and protection. *Bioethics*. 2003;17:472. <https://doi.org/10.1111/1467-8519.00362>
63. Ventura T, Navío M, Álvarez I, Baón B. La evaluación de la capacidad y sus problemas. *EIDON*. 2014;41:12-27.
64. Franco J. El problema de la evaluación de la capacidad. *El Notario del Siglo XXI*. 2014. Fecha de consulta: 5 de diciembre de 2015. Disponible en: <http://www.elnotario.es/index.php/hemeroteca/revista-58/opinion/opinion/3922-el-problema-de-la-evaluacion-de-la-capacidad>
65. Gajardo J. La necesidad de una regulación legal de la investigación amigable a la demencia y otros trastornos cognitivos. *Rev Chil Neuropsiquiatr*. 2015;53:59-61. <https://doi.org/10.4067/S0717-92272015000100008>
66. Simón-Lorda P. La capacidad de los pacientes para tomar decisiones: una tarea todavía pendiente. *Rev Asoc Esp Neuropsiq*. 2008;28:325-48. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872016001000014>
67. Brugué JC. *Guía Investigación Clínica 2013: aspectos éticos y jurídicos a tener en cuenta en estudios clínicos en fase II y III*. Girona: Documenta Universitaria; 2012.
68. Oliva F. El menor maduro ante el derecho. *EIDON*. 2014;41:28-52.
69. Brandon AR, Shivakumar G, Lee SC, Inrig SJ, Sadler JZ. Ethical issues in perinatal mental health research. *Curr Opin Psychiatry*. 2009;22:601-6. <https://doi.org/10.1097/YCO.0b013e3283318e6f>
70. Lyerly AD, Little MO, Faden RR. Pregnancy and clinical research. *Hastings Cent Rep*. 2008. p. c3.
71. Botto A. Dimensión ética de la investigación cualitativa. *Revista GPU*. 2011;7:354-6.
72. Mondragón-Barrios L. Ética de la investigación psicosocial. *Salud Mental*. 2007;30:25-31.
73. Smith P, Morrow R, Ross D. *Field trials of health interventions: A toolbox*. Third edition. Oxford: Oxford University Press; 2015. p. 480.

Artículo original

Evaluación del daño oxidativo y por metilación del ADN de pintores expuestos ocupacionalmente a solventes orgánicos y pinturas

Elizabeth Londoño-Velasco^{1,2}, Fabián Martínez-Perafán^{1,3}, Silvio Carvajal^{††}, Felipe García-Vallejo⁴, Luz Stella Hoyos-Giraldo¹

¹ Grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia

² Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Facultad de Ciencias de la Salud, Pontificia Universidad Javeriana, Cali, Colombia

³ Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

⁴ Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia

† Fallecido el 29 de enero de 2015

Introducción. La exposición a solventes orgánicos y pinturas se ha asociado con efectos genotóxicos y mayor riesgo de neoplasias. Sin embargo, aún no se ha caracterizado bien el tipo de daño que esta exposición induce en el ADN humano, ni los mecanismos por los cuales se genera. Uno de los grupos con mayor exposición a dichos solventes y pinturas son los pintores de automóviles del sector informal que trabajan sin adecuadas prácticas de seguridad ocupacional.

Objetivo. Determinar el daño oxidativo y por metilación del ADN de linfocitos de pintores de automóviles expuestos a solventes orgánicos y pinturas.

Materiales y métodos. Se analizaron linfocitos aislados de sangre periférica de 62 pintores y 62 sujetos no expuestos mediante el ensayo cometa de gran eficiencia acoplado a las enzimas Fpg y AlkA. Las categorías de daño en el ADN evaluadas fueron el daño basal (sin enzimas), el daño oxidativo y el daño por metilación, y el parámetro de medición, el porcentaje de ADN en la cola.

Resultados. El porcentaje de ADN en la cola fue mayor en el grupo expuesto con respecto al no expuesto ($p < 0,05$). En el grupo expuesto, dicho porcentaje fue mayor en la categoría de daño oxidativo comparado con la del basal (16,50 Vs. 12,87; $p < 0,001$), en tanto que en el daño por metilación no se encontraron diferencias significativas (14,00 Vs. 12,87; $p > 0,05$).

Conclusión. La exposición a solventes orgánicos y pinturas se asoció con el aumento de las lesiones oxidativas del ADN de los linfocitos de pintores de automóviles, tales como la producción de 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) y otros productos formamidopirimidina, los cuales se consideran considerablemente mutagénicos.

Palabras clave: exposición ocupacional; daño del ADN; ensayo cometa; ADN-formamidopirimidina glicosilasa; N-glucosil hidrolasas.

Evaluation of oxidative and methylating DNA damage in painters occupationally exposed to organic solvents and paints

Introduction: The exposure to organic solvents and paints has been associated with genotoxicity and a greater risk of neoplasms. However, the type of DNA damage induced in humans by the exposure to these compounds, which would help explain the mechanisms of their genotoxicity, is still not fully characterized. Due to inadequate practices of occupational safety, car painters in the informal sector are a highly exposed group to organic solvents and paints.

Objective: To identify the oxidative and methylating damage in the DNA of lymphocytes of car painters exposed to organic solvents and paints.

Materials and methods: Isolated peripheral blood lymphocytes from 62 painters and 62 unexposed subjects were analyzed by the modified high-throughput comet assay with the Fpg and AlkA enzymes. The categories used for the evaluation of the DNA damage were basal damage (without enzymes), oxidative and methylating damage. The measurement parameter used to establish the damage was the percentage of DNA in the tail.

Results: The percentage of DNA in the tail was higher in the exposed group compared to the unexposed group ($p < 0.05$). In the exposed group, this percentage was higher in the oxidative damage category than the baseline (16.50 vs. 12.87; $p < 0.001$), whereas methylating damage did not show significant differences (14.00 vs. 12.87; $p > 0.05$).

Recibido: 05/02/18

Aceptado: 23/10/18

Publicado: 09/11/18

Citación:

Londoño-Velasco E, Martínez-Perafán F, Carvajal S, García-Vallejo F, Hoyos-Giraldo LS. Evaluación del daño oxidativo y por metilación del ADN de pintores expuestos ocupacionalmente a solventes orgánicos y pinturas. *Biomédica*. 2019;39:464-77.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.4289>

Correspondencia:

Elizabeth Londoño-Velasco, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Facultad de Ciencias de la Salud, Pontificia Universidad Javeriana, seccional Cali, Calle 18 N° 118-250, Cali, Colombia
Teléfono: (572) 321 8200, extensión 8811
elivelasco@javerianacali.edu.co

Contribución de los autores:

Elizabeth Londoño-Velasco y Fabián Martínez-Perafán: planificación y ejecución de la investigación; adquisición, análisis e interpretación de los datos; escritura del manuscrito

Silvio Carvajal: análisis estadístico de los datos e interpretación de los resultados

Felipe García-Vallejo y Luz Stella Hoyos-Giraldo: planificación y supervisión de la investigación, interpretación de los resultados y revisión crítica del manuscrito

Financiación:

Este estudio fue financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Cauca (Popayán, Colombia) por medio de la VII Convocatoria de Apoyo a Proyectos de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación y Creación Artística.

Conflicto de intereses:

Ninguno.

Conclusion: In this study, exposure to organic solvents and paints was associated with an increase in oxidative lesions in the DNA of car painters' lymphocytes, such as the production of 8-oxodG and other formamidopyrimidine products which are considered highly mutagenic.

Keywords: Occupational exposure; DNA damage, comet assay; DNA-formamidopyrimidine glycosylase; N-glycosyl hydrolases.

En las últimas décadas, las estrategias para abordar la problemática de la exposición a xenobióticos han cambiado. Actualmente es de gran interés para la comunidad científica evaluar, no solo las fuentes y niveles de exposición ambiental, sino también los efectos biológicos tempranos en el material genético, para detectar y alertar sobre los factores de riesgo de los problemas de salud asociados con la exposición ocupacional o ambiental a tales xenobióticos.

Los pintores de automóviles son una población expuesta a metales pesados —plomo, cromo y aluminio, entre otros—, a pigmentos residuales de monómeros de plástico contenidos en las pinturas y a mezclas complejas de solventes orgánicos (hidrocarburos aromáticos y alifáticos, cetonas, alcoholes y ésteres, entre otros) (1-3).

El diluyente (*thinner*) es la mezcla compleja de solventes orgánicos más usada entre los pintores de automóviles; en estudios *in vitro* se ha demostrado que este compuesto tiene efectos genotóxicos en linfocitos humanos (4).

En otros estudios *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que mediante el proceso de biotransformación de los solventes orgánicos, se generan especies reactivas de oxígeno y radicales libres que afectan significativamente a los lípidos, las proteínas y el ADN (5,6).

En los estudios de biomonitorio que emplean biomarcadores de efecto temprano, como la frecuencia de alteraciones cromosómicas, los micronúcleos y el daño del ADN determinado mediante el ensayo cometa, también se ha demostrado el potencial genotóxico de los solventes orgánicos y, en consecuencia, el riesgo de desarrollar cáncer por la exposición ocupacional crónica a ellos (7-11).

Sin embargo, son muy pocas las investigaciones en las que se ha caracterizado el tipo de daño del ADN (oxidativo o por metilación) de células humanas de individuos expuestos a estos compuestos, lo que permitiría dilucidar el mecanismo de acción de los solventes orgánicos y de las pinturas sobre el material genético, además de evidenciar posibles deficiencias en los mecanismos de reparación del ADN, lo cual constituye un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades asociadas con la inestabilidad genética.

El ensayo cometa es una prueba citogenética molecular cuya sensibilidad permite detectar pequeños daños genéticos (roturas de cadena, sitios lábiles al álcali y sitios de reparación por escisión incompleta de bases) que se presentan como daño basal en células normales o como resultado de la exposición a pequeñas dosis de agentes genotóxicos (12,13).

Para incrementar la sensibilidad y la especificidad de esta prueba, se han incorporado tratamientos enzimáticos con glucosilasas (enzimas de la reparación del ADN), las cuales convierten las lesiones específicas en roturas de cadena que incrementan la intensidad de la cola del cometa (indicador de un aumento de daño en el ADN) en comparación con los controles no tratados con tales enzimas, y permiten estimar la frecuencia de este tipo de lesión en el ADN.

Algunas de las enzimas utilizadas en el ensayo cometa, son la formamidopirimidina ADN glucosilasa (Fpg), que remueve bases oxidadas (7,8-dihidro-8-oxo-2'-deoxiguanina [8-oxoGua]) u otros productos formamidopirimidina (4,6-diamino-5-formamidopirimidina [FapydAde] y 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina [FapydGua]), así como la 3-metiladenina-ADN glucosilasa II (AlkA), la cual remueve bases metiladas (3-metiladenina [3-MeAde] y 7-metilguanina [7-MeGua]) y genera sitios sin purina que, posteriormente, son transformados en roturas de cadena cuando el ADN es sometido a un pH alcalino durante la electroforesis (14,15).

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue estimar el daño oxidativo y por metilación del ADN de los linfocitos de pintores de automóviles expuestos a solventes orgánicos y a pinturas mediante el ensayo cometa de gran eficiencia con la inclusión de las enzimas Fpg y AlkA, respectivamente.

Materiales y métodos

Grupos de estudio

Se hizo un estudio de corte transversal y analítico para comparar grupos expuestos y no expuestos. El muestreo fue no probabilístico (por conveniencia) e incluyó a hombres saludables en un rango de edad entre los 18 y los 55 años, todos residentes en el departamento del Cauca, Colombia. Se excluyeron del estudio a los fumadores, a quienes manifestaron padecer infecciones agudas virales o bacterianas en el momento de la toma de la muestra, a quienes tenían antecedentes de cáncer y a quienes habían sido sometidos a quimioterapia o algún tipo de radiación con fines terapéuticos o diagnósticos durante los tres meses previos a la toma de la muestra de sangre.

Con base en estos criterios de inclusión y exclusión, se seleccionaron 62 pintores en talleres de latonería y pintura de automóviles del sector informal y a 62 individuos no expuestos ocupacionalmente a solventes y pinturas. Los individuos del grupo expuesto habían estado laborando como pintores por cinco años o más. Los individuos de ambos grupos se emparejaron por edad (± 2 años) y estrato socioeconómico.

El estudio fue evaluado y avalado por los comités de ética de la Universidad del Cauca y de la Universidad del Valle siguiendo los lineamientos de las directrices de la Declaración de Helsinki (16), el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS), la Organización Mundial de la Salud (OMS) (17) y la Resolución 8430 de 1993 de Colombia (18).

Todos los participantes del estudio fueron informados sobre los objetivos, la metodología y los riesgos de la investigación antes de obtener su consentimiento informado. Asimismo, se elaboró la anamnesis con sus datos demográficos, antecedentes ocupacionales, estado de salud y estilo de vida.

Muestras de sangre y aislamiento de linfocitos

Las muestras de sangre se tomaron a lo largo de tres meses (junio a agosto), en horas de la mañana (entre 9:00 am y 12:00 m) del tercer día de una semana de actividad laboral. De cada participante se obtuvieron 5 ml de sangre periférica por venopunción en tubos vacutainer con ácido etilendiaminotetraacético disódico (EDTA). Los linfocitos fueron aislados con Ficoll-Histopaque™ (1077-1 Sigma), y el sedimento celular se suspendió de nuevo en 1,5 ml de medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640™ (R-8758 Sigma).

Controles positivo y negativo

El correcto desarrollo de la metodología del ensayo y la eficiencia de cada corrida electroforética se comprobaron usando controles internos (positivo y negativo). Para establecer dichos controles, se hicieron cultivos primarios y el tratamiento *in vitro* de linfocitos aislados de sangre periférica de un donador voluntario de 23 años, saludable y no fumador.

Se cultivaron aproximadamente $3,0 \times 10^4$ linfocitos por pozo con medio RPMI 1640 (pH 7,2), con suplemento de L-glutamina, antibiótico, fitohemaglutinina y suero bovino fetal en microplatos de 96 pozos durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Para el control interno positivo, se usaron linfocitos tratados con 40 µM de peróxido de hidrógeno y H₂O₂ (CAS 7722-84-1™, Sigma, 30 % v/v) durante 30 minutos, y 2,26 mM de metanosulfonato de etilo (EMS) (CAS 62-50-0™, Sigma, >99 %) durante 2 horas a 37 °C. Como control negativo se utilizaron linfocitos suspendidos en solución tampón de fosfato salino (PBS, P-3813-10™, Sigma).

Viabilidad celular

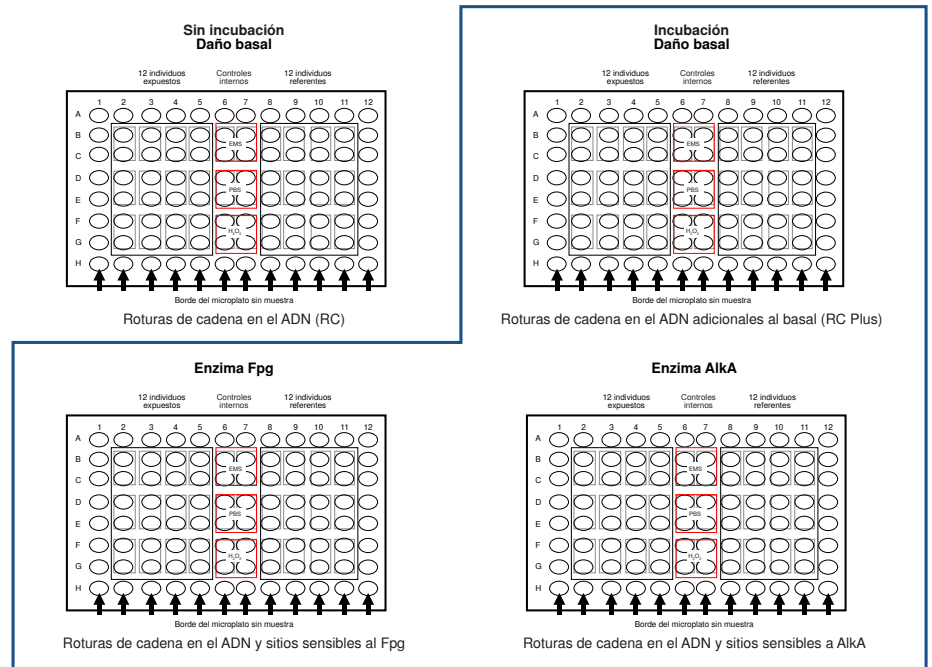
Los linfocitos de las muestras de la población de estudio y de los controles internos (positivo y negativo), se contaron y se analizaron para determinar la viabilidad celular mediante la prueba de exclusión con el colorante vital azul de tripano (T-6146™, Sigma) al 0,1 % en PBS. Los linfocitos aislados de los participantes presentaron una viabilidad mayor de 96 % y la de los cultivados como controles internos estuvo entre 80 y 90 % (no se incluyen los datos).

Ensayo cometa de gran eficiencia y digestión enzimática

Para el ensayo cometa (electroforesis de células individuales), se empleó el método alcalino estándar de Singh, *et al.* (19) con algunas modificaciones para la versión de gran eficiencia (20,21) y la inclusión de las enzimas glucosilasas Fpg (ADN-formamidopirimidina glucosilasa, Cat. M0240L™, New England Bio-Labs) y AlkA (ADN-alquiladenina glucosilasa humana, Cat. M0313™, New England Bio-Labs) (12,14). Con dichas modificaciones se buscaba simplificar el proceso incrementando el número de muestras que se procesaban en cada montaje experimental sin alterar la capacidad de detección del daño del ADN en cada muestra. Por ello, estas modificaciones fueron validadas (calibración) en el Laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca antes de aplicarlas en los montajes experimentales concretos (no se incluyen los datos).

Para obtener los microgeles, se embebieron aproximadamente 10.000 linfocitos por individuo en 90 µl de agarosa de bajo punto de fusión (A-9414™, Sigma) al 0,5 %. De esta suspensión celular se tomaron 5 µl que fueron depositados sobre una película Gelbond Film™ (Lonza Copenhagen ApS, Denmark, 54727). En cada Gelbond Film™ de 16 x 11 cm se depositaron muestras duplicadas de individuos expuestos y no expuestos (dos microgeles por individuo), al igual que las muestras de los controles internos positivo y negativo. Para el ensayo con incubación enzimática, se prepararon cuatro Gelbond Film™ idénticas por montaje experimental, las cuales se etiquetaron como 'daño basal', 'solución tampón de reacción', 'Fpg' y 'AlkA' (figura 1).

Después de la solidificación de los microgeles, las cuatro Gelbond Film™ se sumergieron en una solución de lisis (cloruro de sodio, NaCl 2,5 M, S-9625™, Sigma), 100 mM de Na₂EDTA (E-5134™, Sigma), Tris 10 mM (T-3253™, Sigma); tritón X-100 (K-0320™, Sigma) al 1 % (v/v), y



H₂O₂: peróxido de hidrogeno; EMS: etilmetanosulfonato; PBS: solución tampón fosfato salino

Figura 1. Distribución de los microgeles sobre las películas Gelbond Film™. Se dispusieron dos microgeles por cada individuo de estudio y cuatro por cada control interno, para un total de 60 microgeles.

dimetilsulfóxido (DMSO) (D-8779™, Sigma) al 10 % (v/v) y pH 10, y se mantuvieron en la oscuridad durante toda la noche a 4 °C.

La película Gelbond Film™ sin tratamiento enzimático ni incubación se etiquetó como daño basal y sirvió como valor de referencia correspondiente a la totalidad de daños del ADN, incluidas las roturas de cadena simples o dobles y las originadas por sitios lábiles al álcali o sitios de reparación incompleta, sin hacer distinción entre ellas, en tanto que las Gelbond Film™ etiquetadas como 'solución tampón de reacción', 'Fpg' y 'AlkA' se sometieron a incubación y tratamiento enzimático para revelar las roturas de cadena y las lesiones específicas en el ADN (8-oxodG, FapydAde, FapydGua, 3-meA y 7-meG).

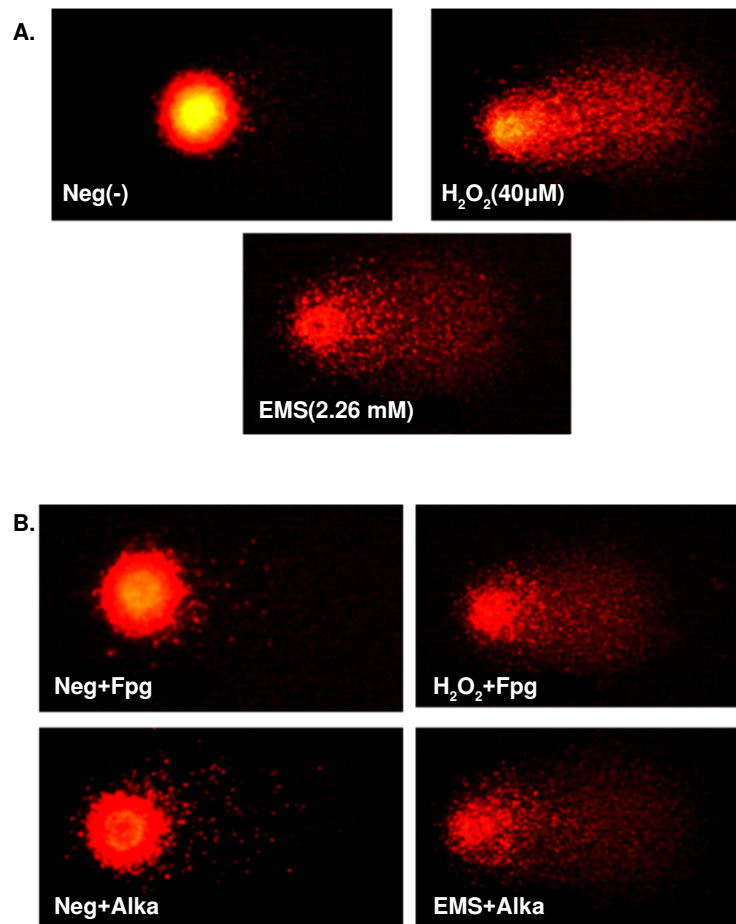
Antes de la incubación, las tres Gelbond Film™ se lavaron con solución tampón de reacción enzimática (HEPES 70 mM, 83264™, Sigma), KCl 0,1 M (P9541™, Sigma), 2 mM de Na₂EDTA (E-5134™, Sigma) y 0,26 mg/ml de SBA (Fermenta™s), y pH de 7,6. Posteriormente, se aplicaron por goteo alícuotas de 50 µl de la solución tampón de reacción o de las enzimas 'glucosilasas' Fpg y AlkA con una concentración de 1 µg/ml sobre cada uno de los microgeles en las Gelbond Film según su etiqueta y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C.

Para la desnaturalización y el 'desenrollamiento' del ADN, las cuatro Gelbond Film™ se sumergieron en solución tampón alcalina (NaOH 10 N, S-8045™, Sigma; 200 Mm de Na₂EDTA, E-5134™, Sigma, pH 13,3) durante 40 minutos y, luego, se sometieron a electroforesis durante 30 minutos a 28 V y 300 mA (0,9 V/cm).

Los microgeles se lavaron con una solución tampón de neutralización (Tris 0,4 M, T-3253™, Sigma, pH 7,5) para retirar la solución alcalina y,

posteriormente, se deshidrataron con etanol absoluto frío. Las condiciones de tratamiento enzimático y de electroforesis se consideraron óptimas y válidas solo si los controles internos positivo y negativo daban los resultados esperados después de la electroforesis (figura 2).

Para el registro de las pruebas cometa, los microgeles se colorearon con bromuro de etidio (20 $\mu\text{g/ml}$, E-7637TM, Sigma). Se hizo un recuento sistemático aleatorio de 50 nucleoides por cada microgel (100 nucleoides por individuo), con una amplificación de 400X en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400TM). Las imágenes se analizaron con el programa Komet 6TM (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, Reino Unido). El daño en el ADN de cada participante se determinó mediante el porcentaje de ADN en la cola y aquellos nucleoides indicadores de muerte celular (*clouds*) se excluyeron del registro.



EMS: etilmetanosulfonato

Figura 2. Imágenes de nucleoides de los linfocitos humanos empleados como controles negativos (suspendidos en PBS) y positivo (con 40 μM de H_2O_2 y 2,26 mM de EMS) en cada una de las condiciones de tratamiento enzimático. **A.** Nucleoides sin incubación enzimática. **B.** Nucleoides con incubación enzimática (Fpg y Alka). Microscopio de fluorescencia, bromuro de etidio, 400X

Análisis estadístico de los datos

Para obtener los valores del daño oxidativo o del daño neto por metilación se calculó la diferencia entre el valor de porcentaje de ADN en la cola obtenido tras la digestión enzimática (con Fpg o Alka) y el valor adicional en la ruptura de cadenas. Este valor adicional se determinó mediante la

diferencia entre los valores del porcentaje de ADN en la cola obtenido después de la incubación con solución tampón de reacción y aquel obtenido sin incubación enzimática (daño basal).

Los datos se analizaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar la normalidad y la de Levene para la homogeneidad de las varianzas. Las características demográficas se analizaron mediante la prueba t de Student y la de ji al cuadrado (χ^2). Para determinar las diferencias entre las categorías de daño del ADN y los grupos de estudio, se utilizaron las pruebas de Kruskal-Wallis y la U de Mann-Whitney. La categoría de daño basal se consideró como el valor de referencia para comparar la frecuencia del daño oxidativo o del daño neto por metilación.

La relación entre el daño del ADN, la edad (años) y el tiempo de exposición (años en el oficio de pintor) se analizó mediante la prueba de correlación de Spearman, en tanto que la relación entre el daño en el ADN y el consumo de alcohol se analizó mediante la prueba U de Mann-Whitney.

El nivel crítico de rechazo de la hipótesis nula se estableció con valores de p de 0,05 o menos, y todos los datos se procesaron y analizaron con el programa estadístico SPSS™, versión 13 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Resultados

En el cuadro 1 se resumen las principales características demográficas de los grupos de estudio. La edad promedio en años y el consumo de alcohol en los dos grupos fueron similares, sin diferencias significativas ($p=1,0$).

En la anamnesis los pintores manifestaron estar expuestos a una gran variedad de solventes como *thinner*, aguarrás, varsol, acetonas, gasolina, resinas (epóxido y poliuretano) y pinturas a base de solventes, entre otros. También, reportaron que su carga laboral variaba mucho (6 a 12 horas por día) y que el área de trabajo era poco ventilada.

Ninguno de los pintores usaba equipo de protección personal (guantes de silicona, traje protector y gafas) para evitar el contacto dérmico con los solventes y las pinturas. Solo el 37,1 % manifestó usar equipo de protección respiratoria, específicamente máscaras con filtros de carbón activado. No obstante, la mayoría

Cuadro 1. Características demográficas de los grupos de estudio

Características	No expuestos n=62	Expuestos n=62	P
Edad (años)			
Media \pm EE	40,35 \pm 1,15	39,87 \pm 1,11	0,76 ^a
Rango (mínimo-máximo)	18-55	19-54	
Tiempo de exposición (años)			
Media \pm EE	NA	19,10 \pm 1,054	NA
Rango (mínimo-máximo)	NA	5-38	NA
Uso de equipo de protección personal de las vías respiratorias, n (%)			
No usa	NA	39 (62,9)	NA
Usa	NA	23 (37,1)	NA
Consumo de alcohol, n (%)			
No consumen	15 (24,2)	15 (24,2)	1,000 ^b
Consumo (entre bajo a moderado)	47 (75,8)	47 (75,8)	

EE: error estándar; NA: no aplica

^a Prueba t de Student

^b Prueba de ji al cuadrado

de estos pintores reportaron que no cambiaban los filtros con frecuencia, por lo que esta variable no se tomó en cuenta para la estadística inferencial.

Con respecto al consumo de alcohol, el 75,8 % de los individuos reportó que era de bajo a moderado, y se catalogaron como consumidores sociales.

En el cuadro 2 se presentan los valores de la mediana y los rangos intercuartílicos del porcentaje estimado de ADN en la cola de los linfocitos de los individuos de ambos grupos de estudio para cada una de las categorías de daño analizadas. Los resultados evidenciaron una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,005$) en los porcentajes de ADN en la cola entre el grupo expuesto y el no expuesto en las tres categorías de daño evaluadas. Se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) dentro de los grupos entre el daño oxidativo neto y el daño basal (valor de referencia). Por el contrario, no se registraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el daño neto por metilación y el daño basal.

Cuadro 2. Porcentaje de ADN en la cola estimado en linfocitos de individuos de los grupos de estudio según las categorías de daño en el ADN

Categorías de daño en el ADN	Porcentaje de ADN en la cola		p
	No expuestos (n=62) Mediana; RIC	Expuestos (n=62) Mediana; RIC	
Daño basal	7,81; 12,92	12,53; 20,89	<0,001 ^b
Daño oxidativo neto	12,87; 53,83 ^c	16,50; 46,49 ^c	0,005 ^b
Daño neto por metilación	7,73; 45,01	14,00; 37,77	<0,001 ^b
p	<0,001 ^a	<0,001 ^a	

RIC: rango intercuartílico

^a Significación estadística de las categorías de daño en el ADN (daño basal, daño oxidativo neto y daño neto por metilación) según la prueba de Kruskal-Wallis

^b Significación estadística de cada categoría de daño mediante la prueba U de Mann-Whitney en los grupos de estudio (no expuesto y expuesto)

^c Diferencias significativas ($p < 0,001$) halladas mediante la prueba U de Mann-Whitney entre las categorías de daño oxidativo neto en el ADN con respecto al daño basal (sin enzimas) para cada grupo de estudio

Los resultados de la correlación de Spearman revelaron que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre la edad y los valores de daño basal ($p=0,535$, $r=0,056$) y del daño neto por metilación del ADN ($p=0,104$, $r=0,147$), en tanto que sí se observó una asociación estadísticamente significativa entre el daño oxidativo neto y la edad ($p < 0,039$, $r=0,185$).

En cuanto al tiempo de exposición (años) a los solventes orgánicos, no se observó una asociación estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre esta variable y las tres categorías de daño en el ADN.

Discusión

La exposición ocupacional a solventes orgánicos es un problema de salud pública a nivel mundial (22) y, según el Ministerio de la Protección Social de Colombia, también es de interés nacional (23). En las últimas décadas, en diversos estudios se ha evidenciado que el 80 % de todos los cánceres son causados por la exposición ambiental u ocupacional a agentes químicos, físicos o biológicos (24,25). Según la *International Agency for Research on Cancer* (IARC), hay suficiente información de que los solventes orgánicos que emplean los pintores de automóviles tienen potencial cancerígeno (26). En estudios de cohorte, se ha encontrado que los pintores tienen riesgo ocupacional de desarrollar cáncer de páncreas, pulmón y vejiga (27-29).

En cuanto a los efectos genotóxicos de estos solventes empleados en ese oficio, se ha observado que, en condiciones como las analizadas en el presente estudio, la exposición a solventes orgánicos y pinturas induce un incremento significativo ($p=0,005$) de la frecuencia de la ruptura de cadenas de ADN y de la presencia de purinas oxidadas (8-oxodG, FapydAde y FapydGua). Estos resultados permiten suponer que el daño del ADN se genera durante el metabolismo celular de los solventes orgánicos por el ingreso al organismo de los metales pesados contenidos en las pinturas, los cuales incrementan el estrés oxidativo y la producción de especies reactivas de oxígeno y de radicales libres en los individuos expuestos.

Estos datos respaldan la hipótesis de que el estrés oxidativo tendría un papel relevante en los efectos biológicos causados por los solventes orgánicos como causa principal o secundaria en la etiología de las enfermedades neurodegenerativas y el cáncer, entre otras (28).

Los pintores de automóviles en Cauca utilizan mezclas complejas de solventes orgánicos, principalmente *thinner* (7). Esta mezcla contiene diferentes compuestos orgánicos, entre los que se destacan el tolueno y el etilbenceno, los cuales tienen una alta afinidad con el sistema enzimático del metabolismo de xenobióticos; ya en el organismo y en las rutas metabólicas menores, el tolueno es biotransformado en metilhidroquinona y metilbenzoquinona, en tanto que el etilbenceno es convertido en etilhidroquinona y 4-etilcatecol. Durante los procesos de reducción-oxidación (*redox*), estas quinonas generan sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y los radicales hidroxilo ($\bullet OH$) (30-32); estos, por ser fuertemente electrofílicos, interactúan con los centros nucleofílicos de las bases nitrogenadas y con los enlaces carbono-hidrógeno de las pentosas, e inducen ruptura de cadenas en el ADN y en los sitios sin purina (33), lo que se evidencia por el incremento del porcentaje de ADN en la cola en linfocitos de individuos expuestos.

Por otro lado, cuando lesiones como las 8-oxodG, FapydGua y FapydAde no se reparan eficientemente mediante la escisión de bases, desestabilizan la conformación electrónica del ADN, alteran las propiedades de apareamiento de las bases nitrogenadas y generan una mayor frecuencia de mutaciones del tipo de transversión GC→AT, AT→GC (33-35). El aumento en la frecuencia de este tipo de mutaciones en los genes que regulan procesos celulares (como la replicación del ADN, la progresión del ciclo celular y el control de los puntos de chequeo, la segregación de cromosomas y la reparación del ADN), conlleva la inestabilidad genómica característica de las células tumorales. Por lo tanto, los pintores de automóviles podrían considerarse una población en mayor riesgo de desarrollar cáncer u otras enfermedades degenerativas asociadas con alto grado de estrés oxidativo.

En este estudio el daño oxidativo del ADN concordó con el reportado por Martínez-Alfaro, *et al.*, quienes mediante la aplicación del ensayo cometa alcalino convencional y empleando la enzima Fpg detectaron un incremento significativo del daño del ADN de linfocitos de ratas expuestas a vapores de *thinner*, así como en las concentraciones de malondialdehído (producto de la peroxidación lipídica), y una reducción significativa en la expresión de glutatión (antioxidante no enzimático), biomarcadores ampliamente usados para determinar el estrés oxidativo (6).

En este estudio, el tratamiento con la enzima AlkA no reveló daño por metilación en los grupos de estudio. Es bien sabido que la mayoría de los

agentes xenobióticos inducen daño oxidativo del ADN con mayor frecuencia y, en menor proporción, daño por metilación (15,36). Sin embargo, no se puede afirmar de forma concluyente que el material genético no haya sufrido este tipo de daño, puesto que los pintores de automóviles no solo están expuestos a productos aromáticos, como el tolueno y el etilbenceno, sino también a productos alifáticos metilados, como el 2,3-dimetilhexano (componente del *thinner*) o acetilados, que pueden ser transportados durante los procesos metabólicos e intervenidos por la acetil coenzima A, con lo que podrían liberar grupos metilo que se unen covalentemente al ADN.

De hecho, en un estudio de Hoyos, *et al.*, se registró un incremento significativo de la metilación de regiones promotoras de genes específicos (GSTP1, p16(INK4a) y APC) de células epiteliales de la vejiga en pintores de automóviles, comparados con los individuos no expuestos (37). En este estudio, también se observó que, entre los individuos expuestos, aquellos con más años de exposición presentaban un incremento en la frecuencia de metilación.

Teniendo en cuenta que son relativamente pocos los estudios en los que se han evaluado los efectos de la exposición a solventes orgánicos y pinturas en la metilación del ADN, sería conveniente seguir investigando los mecanismos de este tipo de daño en individuos expuestos a solventes orgánicos y pinturas, ya que la hipermetilación del ADN puede tener un papel determinante en la aparición de tumores en los humanos por el aumento de la proliferación celular, la acumulación de metabolitos genotóxicos en las células y una mayor inestabilidad genómica y, por lo tanto, en el desarrollo de enfermedades como el cáncer.

Por otro lado, en el presente estudio, se encontró una asociación estadísticamente significativa ($p < 0,039$) entre el daño oxidativo neto y la edad. Según Moller, el daño del ADN aumenta con la edad, lo que es entendible dado que, a mayor edad, menor es la eficiencia de la reparación del ADN (38). En un estudio de Mladinic, *et al.*, en una población saludable no expuesta a agentes químicos, se reportó un incremento significativo del daño del ADN de linfocitos de individuos ancianos ($69,3 \pm 3,7$ años) con respecto a individuos jóvenes ($38,9 \pm 8,8$ años), lo que evidencia la influencia positiva de la edad en los resultados obtenidos mediante el ensayo cometa (39). Por el contrario, no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la edad de los participantes del estudio y el daño basal (sin enzimas) ($p = 0,535$) y el daño neto causado por metilación ($p = 0,104$) en el ADN.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios, en los cuales no se encontró una asociación significativa entre la edad y el daño en el ADN inducido por los solventes orgánicos (40-42), aunque también hay otros estudios de biomonitorio en poblaciones expuestas ocupacionalmente a solventes orgánicos que indican que el envejecimiento es un factor que influye en la expresión del daño en el ADN estimado mediante el ensayo cometa (2,3). Por ello, la asociación positiva entre la edad y el daño en el ADN cuantificado mediante dicho ensayo es controversial y aún está en discusión.

Es importante mencionar que la mayoría de los estudios de biomonitorio genético mediante el ensayo cometa convencional, no han analizado la influencia de la edad en la expresión del daño del ADN y se han limitado exclusivamente a describir esta variable en la información demográfica de la población objeto de estudio (estadística descriptiva). Por ello, es necesario que en futuros estudios se incluyan grupos numerosos de individuos de todas las edades, con el fin de establecer el efecto de la edad en la expresión del daño del ADN evaluado mediante el ensayo cometa.

En cuanto al tiempo de exposición, no se encontró una asociación significativa ($p > 0,05$) entre este factor (determinado en años) y los diferentes tipos de daño del ADN (oxidativo y por metilación) en los linfocitos de los pintores de automóviles, resultados que coinciden con los obtenidos en algunos estudios consultados (40,43), aunque en otros se ha señalado que, cuanto mayor es el tiempo de exposición ocupacional a solventes orgánicos y pinturas, mayor es la expresión acumulada del daño en el ADN estimado mediante el ensayo cometa (2,42,44).

Por lo tanto, los resultados relacionados con la variable del tiempo de exposición son controversiales y se requiere de un mayor análisis en estudios de biomonitorio genético para obtener información más concluyente sobre este tipo de asociación. Otro aspecto importante con respecto al análisis de esta variable es que, al tratarse de una población de pintores del sector informal de la industria, no hay certeza sobre el tiempo que llevaban dedicados de forma continua al oficio. Por ello, la información recolectada no permitió determinar los grupos o los tiempos de exposición de forma exacta para establecer relaciones directas con el tiempo de exposición crónica.

Una de las principales razones para el uso del ensayo cometa en este estudio fue la coherencia encontrada entre el incremento en los valores del daño del ADN en dicho ensayo y el incremento de la frecuencia de daños cromosómicos expresados en las células, como los micronúcleos y las alteraciones cromosómicas, los cuales son biomarcadores validados internacionalmente como predictores de riesgo de cáncer (45,46) en poblaciones expuestas a solventes orgánicos (42,47-49). Por lo tanto, el ensayo cometa de gran eficiencia puede considerarse una herramienta útil para los programas de vigilancia epidemiológica ocupacional, y para identificar y reducir los riesgos de la exposición ocupacional a solventes orgánicos y pinturas.

Por último, en este estudio se observó una asociación entre la exposición a mezclas complejas de solventes orgánicos y pinturas, y el daño oxidativo del ADN de linfocitos de sangre periférica. Además, el aumento del grado de daño oxidativo en el grupo expuesto podría sugerir que en estos individuos la reacción a la reparación del ADN no es tan eficiente como en los individuos del grupo no expuesto, específicamente mediante el mecanismo de escisión de bases, que permite reparar lesiones producidas por la oxidación de bases como las 8-oxodG, FapydGua y FapydAde.

Estos resultados alertan sobre el potencial genotóxico de los solventes orgánicos y las pinturas y el posible riesgo laboral de los pintores de desarrollar enfermedades crónicas como el cáncer y las neurodegenerativas. Asimismo, debe hacerse un llamado para que se diseñen estrategias de vigilancia epidemiológica ocupacional que permitan medir y mitigar los efectos adversos de dicha exposición, puesto que la eliminación del riesgo es poco probable en este sector informal de la industria. Sería conveniente, igualmente, motivar el desarrollo de actividades de capacitación para concientizar a los trabajadores sobre los riesgos de la exposición a agentes genotóxicos y la necesidad de cumplir con las mínimas medidas de protección personal en los espacios laborales y de adoptar hábitos saludables (autocuidado).

Aunque en este estudio se pudo recabar información preliminar sobre la interacción entre los genes y el ambiente en la población de pintores de automóviles, los resultados deben validarse en estudios prospectivos que proporcionen resultados más sólidos sobre dicha interacción.

En futuros estudios, también debería considerarse el aumento del tamaño de la muestra y hacer un muestreo probabilístico. Asimismo, deberán emplearse 'biomarcadores' de la vulnerabilidad individual, por ejemplo, la detección de polimorfismos en los genes del metabolismo o la reparación del ADN, que permitan una mejor comprensión de los mecanismos del daño y de la eficiencia de su reparación. También, deben establecerse los grados de exposición ambiental, como una buena alternativa para determinar el grado y el tipo de agentes genotóxicos a los que están expuestos los pintores.

Sin embargo, los muestreos en el área de trabajo no siempre resultan representativos de la exposición en esta población debido a la intermitencia de los trabajadores en el oficio y el lugar de trabajo, por lo que sería conveniente analizar marcadores de exposición biológica en sangre u orina, así como biomarcadores del efecto.

Agradecimientos

A los participantes en el estudio por su buena disposición para vincularse; a la tecnóloga Luz Mérida Lemos Mera, por su invaluable colaboración en la toma de muestras de sangre, y a los biólogos Virginia Mosquera y Jeison Perafán, por su excelente e invaluable contribución durante la ejecución del estudio.

Referencias

1. International Agency for Research on Cancer. Painting, firefighting, and shiftwork: Occupational exposure as a painter. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. p. 42-394.
2. Moro AM, Brucker N, Charao M, Bulcao R, Freitas F, Baierle M, *et al.* Evaluation of genotoxicity and oxidative damage in painters exposed to low levels of toluene. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2012;746:42-8. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.02.007>
3. Cassini C, Calloni C, Bortolini G, García S, Dornelles M, Henriques J, *et al.* Occupational risk assessment of oxidative stress and genotoxicity in workers exposed to paints during a working week. *Int J Occup Environ Health.* 2011;24:308-19. <https://doi.org/10.2478/s13382-011-0030-2>
4. Londoño-Velasco E, Hidalgo-Cerón V, Escobar-Hoyos LF, Hoyos-Giraldo LS. Assessment of genomic damage and repair on human lymphocytes by paint thinner *in vitro*. *Toxicol Mech Methods.* 2014;24:243-9. PubMed PMID: 24236478. <https://doi.org/10.3109/15376516.2013.862893>
5. Costa C, De Pasquale R, Silvari V, Barbaro M, Catania S. *In vitro* evaluation of oxidative damage from organic solvent vapours on human skin. *Toxicol In Vitro.* 2006;20:324-31. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.08.007>
6. Martínez-Alfaro M, Palma-Tirado L, Sandoval-Zapata F, Carabez-Trejo A. Correlation between formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg)-sensitive sites determined by a comet assay, increased MDA, and decreased glutathione during long exposure to thinner inhalation. *Toxicol Lett.* 2006;163:198-205. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.10.021>
7. Hoyos-Giraldo LS, Carvajal S, Cajas-Salazar N, Ruiz M, Sánchez-Gómez A. Chromosome aberrations in workers exposed to organic solvents: Influence of polymorphisms in xenobiotic-metabolism and DNA repair genes. *Mutat Res.* 2009;666:8-15. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.03.003>
8. Testa A, Festa F, Ranaldi R, Giachelia M, Tirindelli D, De Marco A, *et al.* A multi-biomarker analysis of DNA damage in automobile painters. *Environ Mol Mutagen.* 2005;46:182-8. <https://doi.org/10.1002/em.20147>
9. Aksoy H, Yilmaz S, Celik M, Yuzbasioglu D, Unal F. Genotoxicity study in lymphocytes of offset printing workers. *J Appl Toxicol.* 2006;26:10-5. <https://doi.org/10.1002/jat.1098>
10. Villalba-Campos M, Ramírez-Clavijo SR, Sánchez-Corredor MC, Rondón-Lagos M, Ibáñez-Pinilla M, Palma RM, *et al.* Quantification of cell-free DNA for evaluating genotoxic damage from occupational exposure to car paints. *J Occup Med Toxicol.* 2016;11:33. <https://doi.org/10.1186%2Fs12995-016-0123-8>

11. Londoño-Velasco E, Martínez-Perafán F, Carvajal-Varona S, García-Vallejo F, Hoyos-Giraldo LS. Assessment of DNA damage in car spray painters exposed to organic solvents by the high-throughput comet assay. *Toxicol Mech Methods*. 2016;26:238-42. <https://doi.org/10.3109/15376516.2016.1158892>
12. Collins A, Duthie S, Dobson V. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*. 1993;14:1733.
13. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, *et al.* Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35:206-21.
14. Collins AR, Dusinska M, Horska A. Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. *Acta Biochim Pol*. 2001;48:611-4.
15. Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Rykala J, Kolacinska A, *et al.* Basal, oxidative and alkylative DNA damage, DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer. *Mutat Res*. 2004;554:139-48. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.04.001>
16. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. *Bull World Health Organ*. 2001;79:373-4.
17. World Health Organization. Standards and operational guidance for ethics review of health-related research with human participants. Geneva: World Health Organization; 2011. p. 55.
18. Ministerio de Salud. Resolución Número 8430 de 1993 (4 de octubre). Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Santafé de Bogotá: Ministerio de Salud; 1993. p. 19.
19. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175:184-91.
20. Azqueta A, Gutzkow KB, Priestley CC, Meier S, Walker JS, Brunborg G, *et al.* A comparative performance test of standard, medium- and high-throughput comet assays. *Toxicol In Vitro*. 2013;27:768-73. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.12.006>
21. Gutzkow KB, Langleite TM, Meier S, Graupner A, Collins AR, Brunborg G. High-throughput comet assay using 96 minigels. *Mutagenesis*. 2013;28:333-40. <https://doi.org/10.1093/mutage/get012>
22. Lynge E, Anttila A, Hemminki K. Organic solvents and cancer. *Cancer Causes Control*. 1997;8:406-19.
23. Ministerio de Salud y Protección Social, Instituto Nacional de Cancerología. Plan Nacional para el control del Cáncer en Colombia, 2012. Fecha de consulta: 14 de septiembre de 2018. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INCA/plan-nacional-control-cancer.pdf>
24. Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA, editors. Environmental and chemical carcinogenesis, 2004: Elsevier. p. 473-486.
25. Clapp RW, Howe GK, Jacobs MM. Environmental and occupational causes of cancer: A call to act on what we know. *Biomed Pharmacother*. 2007;61:631-9. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2007.08.001>
26. International Agency for Research on Cancer. Chemical agents and related occupations: Occupational exposure as a painter. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Lyon: International Agency for Research on Cancer IARC. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans; 2012. p. 509 - 39.
27. Brown LM, Moradi T, Gridley G, Plato N, Dosemeci M, Fraumeni JF. Exposures in the painting trades and paint manufacturing industry and risk of cancer among men and women in Sweden. *J Occup Environ Med*. 2002;44:258-64.
28. Ramanakumar AV, Parent ME, Richardson L, Siemiatycki J. Exposures in painting-related occupations and risk of lung cancer among men: Results from two case-control studies in Montreal. *Occup Environ Med*. 2011;68:44-51. <https://doi.org/10.1136/oem.2009.049957>
29. Alguacil J, Porta M, Malats N, Kauppinen T, Kogevinas M, Benavides FG, *et al.* Occupational exposure to organic solvents and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. *Carcinogenesis*. 2002;23:101-6.
30. Murata M, Tsujikawa M, Kawanishi S. Oxidative DNA damage by minor metabolites of toluene may lead to carcinogenesis and reproductive dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;261:478-83. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1041>

31. Midorikawa K, Uchida T, Okamoto Y, Toda C, Sakai Y, Ueda K, *et al.* Metabolic activation of carcinogenic ethylbenzene leads to oxidative DNA damage. *Chem Biol Interact.* 2004;150:271-81. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.09.020>
32. Gaikwad NW, Bodell WJ. Formation of DNA adducts in HL-60 cells treated with the toluene metabolite p-cresol: A potential biomarker for toluene exposure. *Chem-Biol Interact.* 2003;145:149-58.
33. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair, and disease. *Cancer Lett.* 2012;327:26-47. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.016>
34. Bruner SD, Norman D, Verdine GL. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature.* 2000;403:859. <https://doi.org/10.1038/35002510>
35. Kino K, Sugiyama H. Possible cause of G --> C transversion mutation by guanine oxidation product, imidazolone. *Chem Biol.* 2001;8:369-78.
36. Arabski M, Klupinska G, Chojnacki J, Kazmierczak P, Wisniewska-Jarosinska M, Drzewoski J, *et al.* DNA damage and repair in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa cells. *Mutat Res.* 2005;570:129-35. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.10.006>
37. Hoyos-Giraldo LS, Escobar-Hoyos LF, Saavedra-Trujillo D, Reyes-Carvajal I, Muñoz A, Londoño-Velasco E, *et al.* Gene-specific promoter methylation is associated with micronuclei frequency in urothelial cells from individuals exposed to organic solvents and paints. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2016;26:257-62. <https://doi.org/10.1038/jes.2015.28>
38. Moller P. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutat Res.* 2006;612:84-104. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2005.10.001>
39. Mladinic M, Kopjar N, Milic M, Dasovic AB, Huzak M, Zeljezic D. Genomic instability in a healthy elderly population: A pilot study of possible cytogenetic markers related to ageing. *Mutagenesis.* 2010;25:455-62. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq027>
40. Fracasso ME, Doria D, Carrieri M, Bartolucci GB, Quintavalle S, De Rosa E. DNA single- and double-strand breaks by alkaline- and immuno-comet assay in lymphocytes of workers exposed to styrene. *Toxicol Lett.* 2009;185:9-15. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.11.010>
41. Sul D, Lee D, Im H, Oh E, Kim J, Lee E. Single strand DNA breaks in T- and B-lymphocytes and granulocytes in workers exposed to benzene. *Toxicol Lett.* 2002;134:87-95.
42. Roma-Torres J, Teixeira JP, Silva S, Laffon B, Cunha LM, Méndez J, *et al.* Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. *Mutat Res.* 2006;604:19-27. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.12.005>
43. Sardas S, Omurtag GZ, Tozan A, Gul H, Beyoglu D. Evaluation of DNA damage in construction-site workers occupationally exposed to welding fumes and solvent-based paints in Turkey. *Toxicol Ind Health.* 2010;26:601-8. <https://doi.org/10.1177/0748233710374463>
44. Zhu CQ, Lam TH, Jiang CQ. Lymphocyte DNA damage in bus manufacturing workers. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2001;491:173-81.
45. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, *et al.* An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis.* 2006;28:625. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl177>
46. Bonassi S, Hagmar L, Stromberg U, Montagud AH, Tinnerberg H, Forni A, *et al.* Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Res.* 2000;60:1619-25.
47. Heuser VD, Erdtmann B, Kvitko K, Rohr P, da Silva J. Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. *Toxicology.* 2007;232:235-47. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.01.011>
48. Martino-Roth M, Viegas J, Roth D. Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. *Genet Mol Res.* 2003;2:410-7.
49. Pereira da Silva VH, Gomes de Moura CF, Spadari-Bratfisch RC, Ribeiro DA. Cytogenetic biomonitoring of peripheral blood and oral mucosa cells from car painters. *Toxicol Mech Methods.* 2012;22:497-501. <https://doi.org/10.3109/15376516.2012.680621>

Original article

Knowledge, attitudes, and practices about dengue among pupils from rural schools in an endemic area in Colombia

Diana Sarmiento-Senior¹, María Inés Matiz¹, Juan Felipe Jaramillo-Gómez¹, Víctor Alberto Olano¹, Sandra Lucía Vargas¹, Neal Alexander², Audrey Lenhart³, Thor Axel Stenström⁴, Hans Jörgen Overgaard⁵

¹ Instituto de Salud y Ambiente, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia

² MRC Tropical Epidemiology Group, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, United Kingdom

³ Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, United Kingdom

⁴ Institute for Water and Wastewater Technology, Durban University of Technology, Durban, South Africa

⁵ Faculty of Science and Technology, Norwegian University of Life Sciences, Ås, Norway

Introduction: Dengue is a public health problem in tropical and subtropical regions of the world. Studies on dengue in rural areas are scarce since the disease is considered mainly urban.

Objective: To determine the knowledge (K), attitudes (A) and practices (P) of dengue in an endemic area in Colombia.

Materials and methods: We conducted a cross-sectional study with 515 pupils (7-16 years old) in 34 rural schools in Anapoima and La Mesa municipalities during 2011. Each KAP category was evaluated independently by a scoring system and then categorized into high, medium or low.

Results: Pupils recognized knowledge variables such as the symptoms (fever, bone pain), transmission route (mosquito bites), and mosquito breeding sites (uncovered water tanks, solid waste). Average scores on attitude were high in both municipalities indicating a well-developed perception of disease severity. Seeking treatment in medical centers and self-medication for fever management and the use of mosquito net and space-spraying of insecticides were the most frequently identified practices.

Discussion: This is the first KAP dengue study performed in a rural area in Colombia and as such it contributes to the understanding of dengue perceptions by the inhabitants of these areas. It showed a medium level of knowledge about dengue and a lower level of preventive practices in pupils from rural schools. It also showed that pupils considered space-spraying as crucial for vector control. The presence of the vector in rural areas of the country underlines the need to improve surveillance and education to more effectively control the vector and promote prevention methods including community participation.

Keywords: Dengue/prevention & control; health knowledge attitudes practice; rural health; ethnology; Colombia.

Received: 25/01/18

Accepted: 25/10/18

Published: 17/12/18

Citation:

Sarmiento-Senior D, Matiz MI, Jaramillo-Gómez JF, Olano VA, Vargas SL, Alexander N, *et al.* Knowledge, attitudes, and practices about dengue among pupils from rural schools in an endemic area in Colombia. *Biomédica*. 2019;39:478-90. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4255>

Corresponding author:

Diana Marcela Sarmiento-Senior, Instituto Salud y Ambiente, Universidad El Bosque, Calle 131 N° 7A-68, Bogotá, D.C., Colombia
Telephone: (571) 648 9000; extension 1164 and 1181
sarmientodiana@unbosque.edu.co

Author contributions:

Diana Sarmiento: Data collection, analysis and interpretation and manuscript drafting
María Inés Matiz, Juan Felipe Jaramillo-Gómez, Víctor Alberto Olano and Sandra Lucía Vargas: Data collection and manuscript drafting
Neal Alexander and Hans Jörgen Overgaard: Data analysis and interpretation and manuscript drafting
Audrey Lenhart and Thor Axel Stenström: Revision of the manuscript, final approval of the version, and accountability for all aspects of the work
All authors participated in the design of the study.

Funding:

The Research Council of Norway (Grant 201349), *Universidad El Bosque*, and the *Lazos de Calandaima* Foundation supported financially the project.

Conflicts of interest:

The authors have declared that no competing interests exist.

Conocimientos, actitudes y prácticas sobre dengue en estudiantes de escuelas rurales de un área endémica en Colombia

Introducción. El dengue es un problema de salud pública en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Los estudios sobre la enfermedad en áreas rurales son escasos debido a que se presenta principalmente en los núcleos urbanos.

Objetivo. Determinar los conocimientos, las actitudes y las prácticas sobre el dengue en un área rural endémica en Colombia.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio transversal con 515 estudiantes, entre los 7 y los 16 años de edad en 34 escuelas rurales de los municipios de Anapoima y La Mesa en el 2011. Cada categoría se evaluó por separado con un puntaje clasificado como alto, medio o bajo.

Resultados. Los estudiantes reconocieron los síntomas (fiebre, dolor de huesos), la ruta de transmisión (picadura de mosquitos) y los criaderos (depósitos de agua destapados, residuos sólidos). El promedio de los puntajes de actitudes fue alto en ambos municipios, lo que indica que percibían la gravedad del dengue. Las prácticas más frecuentes de tratamiento de la fiebre fueron la consulta médica y la automedicación, en tanto que los métodos de control más frecuentes fueron el uso de mosquiteros y el rociamiento con insecticidas.

Discusión. Este es el primer estudio de conocimientos, actitudes y prácticas sobre el dengue en un área rural de Colombia. Los resultados contribuyen a entender las percepciones de la enfermedad en sus habitantes y evidenciaron niveles medios de conocimiento y puntuaciones bajas en cuanto a las prácticas entre los estudiantes de las escuelas rurales. Los estudiantes consideraron que la fumigación es importante para el

control del vector. La presencia del mosquito en áreas rurales del país resalta la necesidad de mejorar la vigilancia y la educación para lograr un control efectivo del vector y promover métodos de prevención que incluyan la participación comunitaria.

Palabras clave: dengue/prevención y control; conocimientos, actitudes y práctica en salud; salud rural; etnología; Colombia.

Dengue is a serious and increasing public health problem in tropical and subtropical regions of the world (1) with approximately 3,900 million people at risk of infection (2), around 390 million annual infections, and 96 million presenting clinical signs (3). In 2010, Colombia experienced its worst-ever epidemic with more than 157,000 reported cases and 217 deaths. Anapoima and La Mesa municipalities in the department of Cundinamarca were classified as very high-risk areas based on their number of cases (4).

Among the determinants of the increasing incidence are the simultaneous circulation of four serotypes (5), the lack of continuous water supply, poor or inadequate solid waste management, unplanned urban growth, internal displacement, and poverty (4). Besides, the situation is worsened by climatic variations such as El Niño and La Niña phenomena that can make conditions more favorable for the main vectors *Aedes aegypti* and *A. albopictus* and disease transmission (4). Recently, the circulation of other viruses such as chikungunya and Zika may have contributed to an underestimation of dengue through misdiagnosis due to their similarity of symptoms and the high cost of laboratory tests that hinder their application in every case (6).

Although the World Health Organization (WHO) recommended a vaccine as part of an integrated dengue prevention and control strategy (7), there is no dengue vaccination program in Colombia. The only preventive measures available are based on mosquito control, which is highly dependent on community participation (8). In recent decades, this has been increasingly recognized and acknowledged in studies on integrated dengue interventions linking local human populations and their practices on prevention and vector control (9,10).

The need to determine how knowledge about the disease is related to prevention practices has been highlighted in community and school guides and reports (9). However, information strategies do not always change behaviors, such as the elimination of domestic breeding sites (11), sometimes because recommended practices are neither well-suited to existing habits nor adapted to the socio-economic conditions of the communities (11,12).

Educational institutions can function as training centers and meeting sites for communities from which health education, productive projects, and new technologies can be disseminated (8,13-16). Some dengue prevention initiatives have used schools as points of community communication and assessed knowledge, attitudes, and practices (KAP) of pupils, their families or their communities (14-16). However, such KAP studies are scarce in rural areas, since dengue transmission is considered mainly urban (4,10). Nevertheless, *A. aegypti* is present in rural areas, sometimes with high virus infectivity suggesting active transmission (5,17).

The present study was part of the baseline work of a trial of integrated interventions for preventing dengue and diarrhea in rural Colombian schools (18). The objective was to determine the KAP about dengue among pupils in grades 2 to 5 in rural schools in Anapoima and La Mesa municipalities in Cundinamarca department.

Materials and methods

We conducted a cross-sectional study in rural schools (<100 pupils and ≤ 5 grades) of Anapoima and La Mesa, 17 schools in each municipality (figure 1); 828 pupils were eligible to participate in the study according to the records of the schools. KAP surveys were performed from May to June 2011 with 515 pupils in grades 2 to 5: 309 in La Mesa and 206 in Anapoima (table 1).

Study area

Anapoima has an average altitude of 700 meters above sea level, a mean temperature of 26°C, an area of 124.2 km², and a population of 12,539 inhabitants (56% rural) (19,20). La Mesa is 1,200 meters above sea level, its mean temperature is 22°C, it has an area of 148 km², and 29,566 inhabitants (45% rural) (20,21). The mean annual rainfall is 1,300 mm in both municipalities.

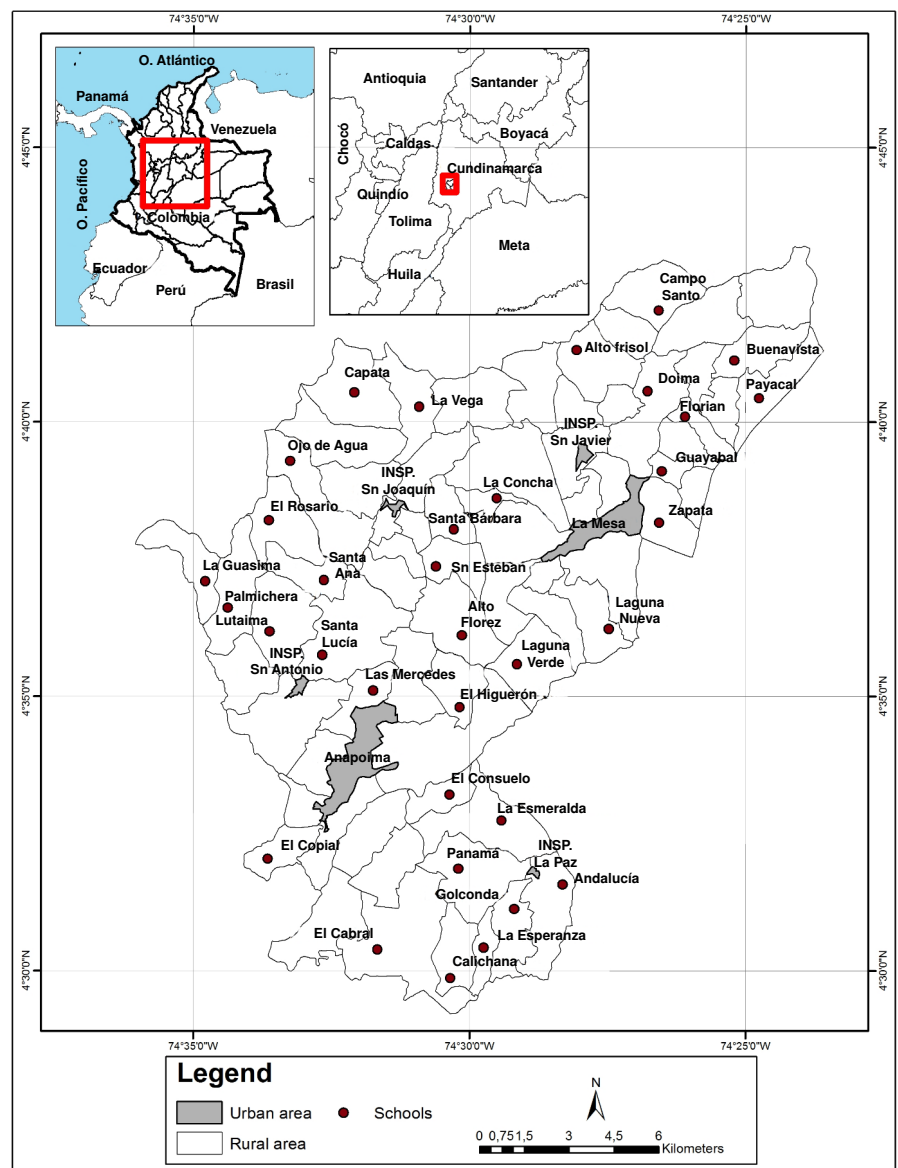


Figure 1. Location of the sampled rural schools in Anapoima and La Mesa municipalities

Table 1. Description of the pupils surveyed in Anapoima and La Mesa municipalities in 2011

Variable	Anapoima		La Mesa		Total	
	n	%	n	%	n	%
Total number of pupils in the study	206	40	309	60	515	100
Mean pupil age (in years) (SD)	9.4 (1.6)		9.3 (1.7)		9.3 (1.7)	
Age range (in years)	7-16		6-14		6-16	
Female population	86	41.7	138	44.7	224	43.5
Male population	120	58.3	171	55.3	291	56.5
2nd grade	51	24.8	74	23.9	125	24.3
3rd grade	47	22.8	86	27.8	133	25.8
4th grade	50	24.3	81	26.2	131	25.4
5th grade	58	28.2	68	22.0	126	24.5

The main economic activities are tourism and agriculture based on sugar cane, coffee, and fruit tree crops, as well as livestock. In 2010, the proportion of people with unmet basic needs (UBN), an indicator of poverty, in the rural areas of Anapoima was 36.4%, while in the urban areas it was 21.2% (19). In La Mesa, the proportions were 36.8% and 11.8%, respectively (21). Anapoima has a lower average altitude and a higher proportion of rural population. Nevertheless, La Mesa has a larger rural area. Both municipalities were classified as very high-risk areas based on their number of cases of dengue in the last 15 years (4).

Data collection

A questionnaire in Spanish was developed, field-tested and reviewed by experts in education, epidemiology, and entomology. The language was chosen to optimize comprehension and clarity considering the target age group. A member of the project attended readings with groups of up to five pupils in grades 2 and 3. This person read and showed the questions and response options ensuring that all items were answered without inducing answers. Pupils in grades 4 and 5 read the questionnaire independently without intervention from other pupils or project staff. Two or more members of the project team accompanied each group, which had at most 15 pupils.

The questionnaire consisted of six multiple-choice questions, three for establishing knowledge about dengue, one for attitudes and two for prevention practices. Knowledge of the symptoms of dengue, its mode of transmission, and identification of four mosquito breeding sites (laundry tanks or *albercas*—large concrete tanks used for storing water for laundry, one of the most common breeding sites in the area—, tires, uncovered water tanks, solid waste) were evaluated. The question regarding attitudes related to disease severity. As for practices, the pupil was asked about fever management and measures for dengue prevention and control. The identification of practices for fever management by pupils was included in the practices section considering that children usually receive care from adults. Additional variables included age, sex, grade, and municipality. The questionnaire was delivered to pupils in the target age group (grades 2-5) present in the school who were able to read and write, without cognitive disabilities, and who had provided parental consent (oral or written) and personal assent (oral or written).

Analysis

Individual scores were calculated for the knowledge, attitudes and practices sections and then scaled to a range of 0 to 10. Values for each student were used to calculate averages by school and municipality. For the knowledge and practice scales, categories were divided into quartiles

and classified into three groups (high, medium, and low) by combining the two groups below the 50th percentile. For the knowledge scale, the low quartile was <6.6, the medium between 6.6 and 8.3, and the high >8.3. The corresponding figures for the scale of practices were <5.4, 5.4-7.2, and >7.3. A scale for attitudes was not developed because the only possible values were zero or ten.

To determine the homogeneity of variance, Fisher F tests were performed where if the p value was greater than 0.05, the assumption of equal variances was considered valid. Student's t test for independent groups was used to compare mean scores by municipality, where a p value of <0.05 was considered statistically significant. The Huber-White estimator of the covariance matrix was used to allow for clustering within schools.

The KAP surveys data were entered and cleaned in Microsoft Excel™, version 2010, and analyzed in Epidat™, version 3.1, and R, version 3.1.1, including the package 'rms'.

Ethical considerations

Based on national regulations, the study was classified as minimal risk (22). The institutional research ethics committee of *Universidad El Bosque*, Bogotá, Colombia (Minutes No. 146 of 30/08/2 011) and the Ethical Review Board of the London School of Hygiene and Tropical Medicine (Ref. No. 10 453(6 289)-1) approved the study. Directors and teachers of the schools gave written consent. Written consent of parents and written assent were sought for all pupils enrolled. Assent was sought from pupils after it was explained that participating or not would have no academic or disciplinary implications. Only those giving oral assent participated in the survey.

Results

Description of the population

Out of the total population of pupils reported as enrolled in the rural schools, 62.2% (n=515) participated in the survey. Sixty percent of pupils in the sample lived in La Mesa municipality and the remainder in Anapoima. The average age was 9.3 years (SD=1.7), 9.4 for males and 9.2 for females. The majority were male with 58% in Anapoima and 55% in La Mesa. The largest group was the fifth grade in Anapoima and the third grade in La Mesa, each representing approximately 28% of the surveyed population (table 1).

Knowledge

The average knowledge score was significantly higher in Anapoima than in La Mesa, 7.2 (95% confidence interval [95% CI]: 6.9-7.5) and 5.6 (95% CI: 5.3-5.9), respectively (t[513]= -8.0, p<0.001) (figure 2). In Anapoima, 3 of 17 schools reached a high-level score (above 8.3), and 9 of 17 schools reached the medium level. In La Mesa, just one school achieved a medium score while the remaining 16 schools were in the low category.

A set of manifestations for dengue disease such as fever, bone pain, red spots on the skin, and bleeding from the nose and gums were identified by 87 (17%) of the pupils. The most frequently recognized dengue symptoms were fever (56% La Mesa, 74% Anapoima) and bone pain (48% La Mesa, 64% Anapoima) (table 2). Mosquito bite was the transmission route selected by 87% of the pupils (85% La Mesa, 91% Anapoima). Overall, 116 (23%) of the

respondents identified all the four options for potential breeding sites of the dengue vector. Considering both municipalities together, the most frequently identified breeding sites were uncovered water tanks (68%) and solid waste (59%). Eighty percent of the pupils in Anapoima and only 40% of pupils in La Mesa identified washbasins (*albercas*) as breeding sites (table 2).

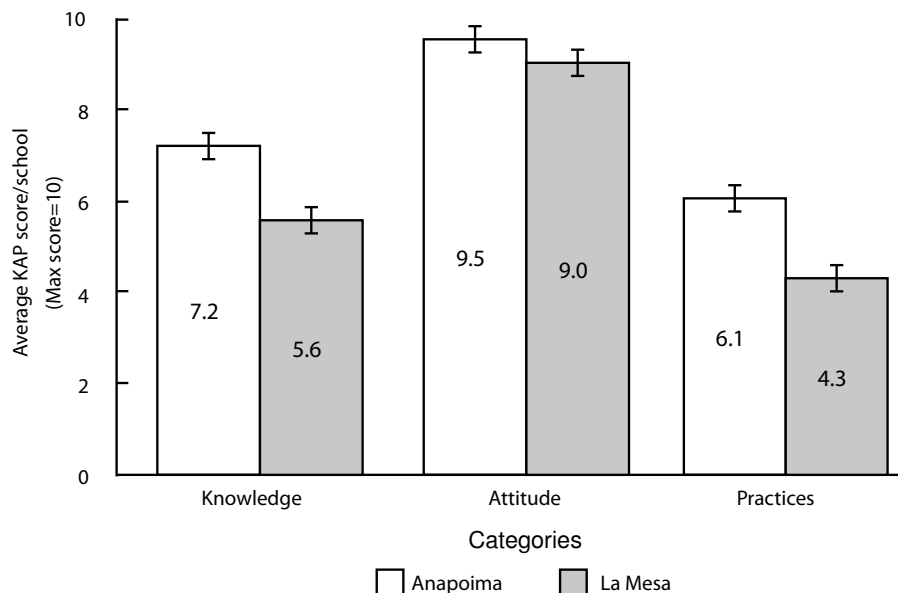


Figure 2. Knowledge, attitudes, and practices (KAP) about dengue in pupils in rural primary schools in Anapoima and La Mesa municipalities, Cundinamarca department, Colombia, 2011. Error bars indicate 95% confidence intervals.

Table 2. Number and percentage of pupils with knowledge about dengue symptoms, transmission routes, and mosquito breeding sites in rural schools in Anapoima and La Mesa municipalities, Cundinamarca department, Colombia, 2011

	Anapoima		La Mesa		Total	
	n=206	%	n=309	%	n=515	%
Symptoms						
Fever	152	73.8	173	56.0	325	63.1
Bone pain	131	63.6	148	47.9	279	54.2
Bleeding from the nose and gums	131	63.6	94	30.4	225	43.7
Red spots on the skin	128	62.1	92	29.8	220	42.7
Transmission route						
Mosquito bite	187	90.8	263	85.1	450	87.4
Proximity to someone sick	29	14.1	94	30.4	123	23.9
Via food	9	4.4	4	1.3	13	2.5
Breeding sites						
Uncovered water tanks	161	78.2	189	61.2	350	68.0
Solid waste	119	57.8	183	59.2	302	58.6
Washbasins (<i>albercas</i>)	165	80.1	124	40.1	289	56.1
Tires	141	68.4	100	32.4	241	46.8

Attitudes

The overall perception of disease severity revealed that 92% of pupils (Anapoima 95%, La Mesa 90%) thought that dengue is a health problem for them. There was no significant difference between Anapoima and La Mesa, 9.5 (95% CI: 9.2-9.8) and 9 (95% CI: 8.7-9.3), respectively ($t[504]= 1.9$, $p=0.16$) (figure 2).

Practices

The pupils from Anapoima had a significantly higher average score than those from La Mesa, 6.1 (95% CI: 5.8-6.4) and 4.3 (95% CI: 4-4.6), respectively ($t[488] = -8.3$, $p < 0.001$) (figure 2). Anapoima's average score was in the medium category while La Mesa's was low. The main practices for fever management identified among the seven options given were seeking care at a medical center (Anapoima 82%, La Mesa 72%), and taking medication (Anapoima 69%, La Mesa 65%). Other practices that pupils identified were the use of mosquito nets and receiving herbal infusions (table 3).

Table 3. Number and percentage of pupils identifying practices for fever management and dengue prevention and control in rural schools in Anapoima and La Mesa municipalities, Cundinamarca department, Colombia, 2011

	Anapoima		La Mesa		Total	
	n=206	%	n=309	%	n=515	%
Practices for fever management						
Going to the medical center	169	82.0	222	71.8	391	75.9
Taking medication	142	68.9	200	64.7	342	66.4
Using mosquito net	108	52.4	89	28.8	197	38.3
Receiving herbal infusions	83	40.3	92	29.8	175	34.0
Bathing and refreshing	64	31.1	102	33.0	166	32.2
Drinking water and abundant liquids	66	32.0	88	28.5	154	29.9
Actions for dengue prevention and control						
Using mosquito net	170	82.5	195	63.1	365	70.9
Fumigation with insecticides	149	72.3	208	67.3	357	69.3
Washing <i>albercas</i>	162	78.6	142	46.0	304	59.0
Changing water of vases	160	77.7	138	44.7	298	57.9
Taking out water of tires	155	75.2	129	41.7	284	55.1
Covering water containers	140	68.0	145	46.9	285	55.3
Learning and teaching	28	13.6	23	7.4	51	10

^a *Albercas*: large concrete tanks used for storing water for laundry

Among the actions to be taken to avoid the disease, the most common answer in both municipalities was the use of mosquito nets (Anapoima 83%, La Mesa 63%). Other practices considered important in La Mesa were space-spraying of insecticides and covering water storage containers while in Anapoima, respondents said washing the *albercas* and changing the water in floral vases (table 3).

Discussion

In this study, we determined KAP among pupils in rural schools in Anapoima and La Mesa municipalities. Overall, we found a medium level of knowledge about dengue and a lower level of preventive practices in both municipalities. While schools, health institutions or media mainly promote knowledge, practices to control the vector depend on many factors such as infrastructure, socio-economic conditions, demographic characteristics, and personal choice (23-25).

Although the national surveillance public health policy defines activities for dengue prevention and control (26), the regular vector control strategies adopted by local health boards may differ between municipalities. During an epidemic, it is mandatory to stop transmission according to the national protocol; municipalities also carry out complementary actions such as solid waste collection campaigns in critical areas. Despite being neighbors, the two municipalities in this study differ in terms of altitude and proportion of

rural areas and population, which may affect decisions on vector control strategies and the activities that are recognized by inhabitants. Anapoima experienced higher dengue incidence than La Mesa in 2010 (Anapoima: 3,198 per 100,000 population vs. La Mesa: 1,975 per 100,000 population) and in 2011 (Anapoima: 679 per 100,000 population vs. La Mesa 160 per 100,000 population) (27). Higher scores in knowledge and practices of pupils from Anapoima may have been influenced by the delivery of an educational intervention in the municipality for prevention and control of dengue with community agents in rural areas in 2010 (28), as well as municipal education campaigns as a response to the high incidence of dengue.

Nevertheless, these activities usually focused on urban areas (18).

Comparable studies in rural areas of Colombia are scarce since dengue is mainly considered an urban disease (4,10). However, greater attention has recently been given to the occurrence of the disease in rural areas showing vector presence, rural infections (17,23,29), and the presence of the virus in the vector (5). Our study, therefore, adds valuable new information on awareness and practices, which is relevant for the planning of disease prevention programs. However, a consensus needs to be reached on measurement methods for knowledge, attitudes, and practices to allow comparison of results.

Knowledge

Thirty percent of the pupils in Anapoima identified a combination of disease manifestations compared to only 8% in La Mesa. Other studies conducted in urban primary schools in Latin America found that 77% of pupils in Honduras (16), 41% in Brazil (13), and 42% in México (30) identified dengue symptoms such as fever, bone pain, and red spots on the skin when asked what it feels like to have dengue. KAP studies can be compared across age and school grade, but results have to be interpreted carefully because of differences between populations, socioeconomic status, and health surveillance determining urban and rural conditions.

Eighty-seven percent of the pupils identified that the disease is transmitted by mosquito bite, similar to 92% in the Philippines (23) and 97% in Malaysia (29). Despite the young age of the pupils in this study, their knowledge of this aspect exceeded two previous Latin American studies, which found that 68% of pupils surveyed in Honduras (16) and 56% in México (30) knew that mosquitoes transmit dengue. Better identification of the mode of transmission may be related to the strengthening of mass media messages in recent years (8). Moreover, actions for prevention and control carried out by public health programs and entomological surveillance have increased (26). Inhabitants of these areas are in constant contact with the disease, which facilitates learning from their own experiences or through contact with health staff (12). Overall, 24% of the pupils said that dengue can be transmitted by proximity to someone who is sick, a high proportion compared to 14% reported by pupils in an urban location in Colombia (15). Few KAP studies on dengue report other answers than mosquito bites being the main route of transmission. However, qualitative approaches have identified that some populations think of the disease as an everyday illness or associate it with common cold (12).

Just 23% of the pupils in our study recognized all the four given breeding sites, in contrast to 68% of pupils in Honduras (16) and 49% in México (30) asked to identify three. Only 40% of pupils in La Mesa identified the *alberca*

as a breeding site, although this is a common *A. aegypti* breeding site (12,31). Their elimination as breeding sites is hindered by their large volume and lack of an efficient way to seal them (31). Only 61.2% of rural areas in Colombia have access to regular piped water supply (32), which forces inhabitants to store water in containers potentially providing breeding sites for the vector. Some studies identified a lack of accuracy in the knowledge related to breeding places and more appropriate water storage methods as important themes for community education to focus on (25).

A majority of pupils in our study identified solid waste as a breeding site for the mosquito that transmits dengue. We found that 59% of the pupils associated solid waste with the mosquito while a study conducted in Brazil showed that 78% of the general population did so (25). Where appropriate rubbish collection practices and programs are lacking, people dispose of waste in open fields.

Attitudes

Pupils from both municipalities expressed a high level of concern regarding the risk of dengue. Pupils in La Mesa recognized the risk to a slightly lesser extent (90%) than the ones in Anapoima (95%), although the difference was not statistically significant. Our results are similar to those of other studies, which found that dengue and its risks are a matter of concern for communities (25,33). Measuring attitudes related to the disease should be strengthened, and questionnaires should be supplemented with qualitative approaches (11,12,25,30).

Practices

The average scores of practices were significantly higher in Anapoima than in La Mesa. We asked pupils about fever management practices of adults. Even though pupils were not directly guiding these practices due to their age, we asked them to identify the typical procedures undertaken by their parents and caregivers. They reported seeking help at a medical center (76%) as a fever management practice similar to results from comparable studies in Latin America (29,33). Strategies like home care or self-medication (12) were the second most common response, which is reasonable considering existing poor roads, scarce means of transport, availability of health systems in rural areas, difficulties in accessing medical services, and parents' consideration that illness is not severe enough to seek help at a medical center (12,25). Although seeking help at a medical center was the most frequent answer, it has been shown that some families choose home care at the beginning of the disease (12).

Our study also included domestic fever management practices such as herbal infusions (34%) and fluid administration (30%). These have seldom been included in other studies (11). Mass-media campaigns generally focus on information about community vector control, although there is a real need to improve knowledge about the disease and home care of infected persons (34).

A notable finding is the relatively low percentage of pupils that identified the use of mosquito net as a prevention measure during fever episodes (overall 38%). The use of mosquito nets for dengue prevention is generally low in Colombia although health authorities promote their use by sick people in endemic areas to avoid onward dengue transmission (10). In fact, national health authorities in Colombia recommend the use of mosquito nets as an

individual strategy to prevent the transmission of the disease in households and hospitals during the first eight days of fever (35). However, this did not seem to be clearly recognized in our study. Data from urban areas showed that 6% in Carepa and Apartadó (Antioquia department) (34) and 28% in Bucaramanga (Santander department) (33) reported using nets against dengue. This is different from a rural area in the Philippines, where 59% of the population used nets for protection against dengue (23). The emphasis of educational and vector control interventions on container management rather than home care could be a reason for the low recognition of this strategy (34,36).

Space-spraying of insecticides was the second most common choice for prevention. Several studies have shown that inhabitants perceive space-spraying as crucial for vector control (12,24,34,36). The intensive use of insecticides by health authorities can hinder the implementation of other preventive interventions because it can lead communities to downplay their responsibility or the impact of their practices in prevention (24). The ranking of control methods identified in La Mesa could reflect the familiarity of the pupils with these procedures, as well as the low identification of other prevention methods.

Overall, 55% of pupils in our study recognized that covering water containers is a strategy to prevent and control dengue. We consider this percentage to be low given how central the activity is to dengue control. Sixty-five percent of pupils in Medellín (15) and 72% of pupils in Puerto Rico (14) identified breeding site reduction as a dengue intervention.

Considering the weaknesses found in previous interventions, education plans adapted to community interests and resources are needed (12,15,25). Participatory approaches from the design stage of the intervention can motivate people to get involved in changing risk behaviors. Education from an early age is a key factor in people's understanding of the disease and the implementation of risk-reducing practices (24,36).

Where appropriate, the school curriculum should include these educational processes acknowledging rural conditions. This may lead to applicable preventive measures and play-based strategies (14-16,33). When assessing knowledge gaps, it is important to make distinctions based on, for example, age, educational level, and urban/rural settings. The distinction between academic and applicable knowledge in the everyday lives of rural inhabitants and the relationship to socio-economic constraints must be acknowledged.

It is necessary to focus on rural residents' concepts of illness, awareness of the disease, use of space-spraying only in emergencies, and actions, especially self-medication and use of mosquito nets for home care of children, infants and the sick in general. Despite having a basic knowledge of the disease, the individuals and the community have yet to fully transform this knowledge into protective practices. Hence, it is imperative to link academia and the government to strengthen community action through the improvement of the water, sanitation and health infrastructure, as well as the innovative use of resources and capacities for long-term inter-sector interventions (34,36).

Few KAP studies have been performed in rural Colombia since dengue is mainly considered an urban disease. To our knowledge, this is the first dengue KAP study in a rural area in the country. The recent evidence of the presence of *A. aegypti* and the virus in rural areas requires improved entomological and epidemiological surveillance, as well as educational programs oriented to both pupils and community members.

Good knowledge does not guarantee its transformation into better practices, especially if there is a lack of stimuli, insufficient water, sanitation and health infrastructure development, and low community participation.

Pupils demonstrated a good knowledge of the transmission route of dengue while knowledge of symptoms and breeding sites was mixed indicating the need to strengthen this knowledge from an early age. Results on practices showed ambivalence on the use of mosquito nets and low percentages identifying the covering of water containers as a preventive strategy, also, a high tendency for self-medication. There remains a need to measure preventive practices in rural areas and identify remaining barriers to their implementation.

Acknowledgements

Authorities of Anapoima and La Mesa helped during the process. We thank directors, teachers, and pupils for their joy and participation and Luz Marina Contreras, Laura Cabezas, Esmeralda González, Humberto Mosquera, Nancy Herrera, Rosa Silva, Rosa Pulido, Paola Moreno, and Sandra Moreno for their fieldwork; Edgar Ibáñez for the initial statistical support, Laura Cabezas, for the site map and Dr. Miguel Otero, for his support as Vice-President of Research at Universidad El Bosque.

References

1. World Health Organization. Dengue and severe dengue. Geneva: World Health Organization; 2016. Accessed on: May 27, 2016. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
2. Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, *et al.* Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1760. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001760>
3. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013;496:504-7. <https://doi.org/10.1038/nature12060>
4. Padilla J, Rojas D, Sáenz-Gómez R. Dengue en Colombia: epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia. Bogotá: Guías de impresión; 2012.
5. Pérez-Castro R, Castellanos JE, Olano VA, Matiz MI, Jaramillo JF, Vargas SL, *et al.* Detection of all four dengue serotypes in *Aedes aegypti* female mosquitoes collected in a rural area in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;111:233-40. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150363>
6. Christofferson RC. Zika virus emergence and expansion: Lessons learned from dengue and chikungunya may not provide all the answers. *Am J Trop Med Hyg* 2016;95:15-8. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0866>
7. World Health Organization. Dengue vaccine: WHO position paper – September 2018. *Weekly Epidemiol Record.* 2018;36:457-76.
8. Elder J, Lloyd L. Achieving behaviour changes for dengue control: Methods scaling-up and sustainability. Report of the Scientific Working Group on Dengue. Geneva: World Health Organization; 2006.
9. Heintze C, Garrido MV, Kroeger A. What do community-based dengue control programmes achieve? A systematic review of published evaluations. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101:317-25. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.08.007>
10. Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud. Dengue: Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Primera edición. La Paz: OPS/OMS; 2009.
11. Claro LB, Kawa H, Cavalini LT, Rosa ML. Community participation in dengue control in Brazil. *Dengue Bulletin.* 2006;30:214-22.
12. Suárez R, Olarte S MF, Ana MF, González C. Is what I have just a cold or is it dengue? Addressing the gap between the politics of dengue control and daily life in Villavicencio-Colombia. *Soc Sci Med.* 2005;61:495-502. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2004.11.069>
13. Madeira NG, Macharelli CA, Pedras JF, Delfino MC. Educação de escolares de primeiro grau como estratégia no controle do dengue. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35:221-6. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822002000300004>

14. Soto-Hernández RJ, Fernández-Cerna EA, Ávila-Montes GA. Evaluación de un programa educativo sobre dengue y *Aedes aegypti* focalizado en niños de escuela primaria. Revista Médica Hondureña. 1995;63:12-8.
15. Restrepo BN, Pineda J, Parra-Henao GJ. Aplicación y evaluación de materiales educativos para la prevención del dengue en una institución educativa de Medellín, Colombia. Revista CES Medicina. 2011;25:31-41.
16. Ávila Montes GA, Martínez M, Sherman C, Fernández-Cerna E. Evaluación de un módulo escolar sobre dengue y *Aedes aegypti* dirigido a escolares en Honduras. Rev Panam Salud Pública. 2004;16:84-94.
17. Olano VA, Matiz MI, Lenhart A, Cabezas L, Vargas SL, Jaramillo JF, *et al.* Schools as potential risk sites for vector-borne disease transmission: Mosquito vectors in rural schools in two municipalities in Colombia. J Am Mosq Control Assoc. 2015;31:212-22. <https://doi.org/10.2987/moco-31-03-212-222.1>
18. Overgaard HJ, Alexander N, Matiz MI, Jaramillo JF, Olano VA, Vargas S, *et al.* A cluster-randomized controlled trial to reduce diarrheal disease and dengue entomological risk factors in rural primary schools in Colombia. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10:e0005106. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005106>
19. Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). Perfil municipal de Anapoima. Censo General, 2005. Accessed on: September 13, 2018. Available at: <https://www.dane.gov.co/files/censo2005/perfiles/cundinamarca/anapoima.pdf>
20. Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). Estimación y proyección de población nacional, departamental y municipal por sexo, grupos quinquenales de edad y edades simples de 0 a 26 años 1985-2020. Accessed on: September 13, 2018. Available at: <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/demografia-y-poblacion/proyecciones-de-poblacion>
21. Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). Perfil municipal La Mesa. Censo general 2005. Accessed on: September 13, 2018. Available at: https://www.dane.gov.co/files/censo2005/perfiles/cundinamarca/la_mesa.pdf
22. Ministerio de Salud. Resolución 8430 de 1993. Accessed on: September 13, 2018. Available at: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/RESOLUCION-8430-DE-1993.PDF>
23. Yboa BC, Labrague LJ. Dengue knowledge and preventive practices among rural residents in Samar province, Philippines. Am J Public Health. 2013;1:47-52. <https://doi.org/10.12691/ajphr-1-2-2>
24. Torres-López TM, Guerrero-Cordero JL, Salazar-Estrada JG. Dimensiones culturales del dengue que favorecen o dificultan su prevención en México. Rev Panam Salud Pública. 2012;31:197-203.
25. Lefèvre AM, Ribeiro AF, Monteiro Marques II GR, Serpali LL, Lefèvre III F. Representações sobre dengue, seu vetor e ações de controle por moradores do município de São Sebastião, litoral Norte do Estado de São Paulo, Brasil. Cad Saúde Pública. 2007;23:1696-706. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2007000700022>
26. Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud. Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de dengue. Bogotá: Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud; 2010.
27. Instituto Nacional de Salud. Reporte de evento. Comportamiento epidemiológico del dengue en Colombia año 2011. Accessed on: September 11, 2018. Available at: http://portalsivigila.ins.gov.co/rutinaria/historica/rutinaria_2011.xlsx
28. Universidad El Bosque. Prevención del dengue y control del *Aedes aegypti* en el área rural del municipio de Anapoima, Cundinamarca. Resultados del diagnóstico. Bogotá: Instituto Salud y Ambiente, Universidad El Bosque; 2011.
29. Al-Dubai SA, Ganasegeran K, Mohanad Rahman A, Alshagga MA, Saif-Ali R. Factors affecting dengue fever knowledge, attitudes and practices among selected urban, semi-urban and rural communities in Malaysia. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2013;44:37-49.
30. Torres JL, Ordóñez JG, Vázquez-Martínez MG. Dengue-related knowledge, attitudes, and practices in primary schools in Tapachula, Chiapas, México. Rev Panam Salud Pública. 2014;35:214-8.

31. Alcalá L, Quintero J, González-Uribe C, Brochero H. Productividad de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) en viviendas y espacios públicos en una ciudad endémica para dengue en Colombia. *Biomédica*. 2015;35:258-68. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i2.2567>
32. Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). Encuesta de Calidad de Vida – ECV 2015. Boletín técnico. Accessed on: September 11, 2018. Available at: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/condiciones_vida/calidad_vida/Boletin_Tecnico_ECV_2016.pdf
33. Vesga-Gómez C, Cáceres-Manrique FM. Eficacia de la educación lúdica en la prevención del dengue en escolares. *Rev Salud Pública*. 2010;12:558-69.
34. Santos SL, Parra-Henao G, Silva MB, Augusto LG. Dengue in Brazil and Colombia: A study of knowledge, attitudes, and practices. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47:783-7. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0048-2014>
35. Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud. Protocolo para la vigilancia en salud pública del dengue. Bogotá: Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud; 2010.
36. Spiegel J, Bennett S, Hattersley L, Hayden MH, Kittayapong P, Nalim S, *et al.* Barriers and bridges to prevention and control of dengue: The need for a social-ecological approach. *EcoHealth*. 2005;2:273-90. <https://doi.org/10.1007/s10393-005-8388-x>

Original article

Coumarin analogue 3-methyl-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one as a possible antiparkinsonian agent

María del Pilar Olaya¹, Nadezdha Esperanza Vergel¹, José Luis López², María Dolores Viña³, Mario Francisco Guerrero¹

¹ Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

² Departamento de Química Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

³ Departamento de Farmacología, Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España

Introduction: Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease. Monoamine oxidase B inhibitors are used in the treatment of this disease concomitantly with levodopa or as monotherapy. Several substituted coumarins have shown activity as inhibitors of monoamine oxidase B.

Objective: To evaluate the possible antiparkinsonian effects of the coumarin analogue FCS005 (3-methyl-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one) in mouse models, as well as its inhibitory activity towards monoamine oxidases (MAO) and its antioxidant activity.

Materials and methods: FCS005 was synthesized and the reversal of hypokinesia was evaluated in the reserpine and levodopa models. Moreover, in the haloperidol model, its anticataleptic effects were evaluated. Additionally, the monoamine oxidase inhibitory activity and antioxidant activity of FCS005 were evaluated using *in vitro* and *ex vivo* studies, respectively.

Results: FCS005 (100 mg/kg) caused the reversal of hypokinesia in the reserpine and levodopa models. This furocoumarin also presented anti-cataleptic effects at the same dose. Besides, it showed selective inhibitory activity towards the MAO-B isoform and antioxidant activity.

Conclusion: These results attribute interesting properties to the compound FCS005. It is important to continue research on this molecule considering that it could be a potential antiparkinsonian agent.

Keywords: Parkinson's disease; monoamine oxidase; coumarins; models, animal; reserpine; levodopa; haloperidol; antioxidants.

El análogo de cumarina 3-metil-7H-furo[3,2-g]cromen-7-ona, un posible agente antiparkinsoniano

Introducción. El segundo trastorno neurodegenerativo más común es la enfermedad de Parkinson. Los inhibidores de la monoamino oxidasa B se emplean en el tratamiento de esta enfermedad en monoterapia o concomitantemente con levodopa. Varios compuestos cumarínicos han mostrado actividad como inhibidores de la monoamino oxidasa B.

Objetivo. Evaluar los posibles efectos antiparkinsonianos del análogo de la cumarina FCS005 (3-metil-7H-furo[3,2-g]cromen-7-one) en modelos de ratones, la actividad inhibitoria frente a las monoamino oxidasas (MAO) y la actividad antioxidante.

Materiales y métodos. Se sintetizó la furanocumarina FCS005 y, en los modelos de reserpina y levodopa, se evaluó si producía reversión de la hipocinesia; en el modelo de haloperidol se evaluaron sus efectos anticatalépticos. Además, se evaluó *in vitro* la actividad inhibitoria de MAO y, *ex vivo*, la actividad antioxidante del compuesto FCS005.

Resultados. El compuesto FCS005 en dosis de 100 mg/kg produjo la remisión de la hipocinesia en los modelos de reserpina y de levodopa. Esta furanocumarina presentó efectos anticatalépticos con la misma dosis. Además, mostró tener actividad inhibitoria selectiva sobre la MAO B, así como efectos antioxidantes.

Conclusión. Los resultados evidenciaron propiedades interesantes del compuesto FCS005. Es importante continuar investigando esta molécula porque puede ser un potencial agente antiparkinsoniano.

Palabras clave: enfermedad de Parkinson; monoaminoxidasa; cumarinas; modelos animales; reserpina; levodopa; haloperidol; antioxidantes.

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease after Alzheimer's. The incidence of the disease ranges from 10 to 50/100,000 person-years with a prevalence between 100 and 300/100,000 population (1). Due to the general aging of the population, the number of

Received: 31/01/18

Accepted: 29/10/18

Published: 09/11/18

Citation:

Olaya MP, Vergel NE, López JL, Viña MD, Guerrero MF. Coumarin analogue 3-methyl-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one as a possible antiparkinsonian agent. *Biomédica*. 2019;39:491-501.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.4299>

Corresponding author:

María del Pilar Olaya, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Avenida carrera 30 N° 45-03, Bogotá, D.C., Colombia
Telephone: (571) 316 5000, extension 14622; fax: (571) 316 5060
mpolayao@unal.edu.co

Author contributions:

María del Pilar Olaya: Development of the *in vivo* studies of reserpine and levodopa/carbidopa models, participation in the process of synthesis and drafting of the paper

Nadezdha Esperanza Vergel: Development of the *in vivo* study of the haloperidol model, of the process of synthesis and the antioxidant activity assay

José Luis López: Direction of the process of synthesis of coumarin

Dolores Viña: Development of the *in vitro* inhibition of MAO

Mario Francisco Guerrero: Development of the statistical analysis and the critical revision of the manuscript content

All authors reviewed and approved the final version of this manuscript.

Funding:

This work was funded by the *Universidad Nacional de Colombia*, Bogotá (VRI/DIB, Project: 13668).

Conflicts of interest:

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Parkinson's disease patients is expected to double by 2030 (1,2). The loss of dopamine-secreting neurons within the *substantia nigra* and the presence of Lewy bodies are the major pathological findings in Parkinson's disease (3) while resting tremor, bradykinesia, muscle rigidity, and alterations in balance and walking are its main motor symptoms (4,5).

Currently, levodopa (L-dopa) is the most widely used treatment for the disease. This symptomatic therapy compensates for the decreased level of dopamine (DA). In certain instances (e.g., mild symptoms, tremor as the only or most prominent symptom, aged <60 years), other medications as monoamine oxidase type B inhibitors may be used initially to avoid levodopa-related motor complications (3). The MAO-B inhibitors such as selegiline and rasagiline are a valuable adjunct therapy to L- DOPA for Parkinson's disease (6). These agents improve the response to L-dopa in the later stages of the disease and are useful in the treatment of disease symptoms in early stages (7).

Several coumarin compounds present activity in the central nervous system (CNS). Coumarin (1,2-benzopyrone) obtained from the species *Hygrophila tyttia* Leonard has shown potential effects as an anticonvulsant, anxiolytic, and sedative (8). One study indicated that 4-propyl-2H-benzo[h]-chromen-2-one could have antidepressant effects (9). Different substituted coumarins have been synthesized and have shown activity as MAO-B inhibitors (10-15) and other coumarin derivatives have presented neuroprotective effects (16,17), which is important considering that currently it is expected that therapeutic alternatives control Parkinson's disease symptoms and offer an approach to slow or stop the progression of neurodegeneration (18). Several coumarins have shown antioxidant activity (19,20), which has an interesting neuroprotective property as oxidative stress is among the main risk factors underlying nigral degeneration. Dopaminergic neurons in this region of the CNS are particularly susceptible to oxidative stress (21).

In this study, the coumarin FCS005 (3-methyl-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one) was synthesized and its possible anti-parkinsonian effects were evaluated.

Materials and methods

Coumarin analogue

FCS005 is a furocoumarin obtained from a 7-hydroxylated coumarin following the experimental protocol previously described by Garazd, *et al.* (22). It is an amorphous yellow powder with a melting point at 210-212°C and a molecular weight of 200 g/mol. The infrared and ¹H/¹³C magnetic resonance spectra led to the elucidation of the structure of 3-methyl-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one (figure 1) reported in the National Center for Biotechnology Information database (23).

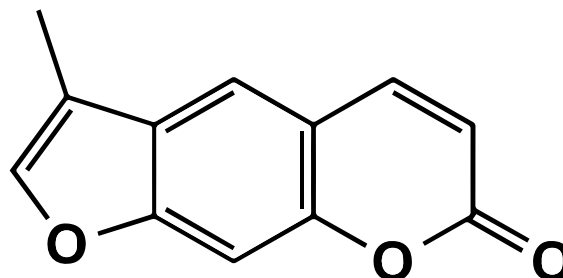


Figure 1. Structure of 3-methyl-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one (FCS005)

Other reagents and drugs used in this investigation were selegiline, levodopa, carbidopa and reserpine, all supplied by Sigma-Aldrich. A MAO kit was obtained from Molecular Probes™.

Animals

We used male ICR mice six to seven weeks old (25 - 30 g) provided by the bioterium of the *Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, at Universidad Nacional de Colombia*. The animals were kept under standard laboratory conditions, 12-hour light-dark cycles, and at room temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) with food and water available *ad libitum*.

The effects of FCS005 (50, 100 and 200 mg/kg), selegiline (10 mg/kg) or the vehicle on motor activity were evaluated at 1.5 and 23.5 h after administration in normal mice.

In the reserpine model and l-dopa/carbidopa assays, the locomotor activity was evaluated in the open-field test. The open field was a square arena divided into 16 squares with surrounding walls to prevent escape. Animals were placed individually in the middle of the open field and the specific parameter evaluated was the number of cadres traversed during 5 minutes. The open field was cleaned with a water-alcohol (10%) solution before placing the next animal to eliminate possible bias due to odors left by previous subjects.

Evaluation of antiparkinsonian effects in the reserpine model

We followed the experimental protocol described by Tadaiesky, *et al.* (24), with some modifications.

Reserpine 3 mg/kg was administrated intraperitoneally (i.p.) and 30 minutes later the mice were dosed with selegiline (10 mg/kg), FCS005 (50, 100 and 200 mg/kg) or vehicle by oral (p.o.) administration. The vehicle was a mixture of 15% propylene glycol, 15% glycerol, and enough distilled water to make up 100%. Locomotor activity was evaluated at 2 and 24 h after reserpine administration.

Effect of L-dopa/carbidopa and MAO-B inhibitors in mice pretreated with reserpine

We evaluated the doses of FCS005 that showed significant differences in the reserpine model. The dose of L- dopa and carbidopa that did not cause the reversal of hypokinesia was determined in a dose-response relationship (data not shown). The mice were dosed with reserpine (3 mg/kg) i.p. 30 min before the p.o. administration of FCS005, selegiline or the vehicle. Levodopa plus carbidopa were administrated i.p. 30 min later. Locomotor activity was evaluated at 2 and 24 h after the administration of reserpine.

Anticataleptic effects and antioxidant activity

Haloperidol was administered to the animals to induce rigidity and akinesia (catalepsy) (25,26). Catalepsy was defined as the prolonged maintenance of both forepaws in an atypical position on a horizontal bar.

The animals received haloperidol (3 mg/kg) i.p.; FCS005 (100 mg/kg, p.o.), levodopa:carbidopa (400 mg/kg:40 mg/kg; p.o.) or vehicle (p.o.) was administrated 30 min before. The reversal of catalepsy was evaluated for 2 min 60 min after the administration of the treatments.

Antioxidant activity was evaluated *ex vivo*. Mice were administered daily for 10 days with the treatments FCS005 (50 mg/kg, p.o.), levodopa:carbidopa (400 mg/kg:40 mg/kg, p.o.) or vehicle (p.o.) followed by haloperidol (1 mg/kg, i.p.) 30 min later. Then, the animals were killed by decapitation and the brains were removed, washed in 1% KCl, dissected on an ice-cold plate, and homogenized in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4). Homogenates were centrifuged (10,000 rpm for 10 min at 4°C). The final supernatant was stored at -20°C. The protein content of each sample was determined by the Bradford method.

The index of lipid peroxidation was evaluated following the protocol described by Hijova, *et al.* (27). The brain homogenate (450 µL), 1 mL trichloroacetic acid (10%), and 50 µL of 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) were centrifuged at 1850 xg for 10 min at 4°C; then, 1 mL of thiobarbituric acid (0.67%) was added to 1 mL of the supernatant. This mixture was heated to 92°C for 30 min and then cooled in an ice bath (4°C) before the absorbance was measured at 532 nm. The results were expressed as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in mmol/mL/mg of tissue protein.

Quantification of protein carbonyl groups was determined by the technique of Levine, *et al.* (28), following the protocol described by Baltacioglu, *et al.* (29). Briefly, 250 µL of 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) or 250 µL of 2 M HCl were added to the brain homogenate (50 µL) for the sample or the blank, respectively. The samples were left at room temperature in the dark for 1 h and vigorously stirred every 15 min. Then, 500 µL of trichloroacetic acid (20%) was added. The samples were kept in an ice bath for 15 min and then centrifuged at 11,000 rpm for 5 min. The pellet was washed three times with 1 mL of ethyl acetate/ethanol (1:1) solution. After each wash, the sample was centrifuged at 3,000 rpm for 7 min. Then, 250 µL of 6 M guanidine hydrochloride were added to the pellet to dissolve it and then it was incubated at 37°C for 10 min. The absorbance was determined at 360 nm. The content of carbonyl groups was calculated based on the molar extinction coefficient of DNPH ($\epsilon = 22\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) and expressed as nmol/mg protein (29).

Assay of human monoamine oxidase (hMAO) inhibitory activity

The effects of FCS005 on hMAO isoform enzymatic activity were evaluated using a MAO kit (Molecular Probes™) using the experimental protocol previously described by Yáñez, *et al.* (30). Briefly, adequate amounts of recombinant hMAO-A (1.1 mg protein; specific activity: 150 nmol *p*-tyramine oxidized to *p*-hydroxyphenylacetaldehyde/min/mg protein) or hMAO-B (7.5 mg protein; specific activity: 22 nmol *p*-tyramine transformed/min/mg protein) were added to 0.1 mL of sodium phosphate buffer (0.05 M, pH 7.4) to obtain the same reaction velocity and FCS005 in various concentrations. This mixture was incubated for 15 min at 37°C in a flat, black-bottomed 96-well microtest plate in a dark fluorimeter chamber. Then, the reaction was started by adding (final concentrations) 200 µM Amplex™ Red reagent, 1 U/mL horseradish peroxidase, and 1 mM *p*-tyramine. The production of H₂O₂ and, consequently, of resorufin was quantified at 37°C in a multi-detection microplate fluorescence reader (FLX800™, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) based on the fluorescence generated (emission: 590 nm, excitation: 545 nm) over a 15-min period in which the fluorescence increased linearly.

The test drugs were added to solutions containing only the Amplex™ Red reagent in a sodium phosphate buffer to determinate the capacity of FCS005 or the reference inhibitors to modify the fluorescence generated in the reaction mixture due to non-enzymatic inhibition. In the control

experiments, the test drugs were replaced with dilutions of the vehicles. In addition, the specific fluorescence emission was calculated after subtraction of the background activity, which was determined from wells containing all components except the hMAO isoforms that were replaced by a sodium phosphate buffer solution.

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) and assessed by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test to determine the treatments responsible for the significant differences. When the variance was not homogeneous or the data did not show normal distribution, the Kruskal-Wallis test was applied. The data on catalepsy were processed by a two-way analysis of variance (ANOVA) with the Bonferroni *post hoc* test. The graphical representation and statistical analysis were performed using GraphPad Prism (v. 5.03)

Ethical aspects

All the experimental protocols were evaluated and approved by the ethics committee of the *Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia* (Minutes No. 06, October 18, 2011).

Results

Mice not pretreated with reserpine

The compound FCS005 (50 mg/kg) caused a significant decrease in the locomotor activity of mice not pretreated with reserpine (figure 2) compared to the control group, both at 2 hours (p : 0.023) and at 24 hours (p : 0.003) post reserpine administration.

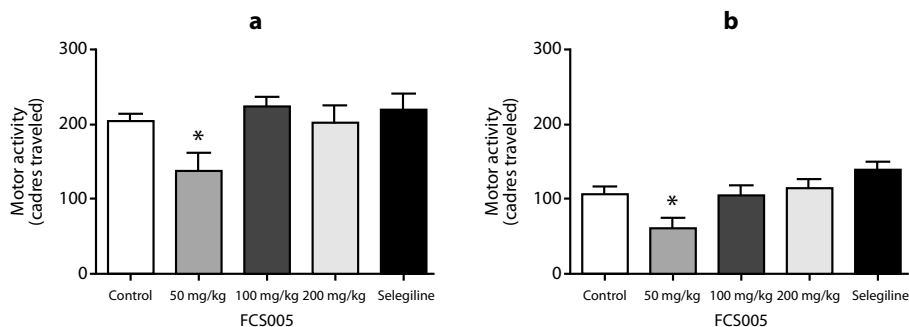


Figure 2. Mice not pretreated with reserpine. Effects on motor activity of the animals at 1.5 h (a) and 23.5 h (b) after administration of FCS005, selegiline or vehicle (0.1 mL/10 g body weight).

* $p < 0.05$ compared to the control group ($n = 7-9$)

Antiparkinsonian effects

In the reserpine model, we observed that FCS005 (100 mg/kg) caused a reversal of hypokinesia produced by reserpine significantly increasing the number of cadres traversed compared to the control at 2 h (p : 0.007) and 24 h (p : 0.002) (figure 3).

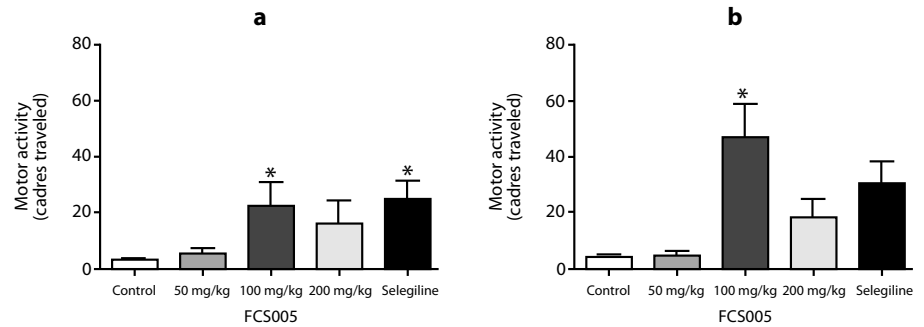


Figure 3. Reserpine model. Effects of administration of FCS005, selegiline or vehicle (0.1 mL/10 g body weight) on motor activity of the animals at 2 h (a) and 24 h (b) after administration of reserpine.

* $p < 0.05$ compared to the control group ($n = 7-9$)

Effect of L-dopa/carbidopa and MAO-B inhibitors in mice pretreated with reserpine

We evaluated the effect of concomitant administration of MAO-B inhibitors and L-dopa at low doses. We used the dose 100:10 mg/kg of L-dopa:carbidopa given that in the dose-response relationship this dose did not lead to the reversal of hypokinesia (data not shown). We evaluated the dose of FCS005 (100 mg/kg) that showed the best response in the reserpine model. In this assay, FCS005 increased the number of cadres traversed showing a statistically significant difference compared to the control at 2 h ($p: 0.038$) and 24 h ($p: 0.018$) (figure 4).

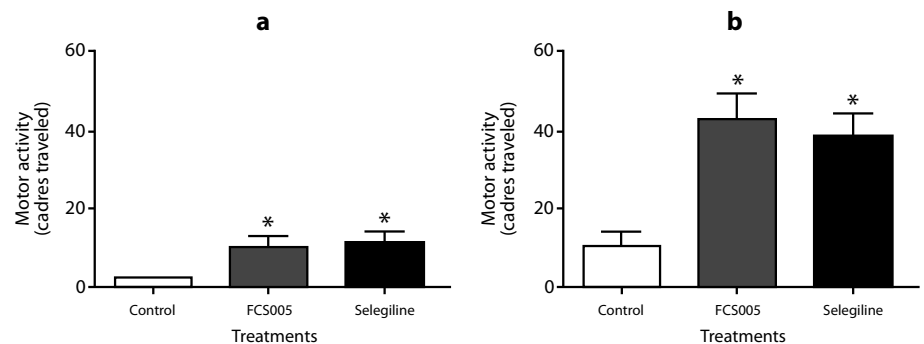


Figure 4. Effect of L-dopa/carbidopa and MAO-B inhibitors. Effects of the administration of levodopa/carbidopa (100/10 mg/kg) plus FCS005 (100 mg/kg), control (0 mg/kg) or selegiline (10 mg/kg) on motor activity at 2 h (a) and 24 h (b) after the administration of reserpine.

* $p < 0.05$ compared to control group ($n = 7-9$)

Anticataleptic effects

The treatments showed no cataleptic effects at time zero. L-dopa/carbidopa and FCS005 produced a significant decrease in the total catalepsy time using the horizontal bar test at 60 min ($p: 0.001$) (figure 5).

Antioxidant activity

Protein carbonyl groups and lipid peroxidation levels were lower in brain homogenates of mice treated with FCS005 and L-dopa/carbidopa compared to the control animals. The animals that did not receive haloperidol (basal state) presented lower levels than those of the control and treatments groups ($p < 0.001$) (figure 6).

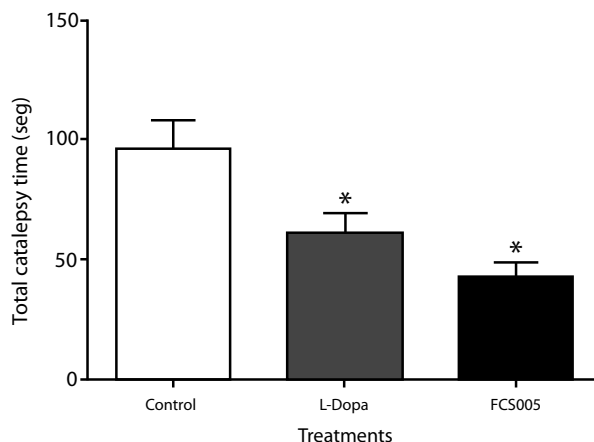


Figure 5. Anti-cataleptic effects. Catalepsy in mice was assessed using the horizontal bar test. Effects of administration of levodopa/carbidopa (400/40 mg/kg), FCS005 (100 mg/kg) or control (0 mg/kg) on catalepsy induced by haloperidol (3 mg/kg) at 60 min

* $p < 0.05$ compared to the control group ($n=8$)

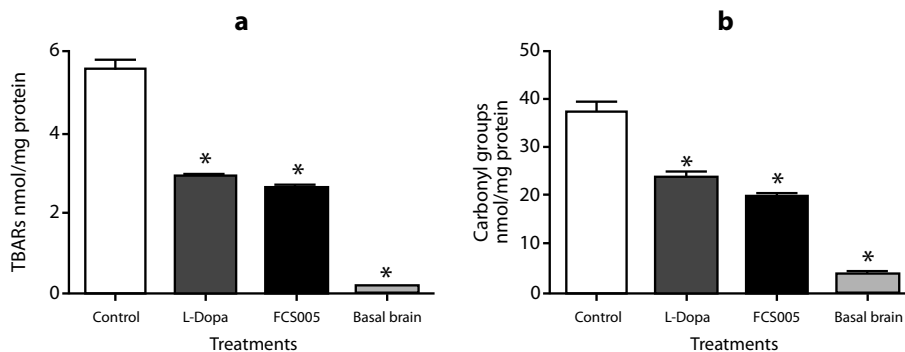


Figure 6. Antioxidant activity. Effect of FCS005 (50 mg/kg), control (0 mg/kg) or levodopa/carbidopa (400/40 mg/kg) on (a) lipid peroxidation and (b) the oxidation of carbonyl groups of proteins in brain homogenates of mice treated with haloperidol (1 mg/kg) for 10 days

* $p < 0.05$ compared to the control group ($n=8$)

***In vitro* inhibition of the A and B isoforms of MAO**

FCS005 presented selective inhibitory activity towards MAO-B. This coumarin analogue did not inhibit MAO-A isoform activity at the highest concentration tested (100 μM). The reference inhibitors and FCS005 did not interfere with the measurements because these drugs did not react directly with the Amplex™ Red reagent. The corresponding IC_{50} values and the selectivity index [IC_{50} (hMAO-A)]/[IC_{50} (hMAO-B)] are shown in table 1.

Table 1. *In vitro* inhibitory activities of reference compounds and FCS005 towards hMAO-A and hMAO-B isoforms^a

Compounds	hMAO-A (IC_{50})	hMAO-B (IC_{50})	Selectivity index ^b
FCS005	*	41.63 \pm 2.79 μM	> 2.4 ^c
Clorgiline	4.46 \pm 0.32 nM	61.35 \pm 1.13 μM	0.000073
Selegiline	67.25 \pm 1.02 μM	19.60 \pm 0.86 nM	3.431
Iproniazide	6.56 \pm 0.76 μM	7.54 \pm 0.36 μM	0.87

^a Each IC_{50} value is the mean \pm S.E.M. from five experiments ($n=5$).

^b hMAO-B selectivity ratios [IC_{50} (hMAO-A)]/[IC_{50} (hMAO-B)] for inhibitory effects of FCS005 compound and reference inhibitors

^c Values obtained under the assumption that the corresponding IC_{50} against hMAO-A is the highest concentration tested (100 μM)

* Inactive at 100 μM (highest concentration tested)

Discussion

The antiparkinsonian activity of FCS005 was evaluated in mice using the reserpine model. The effect of reserpine on spontaneous locomotor activity is frequently used as a model of motor disturbances in Parkinson's disease (24,31,32,33). Some drugs currently on the market were tested in this model suggesting it has predictive validity (24,33).

Hypokinesia occurs in mice because reserpine blocks the vesicular monoamine transporter and produces a profound and lasting decrease in catecholamines, a situation that results in the depletion of DA in all dopaminergic nerve terminals including the nigrostriatal pathway (14,18). FCS005 (100 mg/kg) caused the significant reversal of hypokinesia in the reserpine and levodopa models. This could be explained by the fact that the synthetic coumarin FCS005 showed selective inhibitory activity against hMAO-B *in vitro*. MAO inhibitors reduce the enzymatic degradation of dopamine by MAO, thus leading to an increase in monoamines and striatal dopaminergic activity and improving motor symptoms in Parkinson's disease (34,35). Dopamine acts on postsynaptic D₁ and D₂ receptors to control movement (36). The selective inhibitory activity on MAO type B prolongs the activity of both endogenously and exogenously derived dopamine, which represents an option either as monotherapy in early Parkinson's disease or as adjuvant therapy in patients treated with levodopa when they experience motor complications (35). Selegiline and rasagiline, selective inhibitors of MAO-B, are used in clinical practice to improve the response to L-dopa at later stages of the disease (7).

FCS005 at a dose of 50 mg/kg led to a significant decrease in motor activity in mice not treated with reserpine. However, this did not affect the evaluation in the models of reserpine and levodopa where the reversal of hypokinesia was evaluated. On the other hand, the decrease in motor activity at 24 h with all treatments could be attributed to habituation that occurs due to repeated exposure to the open field (37,38).

The coumarin analogue FCS005 showed anti-cataleptic effects in the haloperidol model. The animals presented catalepsy and muscular rigidity because haloperidol blocks nigrostriatal dopamine transmission (39,40). These symptoms may be analogous to the inability of Parkinson's disease patients to initiate movements (40). FCS005 did not show any cataleptic effects.

Some studies have shown that chronic administration of haloperidol induces increased levels of lipid peroxidation and decreased levels of antioxidant enzymes and reduced glutathione (41,42). Besides, the results of Martins, *et al.* (43) showed that TBARS increased in the striatum after the administration of haloperidol in repeated doses. In this study, an increase in the TBARS concentration was also observed, possibly because dopamine receptors were blocked by haloperidol leading to an increase in dopamine and, therefore, to the production of hydrogen peroxide and other toxic metabolites of dopamine (44,45). Hydrogen peroxide in the presence of Fe²⁺ and Cu²⁺ produces hydroxyl radical capable of oxidizing almost any cell structure, which leads to neurodegeneration and contributes to the development of pathologies (46). Antioxidants, free radical scavengers, and similar drugs have been potentially used in therapeutic development to prevent Parkinson's disease. The results of some authors suggest that coumarins and flavonoids can directly capture the reactive oxygen species (47). FCS005 had a significant protective effect against oxidative stress,

probably because MAO-B inhibitors can reduce oxidative stress by reducing H₂O₂ production, thus acting as neuroprotective agents (34).

FCS005 (3-methyl-7H-furo[3,2-g]-chromen-7-one) is a furocoumarin with a structure similar to that of psoralen, which is isolated from the plant *Psoralea corylifolia* L. and is used traditionally to treat ageing. Psoralen was demonstrated to exhibit *in vitro* inhibitory actions on MAO activities in rat brain mitochondria, preferentially inhibiting MAO-A activity over MAO-B activity (48) while FCS005 exhibited selective MAO-B inhibitory activity, which could be attributed to the substitution at position 3; this is the only difference between the two structures.

In conclusion, the coumarin analogue FCS005 synthesized in this research led to the reversal of hypokinesia in the reserpine and levodopa models of Parkinson's disease and demonstrated anticataleptic effects. Besides, it showed selective inhibitory activity towards MAO-B, as well as antioxidant activity. These results attribute interesting properties to FCS005 supporting further investigations on its potential as an antiparkinsonian agent including the use of models useful to assess not only the control of symptoms but, especially, neuroprotection.

References

1. Elbaz A, Carcaillon L, Kab S, Moisan F. Epidemiology of Parkinson's disease. Rev Neurol (Paris). 2016;172:14-26. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2015.09.012>
2. Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, *et al.* Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. Neurology. 2007;68:384-6. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000247740.47667.03>
3. Connolly BS, Lang AE. Pharmacological treatment of Parkinson disease: A review. JAMA. 2014; 311:1670-83. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3654>
4. Alexi T, Borlongan C, Faull R, Williams C, Clark R, Gluckman P, *et al.* Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. Prog Neurobiol. 2000;60:409-70. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00032-5](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00032-5)
5. Emborg M. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. J Neurosci Methods. 2004;139:121-43. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.08.004>
6. Gershanik OS. Improving L-dopa therapy: The development of enzyme inhibitors. Mov Disord. 2015;30:103-13. <https://doi.org/10.1002/mds.26050>
7. Finberg J. Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B; focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release. Pharmacol Ther. 2014;143:133-52. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.02.010>
8. Ariza S, Rueda D, Rincón J, Linares E, Guerrero M. Efectos farmacológicos sobre el sistema nervioso central inducidos por cumarina aislada de *Hygrophila tytttha* Leonard. Vitae. 2007;14:51-8.
9. Vergel N, López J, Orallo F, Viña D, Buitrago D, Olmo E, *et al.* Antidepressant-like profile and MAO-A inhibitory activity of 4-propyl-2H-benzo[h]-chromen-2-one. Life Sci. 2010;86:819-24. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.04.001>
10. Matos M, Viña D, Picciau C, Orallo F, Santana L, Uriarte E. Synthesis and evaluation of 6-methyl-3-phenylcoumarins as potent and selective MAO-B inhibitors. Bioorg Med Chem Lett. 2009;19:5053-5. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.07.039>
11. Matos M, Viña D, Quezada E, Picciau C, Delogu G, Orallo F, *et al.* A new series of 3-phenylcoumarins as potent and selective MAO-B inhibitors. Bioorg Med Chem Lett. 2009;19:3268-70. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.04.085>
12. Matos M, Viña D, Janeiro P, Borges F, Santana L, Uriarte E. New halogenated 3-phenylcoumarins as potent and selective MAO-B inhibitors. Bioorg Med Chem Lett. 2010;20:5157-60. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.07.013>
13. Matos M, Viña D, Vázquez-Rodríguez S, Uriarte E, Santana L. Focusing on new monoamine oxidase inhibitors: Differently substituted coumarins as an interesting scaffold. Curr Top Med Chem. 2012;12:2210-39. <https://doi.org/10.2174/1568026611212200008>

14. Matos M, Vilar S, González-Franco R, Uriarte E, Santana L, Friedman C, *et al.* Novel (coumarin-3-yl) carbamates as selective MAO-B inhibitors: Synthesis, in vitro and in vivo assays, theoretical evaluation of ADME properties and docking study. *Eur J Med Chem.* 2013;63:151-61. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.02.009>
15. Pisani L, Farina R, Nicolotti O, Gadaleta D, Soto-Otero R, Catto M, *et al.* In silico design of novel 2H-chromen-2-one derivatives as potent and selective MAO-B inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2015;89:98-105. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.029>
16. Epifano F, Molinaro G, Genovese S, Ngomba R, Nicoletti F, Curini M. Neuroprotective effect of prenyloxycoumarins from edible vegetables. *Neurosci Lett.* 2008;443:57-60. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.07.062>
17. Liu WB, Zhou J, Qu Y, Li X, Lu CT, Xie KL, *et al.* Neuroprotective effect of osthole on MPP⁺-induced cytotoxicity in PC12 cells via inhibition of mitochondrial dysfunction and ROS production. *Neurochem Int.* 2010;57:203-15. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.05.011>
18. Philippens I. Non-human primate models for Parkinson's disease. *Drug Discov Today Dis Models.* 2008;5:105-11. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2008.06.004>
19. Matos M, Rodríguez F, Borges F, Santana L, Uriarte E, Estrada M, *et al.* 3-Amidocoumarins as potential multifunctional agents against neurodegenerative diseases. *ChemMedChem.* 2015;10:2071-9. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500408>
20. Aguirre P, García O, Tapia V, Muñoz Y, Cassels BK, Núñez MT. Neuroprotective effect of a new 7,8-dihydroxycoumarin-based Fe²⁺/Cu²⁺ chelator in cell and animal models of Parkinson's disease. *ACS Chem Neurosci.* 2017;8:178-85. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00309>
21. Reglodi D, Renaud J, Tamas A, Tizabi Y, Socías SB, Del-Bel E, *et al.* Novel tactics for neuroprotection in Parkinson's disease: Role of antibiotics, polyphenols and neuropeptides. *Prog Neurobiol.* 2017;155:120-48. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.10.004>
22. Garazd M, Garazd Y, Ogorodniichuk A, Khilya V. Modified coumarins. Synthesis of substituted 5-(4-methoxyphenyl)-7H-furo [3,2-g] chromen-7-ones. *Chem Nat Compd.* 2002;38:539-48. <https://doi.org/10.1023/A:1022626402415>
23. National Center for Biotechnology Information. PubChem Open Chemistry Database Compound Summary for CID 608273. Accessed on: January 20, 2018. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/608273>
24. Tadaiesky M, Andreatini R, Vital M. Different effects of 7-nitroindazole in reserpine-induced hypolocomotion in two strains of mice. *Eur J Pharmacol.* 2006;535:199-207. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.02.004>
25. Schmidt W, Mayerhofer A, Meyer A, Kovar K. Ecstasy counteracts catalepsy in rats, an anti-parkinsonian effect? *Neurosci Lett.* 2002;330:251-4.
26. Wei L, Chen L. Effects of 5-HT in globus pallidus on haloperidol-induced catalepsy in rats. *Neurosci Lett.* 2009;454:49-52. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.02.053>
27. Hijova E, Nistiari F, Sipulova A. Changes in ascorbic acid and malondialdehyde in rats after exposure to mercury. *Bratis Lek Listy.* 2005;106:248-51.
28. Levine R, Garland D, Oliver C, Amici A, Climent I, Lenz A, *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990;186:464-78. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-H)
29. Baltacioglu E, Akalin FA, Alver A, Deger O, Karabulut E. Protein carbonyl levels in serum and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2008;53:716-22. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2008.02.002>
30. Yáñez M, Fraiz N, Cano E, Orallo F. Inhibitory effects of cis- and trans-resveratrol on noradrenaline and 5-hydroxytryptamine uptake and on monoamine oxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;344:688-95. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.190>
31. Colpaert F. Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rats. *Neuropharmacology.* 1987;26:1431-40.
32. Kaur S, Starr M. Antiparkinsonian action of dexamethorphan in the reserpine-treated mouse. *Eur J Pharmacol.* 1995;280:159-66.
33. Menzaghi F, Whelan K, Risbrough V, Rao T, Lloyd G. Interactions between a novel cholinergic ion channel agonist, SIB-1765F and L-DOPA in the reserpine model of Parkinson's disease in rats. *J. Pharmacol Exp Ther.* 1997;280:393-401.

34. Foley P, Gerlach M, Youdim M, Riederer P. MAO-B inhibitors: Multiple roles in the therapy of neurodegenerative disorders? *Parkinsonism Relat Disord.* 2000;6:25-47. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(99\)00043-7](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(99)00043-7)
35. Fernández H, Chen J. Monoamine oxidase-B inhibition in the treatment of Parkinson's disease. *Pharmacotherapy.* 2007;27:174S-85S. <https://doi.org/10.1592/phco.27.12part2.174S>
36. Fisher A, Biggs C, Eradiri O, Starr M. Dual effects of L-3,4-dihydroxyphenylalanine on aromatic L-amino acid decarboxylase, dopamine release and motor stimulation in the reserpine-treated rat: Evidence that behavior is dopamine independent. *Neuroscience.* 2000;95:97-111. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(99\)00406-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(99)00406-6)
37. Haleem DJ, Inam QU, Haleem MA. Effects of clinically relevant doses of methyphenidate on spatial memory, behavioral sensitization and open field habituation: A time related study. *Behav Brain Res.* 2015;281:208-14. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.12.031>
38. Deacon RM, Koros E, Bornemann KD, Rawlins JN. Aged Tg2576 mice are impaired on social memory and open field habituation tests. *Behav Brain Res.* 2009;197:466-8. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.09.042>
39. Wang X, Han C, Xu Y, Wu K, Chen S, Hu M, *et al.* Synthesis and evaluation of phenylxanthine derivatives as potential dual A2AR antagonists/MAO-B inhibitors for Parkinson's disease. *Molecules.* 2017;22:1-13. <https://doi.org/10.3390/molecules22061010>
40. Duty S, Jenner P. Animal models of Parkinson's disease: A source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol.* 2011;164:1357-91. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01426.x>
41. Bishnoi M, Chopra K, Kulkarni S. Involvement of adenosinergic receptor system in an animal model of tardive dyskinesia and associated behavioural, biochemical and neurochemical changes. *Eur J Pharmacol.* 2006;552:55-66. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.09.010>
42. Bishnoi M, Chopra K, Kulkarni S. Possible anti-oxidant and neuroprotective mechanisms of zolpidem in attenuating typical anti-psychotic-induced orofacial dyskinesia -A biochemical and neurochemical study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2007;31:1130-8. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.04.007>
43. Martins M, Petronilho F, Gomes K, Dai-Pizzol F, Streck E, Quevedo J. Antipsychotic induced oxidative stress in rat brain. *Neurotox Res.* 2008;13:63-9. <https://doi.org/10.1007/BF03033368>
44. Naidu P, Singh A, Kulkarni S. Quercetin, a bioflavonoid attenuated haloperidol induced orofacial dyskinesia. *Neuropharmacology.* 2003;44:1100-6. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(03\)00101-1](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(03)00101-1)
45. Singh A, Naidu P, Kulkarni S. Possible antioxidant and neuroprotective mechanisms of FK506 in attenuating haloperidol-induced orofacial dyskinesia. *Eur J Pharmacol.* 2003;477:87-94. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)02124-1](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)02124-1)
46. Pavshintsev VV, Podshivalova LS, Frolova OY, Belopolskaya OA, Averina OA, Kushnir EA, *et al.* Effects of mitochondrial antioxidant SkQ1 on biochemical and behavioural parameters in a Parkinsonism model in mice. *Biochemistry (Mosc).* 2003;82:1513-20. <https://doi.org/10.1134/S0006297917120100>
47. Molina-Jiménez M F, Sánchez-Reus M I, Benedi J. Effect of fraxetin and myricetin on rotenone-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells: Comparison with N-acetylcysteine. *Eur J Pharmacol.* 2003;472:81-7. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01902-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01902-2)
48. Kong LD, Tan RX, Woo AY, Cheng CH. Inhibition of rat brain monoamine oxidase activities by psoralen and isopsoralen: Implications for the treatment of affective disorders. *Pharmacol Toxicol.* 2001;88:75-80.

Original article

Cost-utility analysis of an implantable cardioverter-defibrillator for the treatment of patients with ischemic or non-ischemic New York Heart Association class II or III heart failure in Colombia

Sara Atehortúa¹, Juan Manuel Senior^{2,3}, Paula Castro⁴, Mateo Ceballos⁵, Clara Saldarriaga², Nelson Giraldo^{2,6}, Guillermo Mora^{7,8}

¹ Departamento de Economía, Facultad de Ciencias Económicas, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Departamento de Cardiología Clínica y Cardiología Intervencionista, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

³ Grupo de Rehabilitación en Salud, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

⁴ Grupo de Economía de la Salud, Facultad de Ciencias Económicas, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

⁵ Instituto de Evaluación Tecnológica en Salud, Bogotá, D.C., Colombia

⁶ Grupo de Epidemiología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

⁷ Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

⁸ Servicio de Electrofisiología, Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia

Introduction: The use of an implantable cardioverter-defibrillator reduces the probability of sudden cardiac death in patients with heart failure.

Objective: To determine the cost-utility relationship of an implantable cardioverter-defibrillator compared to optimal pharmacological therapy for patients with ischemic or non-ischemic New York Heart Association class II or III (NYHA II-III) heart failure in Colombia.

Materials and methods: We developed a Markov model including costs, effectiveness, and quality of life from the perspective of the Colombian health system. For the baseline case, we adopted a time horizon of 10 years and discount rates of 3% for costs and 3.5% for benefits. The transition probabilities were obtained from a systematic review of the literature. The outcome used was the quality-adjusted life years. We calculated the costs by consulting with the manufacturers of the device offered in the Colombian market and using national-level pricing manuals. We conducted probabilistic and deterministic sensitivity analyses.

Results: In the base case, the incremental cost-effectiveness ratio for the implantable cardioverter-defibrillator was USD\$ 13,187 per quality-adjusted life year gained. For a willingness-to-pay equivalent to three times the gross domestic product per capita as a reference (USD\$ 19,139 in 2017), the device would be a cost-effective strategy for the Colombian health system. However, the result may change according to the time horizon, the probability of death, and the price of the device.

Conclusions: The use of an implantable cardioverter-defibrillator for preventing sudden cardiac death in patients with heart failure would be a cost-effective strategy for Colombia. The results should be examined considering the uncertainty.

Keywords: Heart failure; defibrillators; implantable; death, sudden, cardiac; cost-benefit analysis; Colombia.

Análisis de costo-utilidad del desfibrilador cardioversor implantable para el tratamiento de pacientes colombianos con insuficiencia cardíaca isquémica o no isquémica de clase II o III según la *New York Heart Association*

Introducción. El uso del desfibrilador cardioversor implantable reduce la probabilidad de muerte súbita en pacientes con insuficiencia cardíaca.

Objetivo. Determinar la relación de costo-utilidad de un desfibrilador cardioversor implantable comparado con la terapia farmacológica óptima para pacientes con insuficiencia cardíaca isquémica o no isquémica de clase II o III según la *New York Heart Association* (NYHA II-III) en Colombia.

Materiales y métodos. Se desarrolló un modelo de Markov que incluyó los costos, la efectividad y la calidad de vida desde la perspectiva del sistema de salud colombiano. Para el caso de base, se adoptó un horizonte temporal de 10 años y una tasa de descuento de 3 % para los costos y de una 3,5 % para los beneficios. Las probabilidades de transición se obtuvieron de una revisión sistemática de la literatura. Los años de vida ajustados

Received: 06/12/17
Accepted: 29/10/18
Published: 08/11/18

Citation:

Atehortúa SC, Senior JM, Castro P, Ceballos M, Saldarriaga C, Mora G, *et al.* Cost-utility analysis of an implantable cardioverter-defibrillator for the treatment of patients with ischemic or non-ischemic New York Heart Association class II or III heart failure in Colombia. *Biomédica*. 2019;39:502-12. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4235>

Corresponding author:

Sara Atehortúa, Departamento de Economía, Facultad de Ciencias Económicas, Universidad de Antioquia, Calle 70 N° 52-21, bloque 13, oficina 114, Medellín, Colombia
Teléfonos: (574) 219 5800 y 219 5820
sara.atehortua@udea.edu.co; saritac2005@gmail.com

Author contributions:

Juan Manuel Senior, Clara Saldarriaga, and Nelson Giraldo: Revision of the clinical evidence and contribution to the design of the decision model
Guillermo Mora and Clara Saldarriaga: Participation in the cost estimation
Sara Atehortúa, Paula Castro, and Mateo Ceballos: Design of the decision model, costs estimation, and results interpretation
Sara Atehortúa, Mateo Ceballos, and Juan Manuel Senior: Writing of the manuscript
All authors reviewed and validated the final manuscript.

Funding:

Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias and Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia

Conflicts of interest:

Clara Saldarriaga has been consultant for Novartis and Medtronic and speaker for Pfizer and Servier. All other authors declare no competing interests.

por calidad se usaron como resultado de salud. Para estimar los costos unitarios se usaron manuales tarifarios nacionales y, para los costos del dispositivo, se consultó a los fabricantes que lo comercializan en el mercado colombiano. Se hicieron análisis de sensibilidad probabilísticos y determinísticos.

Resultados. En el caso base el costo adicional por año de vida ajustado por calidad ganado con el desfibrilador cardioversor implantable fue de USD\$ 13,187. Usando un umbral de tres veces el producto interno bruto per cápita como referencia (USD\$ 19.139 en 2017), el dispositivo sería costo-efectivo para el sistema de salud colombiano. Sin embargo, este resultado depende del horizonte temporal, de la probabilidad de muerte y del precio del dispositivo.

Conclusiones. El uso de un desfibrilador cardioversor implantable sería una estrategia costo-efectiva para Colombia, aunque los resultados deben examinarse teniendo en cuenta la incertidumbre.

Palabras clave: insuficiencia cardíaca; desfibriladores; muerte súbita cardíaca; análisis costo-beneficio; Colombia.

Heart failure is an important medical, social, and economic problem. More than 37.7 million people worldwide suffer from this condition and in 2009 alone, 870,000 new cases per year occurred from 2005 to 2011 were registered in the United States (1,2). Heart failure is associated with a high financial burden, consuming approximately 2% of the total health costs in developed countries (3). The costs of care for this condition totaled 30.7 billion dollars for the United States health system in 2012 (4).

Despite the scarce epidemiological data in the majority of developing countries, it is estimated that the prevalence of heart failure among the adult population ranges from 2 to 3% and tends to increase with age (5). In Colombia, there are no accurate disease prevalence registries, but it is known that 40 % of hospitalizations due to cardiovascular diseases are associated with heart failure (6).

Although optimal pharmacological therapy (OPT) is highly recommended for the management of patients with heart failure, it is not always an effective alternative for the prevention of sudden cardiac death (7), one of the principal causes of death in patients with this condition. For this reason, the implantable cardioverter-defibrillator (ICD) was developed; it is a device that has been shown to reduce the likelihoods of death from all causes and of sudden cardiac death in patients with ischemic and non-ischemic heart failure and left ventricular systolic dysfunction (LVSD) (8,9).

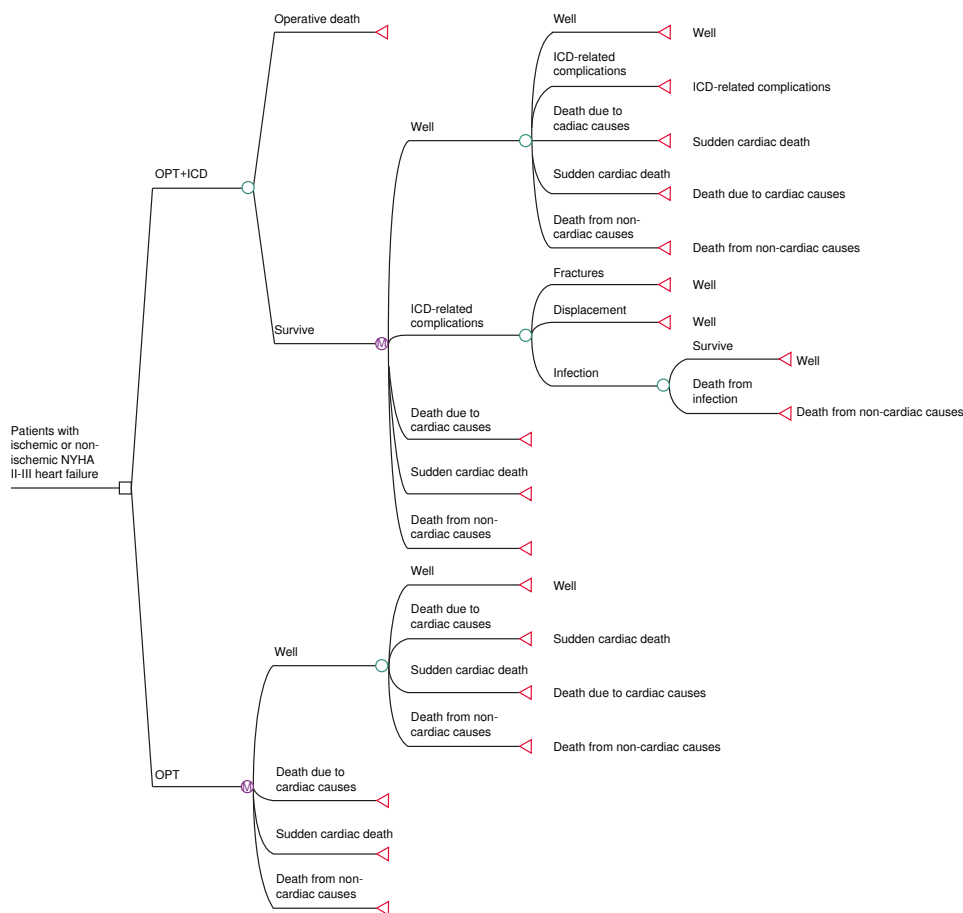
The implantation of an ICD is increasingly common in Colombia, and its high cost could imply an important increase in the financial burden for the health system. The objective of this study was to determine the cost-effectiveness relationship between the use of an ICD and OPT compared to the OPT alone to avoid sudden cardiac death in patients with heart failure from the perspective of the Colombian health system.

Materials and methods

This cost-utility analysis was conducted from the perspective of the Colombian health system including the direct care costs financed by the health system. The study population was composed by persons with NYHA II-III functional heart failure, an ejection fraction < 35%, LVSD, without a previous history of sudden cardiac death, and with ischemic or non-ischemic cardiomyopathy. The analysis was conducted in this group of people because they are at greater risk of sudden cardiac death and would, therefore, benefit most from an ICD implantation (8,9). The initial age of our hypothetical cohort was 60 years. For the base case, a time horizon of 10 years and discount

rates of 3% for costs and 3.5% for benefits were assumed according to the recommendations of the methodological guide for developing economic evaluations within Colombia's clinical practice guidelines (10).

To estimate the expected costs and benefits from each alternative, a decision tree that simulated outcomes associated with the ICD surgical implantation phase and a Markov model with annual cycles were employed to simulate short and long-term effects (figure 1). Patients who underwent an ICD implantation could either experience post-operative death (death occurring during the first 30 days after the surgical procedure) or they could survive. They could also enter into one of the stages that make up the Markov model: Suffering sudden cardiac death, non-sudden cardiac death, or death due to non-cardiac causes; they could experience no event, or they could experience some ICD-related complication. Fractures, displacement, and severe infection were the ICD related complications considered because they usually are more frequent and imply significant cost increases. For severe infections, the possibility of the patient dying from such cause was considered. For the OPT alternative, the same outcomes were considered, but post-operative ICD-related death and complications were excluded.



OPT: Optimal pharmaceutical therapy; ICD: Implantable cardioverter defibrillator; NYHA II-III: New York Heart Association Classes II-III

Figure 1. Decision model

The effectiveness outcome employed was the quality-adjusted life years (QALY). This outcome focuses on patients and combines the years of life gained and the health-related quality of life score for patients with heart failure.

Transition probabilities were extracted from clinical studies found in a systematic review of the literature in Medline, EMBASE, and Cochrane Library databases included in a Colombian clinical practice guideline for heart failure (CPG-HF) (11). The search terms used were heart failure, cardiac failure, myocardial failure, heart decompensation, NYHA, defibrillators, implantable, and cardioverter-defibrillator.

From the available evidence, we used a meta-analysis aggregating evidence from various clinical trials (8) conducted in ischemic and non-ischemic patients, which focused only on ICD (without including the effects of cardiac resynchronization therapy) and excluded heterogeneous trial results. To calculate the probability of all causes of death and sudden cardiac death in the ICD branch of the tree, we multiplied the probability of death in the OPT branch (baseline) by the relative risk (RR) reported in the meta-analysis (0.73 and 0.4, respectively). Using this procedure, we obtained the probabilities reported in table 1. The probability of operative death used in the base case was also obtained from this meta-analysis (8).

The probability of non-sudden cardiac death was obtained by subtracting all-cause mortality from the sudden cardiac death and death from other non-cardiac causes. Age-adjusted probability of cardiac death due to all causes was taken from the statistics of the Colombian *Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas* (DANE). For the life tables by age groups, we considered mortality due to heart failure (CIE-10 303 and 306 codes) and mortality from other causes (those reported).

Table 1. Model parameters, base case estimates, and data sources

Alternative	Variable	Base case estimates	Distribution parameters (alpha, beta, min-max)	Data source
Probabilities				
ICD	Operative death	0	$\alpha=0; \beta=2,774$	(8)
	All-cause mortality	0.178	$\alpha=385; \beta=1,790$	(8)
	Sudden cardiac death	0.037	$\alpha=110; \beta=2,825$	(8)
	ICD-related complications	0.062	$\alpha=169; \beta=2,554$	(8)
	Device movement	0.5	$\alpha=16; \beta=16$	(8)
	Infection	0.2	$\alpha=10; \beta=40$	(8)
	Death from infection	0.21	$\alpha=1.93; \beta=7.27$	(12, 13)
OPT	All-cause mortality	0.284	$\alpha=604; \beta=1,522$	(8)
	Sudden cardiac death	0.108	$\alpha=317; \beta=2,605$	(8)
Utility weight				
	Well (equal to both alternatives)	0.845	$\alpha=6.164; \beta=1.131$	(14)
	ICD-related complications	0.75	N/A	(15, 16)
Medical and procedure related costs				
OPT	Medications, consultations, and laboratory tests	313.04	282.08 – 343.95	
ICD	Device price	7,259.46	6,539.44 - 7,793.12	
	Implant procedure	300.28	289.80 - 337.59	
	Post-implant hospitalization	73.39	70.11 - 84.01	
	Major infection	194.17	184.57 - 223.73	
	Fracture/Displacement	187.83	180.60 - 213.83	

OPT: Optimal pharmaceutical therapy; ICD: Implantable cardioverter defibrillator; N/A: Not applicable

Given that the probability of death due to infection was not reported in any of the clinical trials available, we used the information reported in economic evaluations of ICD use in patients with heart failure (12). The model assumed that the benefits of the ICD found in the follow-up of the clinical trials were constant and could be extrapolated to all time frames proposed. However, considering age-adjusted probabilities, we considered an increase in the mortality rate over time for a more realistic scenario.

For all transition probabilities of the model, beta distributions with α and β parameters were constructed based on population data. For the probability of death by infection, α and β parameters were constructed from the mean and standard deviation of the estimates.

To determine utility weights for the model states, we reviewed the Tufts University's Cost-Effectiveness Analysis (CEA) Registry to obtain those used in heart failure clinical trials, as well as multiple estimates from cohort studies. For the base case, we chose data calculated in the Multicenter Automatic Defibrillator Implantation Trial—Cardiac Resynchronization Therapy (MADIT-CRT) clinical trial for the “well” state (13) due to its proximity to the population, the alternatives analyzed, and the detail of the data presented while for the ICD “complications” state, the calculation was taken from the literature (14,15). It was assumed that ICD implantation did not change the quality of life of the patients who remained in the well state of the Markov model. The weights used in the base case are shown in table 1.

The direct medical costs associated with each alternative and branch of the model were calculated based on the identification and measurement of the resources consumed. This calculation was performed through the construction of a type-case according to the review of the CPG-HF clinical recommendations and from health care protocols of a Colombian hospital. This type-case was validated and modified based on an informal consensus of general internists and cardiologists who are experts in the field (11). Details regarding the units of measurement and the frequency of resources included can be found in the CPG-HF (11).

To calculate the cost of the procedures, we used the Colombian *Instituto de Seguros Sociales* tariffs from 2001 with a 30% adjustment for the base case and 25% and 48% adjustments for the minimum and maximum values, respectively. According to the methodological guide for developing economic evaluations in Colombia, these adjustments update the costs of the procedures to the current conditions of the Colombian market (10).

The unit prices of medications were calculated with the information reported in the institution-laboratory channel of the Colombian pricing and medication information system for 2017. The minimum, mean, and maximum prices of each presentation correspond to the weighted estimates of the different medication presentations, which include both generic and brand name drugs.

The price of the ICD was obtained from the quotations of two companies that manufacture and market this type of device in the country. In the base case, we considered the average prices of the two types of devices (single- and dual-chamber). Supposedly, the device needs a replacement every 5 years and the costs associated with this procedure correspond exclusively to the implant of the device battery and does not include the cost of the electrodes and wires. The average ICD price was calculated in USD\$ 7,259.46 with a minimum price of USD\$ 6,539.44 and a maximum of USD\$ 7,793.12.

To determine the costs associated with the OPT, we included the standard medical management with three types of basic medications: Angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI) or angiotensin II receptor antagonists (ARA II), beta-receptor blockers, and diuretics as reviewed by specialists, as well as some laboratory exams and diagnostic aids. The cost of the OPT used in the base case is shown in table 1.

For the ICD-associated costs, we also considered OPT management, the price of the device (including the cardioverter-defibrillator, the electrodes, and the wires), and the costs of the implantation surgery and the subsequent recovery hospitalization. Details regarding the specific resources included in each component can be found in the CPG-HF (11). The prices of all of the elements making up the total cost of the ICD considered in the base case are shown in table 1.

In addition to the costs of the comparison alternatives, we considered the resources consumed in the treatment of ICD complications. In the initial emergency procedures, we included care for severe infection, antibiotic treatment, consultation with specialists, and the price of the electrode removal surgery price and replacement with a new device (which included the implantation procedure and subsequent hospitalization). Electrode displacement or fracture included emergency care, consultations, and repositioning procedures. The additional cost associated with each complication for the base case is shown in table 1 considering that in the case of severe infection, the cost of a new ICD device should be added.

To address uncertainty, we conducted deterministic sensitivity analyses of the cost of the device and the ICD replacement time, as well as of the probability of death due to all causes over time. Additionally, we did a tornado analysis to assess the impact of all the variables in the results. Finally, we performed a subgroup analysis for ischemic and non-ischemic patients using the different data provided by Theuns, *et al.* (8).

We also performed a probabilistic sensitivity analysis with 10,000 Monte Carlo simulations using beta distributions for transition probabilities and utility weights and uniform distributions for costs. The distribution parameters for the inputs of the model are presented in table 1.

To determine the relationship between costs and QALY, we used the incremental cost-effectiveness ratio (ICER), which was compared with a cost-effectiveness threshold. Although the explicit definition of the threshold is a controversial topic, this study followed the recommendation of the World Health Organization of a threshold between 1 and 3 times the country's per capita gross domestic product (GDP) (16). According to the official data from Colombia's central bank, the threshold for 2017 ranged between USD\$ 6,308 and USD\$ 19,139. The model and the statistical analyses were done using TreeAge Pro 2013 (TreeAge Software Inc., Williamstown, MA). Costs in US dollars (USD) were calculated using the representative exchange rate for the Colombian market in 2017 reported by the country's central bank in COP\$ 2,951.32 per dollar.

Results

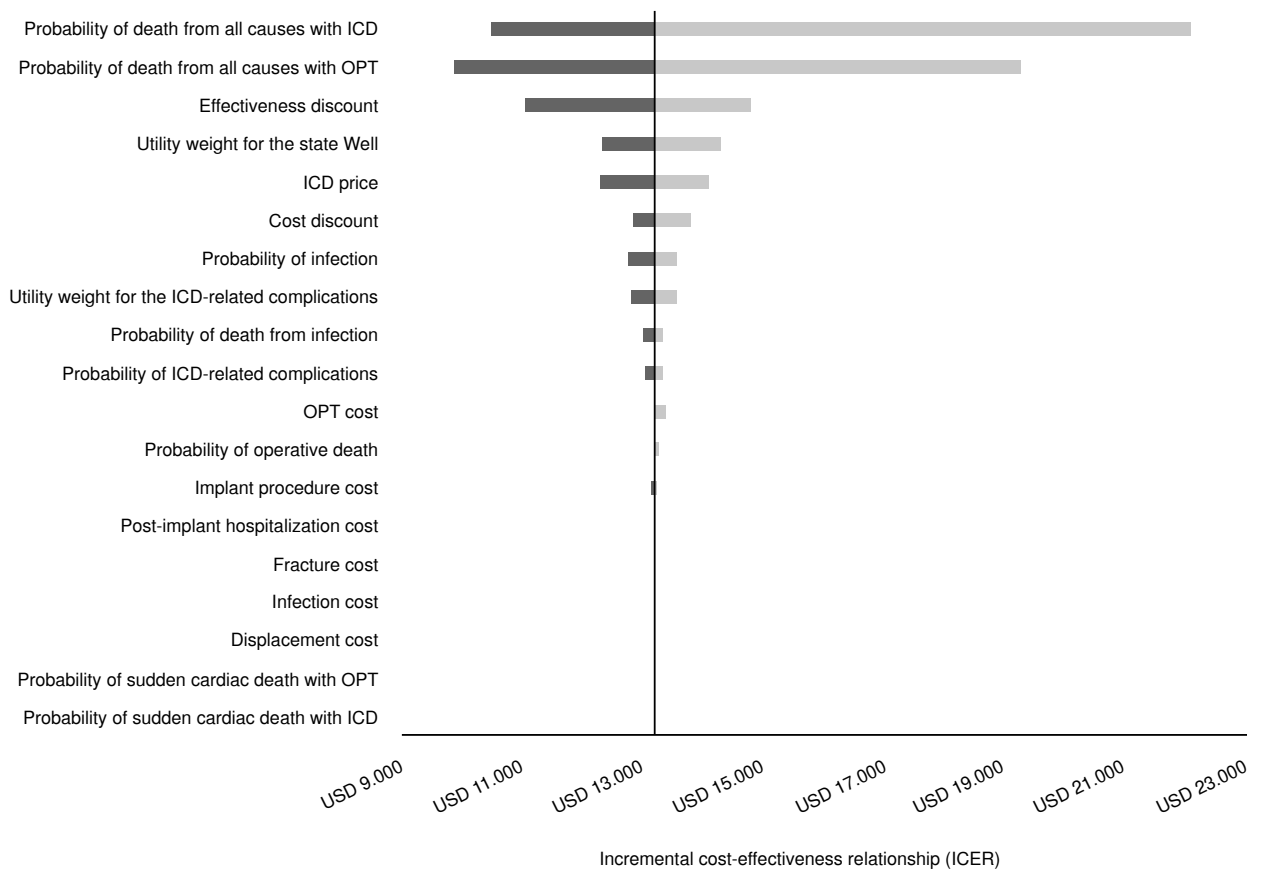
In the base case and over a time horizon of 10 years, the cost for the ICD per QALY gained was USD\$ 13,187. This result led to the conclusion that the device would be a cost-effective alternative for the Colombian health system,

as it did not exceed USD\$ 19,139, i.e., the equivalent of three times the Colombian per capita GDP for 2017. However, when we considered a time horizon of 5 years, the ICER reached USD\$ 20,569, which is higher than the threshold used (table 2).

Table 2. Cost-effectiveness of OPT compared to OPT plus ICD

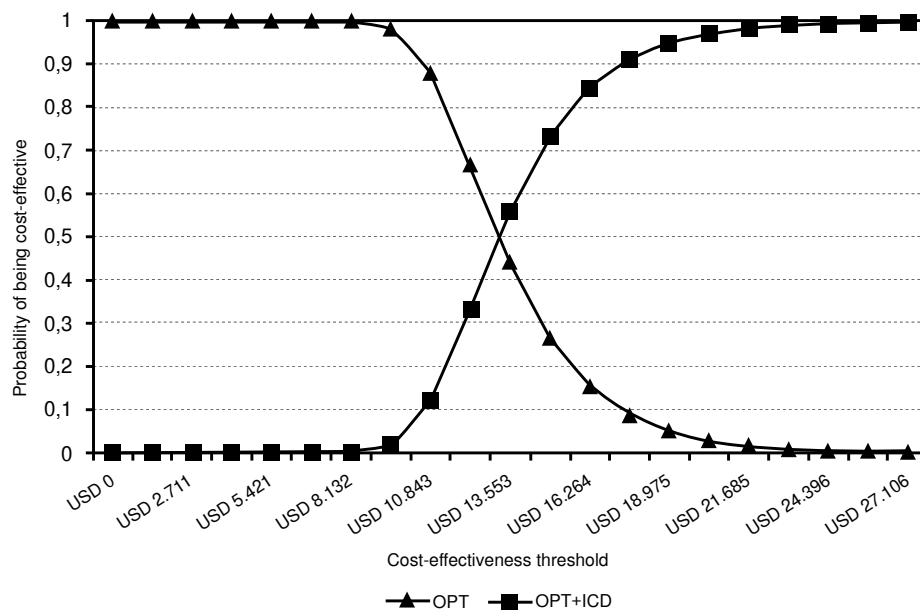
Strategy	Costs (USD)	Incremental cost	QALY	Incremental QALY	ICER
Base-case					
OPT	974		2.6056		
OPT + ICD	10,992	10,018	3.3653	0.7596	13,187
Sensitivity analysis - time horizon (5 and 20 years)					
OPT	890		2.3859		
OPT + ICD	10,322	9,432	2.8445	0.4585	20,569
OPT	987		2.6385		
OPT + ICD	11,194	10,207	3.5225	0.8840	11,546
Analysis by subgroups (ischemic and non-ischemic)					
OPT	973		2.6029		
OPT + ICD	11,314	10,341	3.5449	0.9420	10,977
OPT	1,243		3.3146		
OPT + ICD	12,252	11,008	4.0488	0.7342	14,992

OPT: Optimal pharmaceutical therapy; ICD: Implantable cardioverter defibrillator; ICER: Incremental cost-effectiveness ratio; QALY: Quality-adjusted life years



OPT: Optimal pharmaceutical therapy; ICD: Implantable cardioverter defibrillator

Figure 2. Tornado diagram of the one-way sensitivity analysis



OPT: Optimal pharmaceutical therapy; ICD: Implantable cardioverter defibrillator

Figure 3. Cost-effectiveness acceptability curve

When considering a device-replacement time of 7 years, the ICER considerably decreased to USD\$ 11,865. Furthermore, assuming that all variables kept constant over time but modifying the ICD price, we still found it to be a cost-effective alternative provided that its cost did not exceed USD\$ 10,685.

When the cost-effectiveness relationship of the ICD was analyzed for ischemic patients, we calculated a cost of USD\$ 10,977 per QALY gained while for non-ischemic patients this value increased to USD\$ 14,992. Considering a threshold of USD\$ 19,139, we concluded that the ICD was a cost-effective alternative for both types of patients, although a better relationship between costs and QALY was found for ischemic patients (table 2).

The tornado analysis allowed us to conclude that the probability of death variables was more relevant than others to change the result obtained in the base case (figure 2). Finally, in the probabilistic sensitivity analysis, if the willingness to pay per QALY equaled USD\$ 19,139, the probability that the ICD would be cost-effective was 95.1% (figure 3).

Discussion

The results of this economic analysis suggest that the ICD would be a cost-effective alternative for the Colombian health system in the treatment of patients with both ischemic and non-ischemic heart failure, an ejection fraction <35%, LVSD, and functional class NYHA II-III over a time horizon of 10 years. This was consistent as long as its price did not exceed USD\$ 10,685. The decision also depended largely on the threshold decided upon, as the base case results were sensitive to this choice.

These results are similar to other economic evaluations published in developed countries, which have found that although the ICD implies an increase in cost for the health system, it is cost-effective at a patient-population level as its use significantly reduces mortality (14,15,17,18). However, the majority of the economic evaluations published have been

designed in the context of developed countries and, as such, they respond to different characteristics from those in Colombia, which make them not completely comparable.

To the best of our knowledge, only two evaluations in the Latin American context have been published (12,19). The first found that the ICD was not cost-effective for the Brazilian health system but it had a better cost-effectiveness relationship for patients at greater risk of sudden cardiac death. The second showed heterogeneous results depending on the cohort of patients and the specific Argentinian health sub-system.

The main difference between our results and those from these two papers relies on the effectiveness source used. While the Brazilian study used data from a local cohort of patients and a meta-analysis, our research resorted to data from a recent international aggregate study, which directly impacts the cost-effectiveness estimation. Similarly, the Argentinian study considered three randomized clinical trials independently and not aggregated.

Recently, the Danish Study to Assess the Efficacy of ICD in Patients with Non-Ischemic Systolic Heart Failure on Mortality (DANISH) reported the lack of any survival benefit of ICD in patients with non-ischemic cardiomyopathy, which could alter the results of cost-utility analyses (20,21). However, the study did not address the mortality effects in non-ischemic cardiomyopathy patients who only had ICD. On the other hand, a new meta-analysis including the DANISH trial found a decrease in mortality in this population (22,23).

Some of the limitations of this study are related to the probabilities of death, which are the more sensitive variables for cost-effectiveness conclusions. Estimating probabilities for the Colombian population could be difficult because we would need information from a randomized clinical trial currently not available. This forced us to use probabilities obtained from the best clinical evidence available. A broad methodological discussion about clinical evidence can be found in the CPG-HF recommendations (11).

Another limitation is the lack of weighted utility estimates for Colombia. The results could vary if the health estimates to be included in the Markov model were different for the Colombian population. Estimating valid utility values for the local setting is a research effort that could make the cost utility analysis more robust in the present study and in future ones conducted in the country, as the QALY constructed would correspond to the Colombian population.

Concerning costs, one limitation that should be mentioned stems from the fact that the ICD pricing data were obtained via direct quotation from two of the four companies that manufacture and distribute the device in the Colombian market, as there are no institutional registries for determining whether only these companies effectively sell the devices. More importantly, no systematic information on the prices that care providers and insurers pay were available to establish whether differences in contracts or operating margins could modify the prices actually paid compared to those in the market.

Assuming that five-year replacement costs exclude those costs of the electrodes and other accessories could be a limitation, as they could require replacement in some cases either because they no longer work adequately or due to complications in the procedure. Unfortunately, there are no data in

Colombia to establish the replacement percentage required for electrodes and other accessories. We hope such a percentage would be minimum, given that the elective change rate varies between 1% and 5% depending on the type of electrode used (24).

Another possible limitation lies on the OPT costs, as we used the weighted average per molecule for an important group of medications in the base case. For renin-angiotensin-aldosterone system-blocking medications, for example, we used the weighted average, which includes both ARA IIs and ACE inhibitors, although these are indicated only for patients who do not tolerate the other medication. There is currently no information to establish the proportion of patients who use one or the other group of medications to build a base case more in line with the Colombian reality. Additionally, it is not possible to know whether all patients who use an ARA II do so because of intolerance to ACE inhibitors or if the medication was prescribed from the beginning of their pharmacological treatment. Thus, we deemed that the best way to present this cost was to consider both groups of medications.

Cardiovascular disease is one of the top five causes of death in the world and it represents an important burden for the health systems. Our study provides comparative evidence about costs and effectiveness very useful for Colombian and Latin American health authorities at micro and macro levels.

Acknowledgements

The authors thank the developer team of the Colombian clinical practice guidelines for the prevention, diagnosis, and treatment of heart failure for their comments and contributions to the study.

References

1. McMurray JJ, Petrie MC, Murdoch DR, Davie AP. Clinical epidemiology of heart failure: Public and private health burden. *Eur Heart J*. 1998;19:9-16.
2. Ziaeian B, Fonarow GC. Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2016;13:368-78. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.25>
3. Berry C, Murdoch DR, McMurray JJ. Economics of chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2001;3:283-291. [https://doi.org/10.1016/S1388-9842\(01\)00123-4](https://doi.org/10.1016/S1388-9842(01)00123-4)
4. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, *et al*. Heart disease and stroke statistics: 2015 update: A report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics. *Circulation*. 2015;131:29-322. <https://doi.org/10.1161/CIR.000000000000152>
5. Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8:30-41. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2010.165>
6. Tamayo D, Rodríguez V, Rojas M, Rincón M, Franco C, Ibarra M, *et al*. Costos ambulatorios y hospitalarios de la falla cardiaca en dos hospitales de Bogotá. *Acta Médica Colombiana*. 2013;38:208-12.
7. Haas G, Abraham W. Comprehensive pharmacologic management strategies for heart failure. In: Yu C, Hayes D, Auricchio A, editors. *Cardiac resynchronization therapy*. Massachusetts: Blackwell; 2008. p. 15-34.
8. Theuns DA, Smith T, Hunink MG, Bardy GH, Jordaens L. Effectiveness of prophylactic implantation of cardioverter-defibrillators without cardiac resynchronization therapy in patients with ischaemic or non-ischaemic heart disease: A systematic review and meta-analysis. *Europace*. 2010;12:1564-1570. <https://doi.org/10.1093/europace/euq329>
9. Ezekowitz JA, Rowe BH, Dryden DM, Hooton N, Vandermeer B, Spooner C, *et al*. Systematic review: Implantable cardioverter defibrillators for adults with left ventricular systolic dysfunction. *Ann Intern Med*. 2007;147:251-262. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-147-4-200708210-00007>

10. Ministerio de la Protección Social, Colciencias, Centro de Estudios e Investigación en Salud de la Fundación Santa Fe de Bogotá, Escuela de Salud Pública de la Universidad de Harvard. Guía metodológica para el desarrollo de Guías de atención integral en el Sistema General de Seguridad Social en Salud Colombiano. Accessed on: October 1, 2018. Available at: <https://www.minsalud.gov.co/salud/Documents/Gu%C3%ADa%20Metodol%C3%B3gica%20para%20la%20elaboraci%C3%B3n%20de%20gu%C3%ADas.pdf>
11. Ministerio de Salud y Protección Social, Colciencias, Universidad de Antioquia. Guía de práctica clínica para la prevención secundaria, diagnóstico, tratamiento y rehabilitación de la falla cardíaca en población mayor de 18 años clasificación B, C y D: Guía completa. Sistema General de Seguridad Social en Salud. Accessed on: October 1, 2018. Available at: http://gpc.minsalud.gov.co/gpc_sites/Repositorio/Conv_637/GPC_falla_cardiaca/GPC%20Falla%20Cardiaca%20Profesionales%20No%2053.pdf
12. Ribeiro RA, Stella SF, Camey SA, Zimmerman LI, Pimentel M, Rohde LE, *et al.* Cost-effectiveness of implantable cardioverter-defibrillators in Brazil: Primary prevention analysis in the public sector. *Value Health.* 2010;13:160-168. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4733.2009.00608.x>
13. Noyes K, Veazie P, Hall WJ, Zhao H, Buttaccio A, Thevenet-Morrison K, *et al.* Cost-effectiveness of cardiac resynchronization therapy in the MADIT-CRT trial. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2013;24:66-74. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.2012.02413.x>
14. Sanders GD, Kong MH, Al-Khatib SM, Peterson ED. Cost-effectiveness of implantable cardioverter defibrillators in patients ≥ 65 years of age. *Am Heart J.* 2010;160:122-31. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2010.04.021>
15. Cowie MR, Marshall D, Drummond M, Ferko N, Maschio M, Ekman M, *et al.* Lifetime cost-effectiveness of prophylactic implantation of a cardioverter defibrillator in patients with reduced left ventricular systolic function: Results of Markov modelling in a European population. *Europace.* 2009;11:716-26. <https://doi.org/10.1093/europace/eup068>
16. World Health Organization. Macroeconomics and Health: Investing in health for economic development. Report for the Commission on macroeconomics and health. Accessed on: October 1, 2018. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42435/1/924154550X.pdf>
17. Smith T, Jordaens L, Theuns DA, van Dessel PF, Wilde AA, Hunink MG. The cost-effectiveness of primary prophylactic implantable defibrillator therapy in patients with ischaemic or non-ischaemic heart disease: A European analysis. *Eur Heart J.* 2013;34:211-219. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs090>
18. Gandjour A, Holler A, Dipl-Ges-Ök, Adarkwah CC. Cost-effectiveness of implantable defibrillators after myocardial infarction based on 8-year follow-up data (MADIT II). *Value Health.* 2011;14:812-7. <https://doi.org/10.1016/j.jval.2011.02.1180>
19. Alcaraz A, González-Zuelgaray J, Augustovski F. Costo-efectividad del cardiodesfibrilador implantable en pacientes con factores de riesgo de muerte súbita en Argentina. *Value Health.* 2011;14:33-38. <https://doi.org/10.1016/j.jval.2011.05.030>
20. Epstein LM, Love CJ, Wilkoff BL, Chung MK, Hackler JW, Bongiorno MG, *et al.* Superior vena cava defibrillator coils make transvenous lead extraction more challenging and riskier. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61:987-989. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.12.014>
21. Køber L, Thune JJ, Nielsen JC, Haarbø J, Videbæk L, Korup E, *et al.* Defibrillator implantation in patients with nonischemic systolic heart failure. *N Engl J Med.* 2016;375:1221-1230. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1608029>
22. Narayanan A, Reddy V, Deshmukh B, Adabag B. Efficacy of implantable cardioverter-defibrillator therapy in patients with nonischemic cardiomyopathy: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *JACC Clin Electrophysiol.* 2017;3:962-70. <https://doi.org/10.1016/j.jacep.2017.02.006>
23. Siddiqui WJ, Aggarwal S, Rafique M, Singh S, Kutalek S, Eisen HJ. Prophylactic use of the implantable cardioverter-defibrillator and its effect on the long-term survival, cardiovascular and sudden cardiac death in nonischemic cardiomyopathy patients-a systematic review and meta-analysis. *Heart Fail Rev.* 2018;23:181-90. <https://doi.org/10.1007/s10741-018-9671-6>
24. Epstein LM, Love CJ, Wilkoff BL, Chung MK, Hackler JW, Bongiorno MG, *et al.* Superior vena cava defibrillator coils make transvenous lead extraction more challenging and riskier. *J Am Coll Cardiol.* 2013;61:987-9. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.12.014>

Artículo original

Resistencia a la meticilina y producción de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa negativa* en México

Ayerim García¹, Carlos Martínez^{1,2}, Rosa Isela Juárez³, René Téllez³, Marco Antonio Paredes⁴, María del Rocío Herrera¹, Silvia Giono¹

¹ Laboratorio de Bacteriología Médica, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México

² Servicio de Bioquímica, Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra", Ciudad de México, México

³ Laboratorio Central de Patología Clínica, Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra", Ciudad de México, México

⁴ Laboratorio de Neurobiología, Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra", Ciudad de México, México

Introducción. Las infecciones por *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa negativa* multirresistentes a los antibióticos y asociadas con la atención en salud tienen un gran impacto epidemiológico por su alta morbimortalidad; además, se han relacionado con la formación de biopelículas, lo cual también se asocia con la resistencia a los antimicrobianos.

Objetivo. Determinar la resistencia a la meticilina y cuantificar la producción de biopelículas para establecer su posible relación con los aislamientos clínicos de *S. aureus* y *Staphylococcus coagulasa negativa*.

Materiales y métodos. Se estudiaron 11 cepas de *S. aureus* y 12 de *Staphylococcus coagulasa negativa*. La resistencia a la meticilina se determinó con discos de cefoxitina tomando como valores de referencia los estándares del *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) de 2018. La producción de biopelícula se cuantificó con cristal violeta. Los genes *mecA* e *icaADBC* se identificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y se hizo un análisis bivariado con la prueba de ji al cuadrado y el coeficiente V de Cramér, utilizando el programa SPSS™, versión 20.0.

Resultados. Nueve cepas de *S. aureus* fueron resistentes a la meticilina (SARM) y dos fueron sensibles. Ocho cepas de *Staphylococcus coagulasa negativa* fueron resistentes y cuatro fueron sensibles. El genotipo *mecA* se encontró en ocho de las nueve cepas de *S. aureus* y en seis de las ocho de *Staphylococcus coagulasa negativa* resistentes a meticilina. Todas las cepas formaron biopelícula. Diez cepas de *S. aureus* y 11 de *Staphylococcus coagulasa negativa* presentaron el genotipo *icaADCB*. No se encontró asociación entre la resistencia a meticilina y la formación de biopelícula.

Conclusiones. La cefoxitina es suficiente para determinar el fenotipo resistente a meticilina y se asoció con el genotipo *mecA*. Las cepas resistentes a la meticilina y poseedoras del gen *mecA* pueden presentar un mecanismo de resistencia alterno. Los dos grupos de cepas formadoras de biopelícula se relacionaron con la presencia del operón *icaADCB*. La formación de biopelícula y la resistencia a la meticilina se expresaron como características independientes en los dos grupos de cepas.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; biopelículas; México.

Methicillin resistance and biofilm production in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* in México

Introduction: Infections associated with health care caused by *S. aureus* and coagulase-negative *Staphylococci* multi-resistant to antibiotics cause a high epidemiological impact due to their high morbidity and mortality. Biofilm formation, which has been associated with antimicrobial resistance, can also occur.

Objectives: To determine methicillin resistance and to quantify the biofilm production to establish if there is a relationship in clinical isolates of *S. aureus* and coagulase-negative *Staphylococci*.

Material and methods: A total of 11 strains of *S. aureus* and 12 of coagulase-negative *Staphylococci* were studied. Methicillin resistance was determined with cefoxitin discs and the *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), 2018 reference values. Biofilm production was quantified by the crystal violet method. The *mecA* and *icaADBC* genes were identified by PCR. A bivariate analysis was performed with chi-square (χ^2) and Cramér's V statistical tests, using SPSS™, version 20.0 software.

Results: Nine *S. aureus* strains were methicillin-resistant and two were sensitive. Eight coagulase-negative *Staphylococci* strains were resistant and four were sensitive. The *mecA*

Recibido: 10/01/18
Aceptado: 31/10/18
Publicado: 11/12/18

Citación:

García A, Martínez C, Juárez RI, Téllez R, Paredes MA, Herrera MR, *et al.* Resistencia a la meticilina y producción de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa negativa* en México. *Biomédica*. 2019;39:513-23. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4131>

Correspondencia:

Silvia Giono-Cerezo, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Santo Tomás, 11340 Miguel Hidalgo, Ciudad de México, México
Teléfono: (5255) 5729 6000, extensión 62374
sgiono@yahoo.com

Contribución de los autores:

Ayerim García: pruebas experimentales, recopilación y tabulación de los datos, y análisis de los resultados
Carlos Martínez y Marco Antonio Paredes: análisis de los resultados y redacción del artículo
Rosa Isela Juárez y René Téllez: aislamiento, identificación y conservación de las cepas bacterianas
María del Rocío Herrera: recopilación y tabulación de los datos, y análisis de los resultados
Silvia Giono: diseño de la investigación, análisis de los resultados y redacción del artículo

Financiación:

El trabajo se llevó a cabo con recursos de cada una de las instituciones participantes.

Conflicto de intereses:

Los autores manifiestan no haber tenido ningún conflicto de intereses en ninguna de las etapas de este estudio.

genotype was found in eight of the nine *S. aureus* resistant strains and six of eight resistant coagulase-negative *Staphylococci*. All strains formed biofilms. Ten strains of *S. aureus* and 11 of coagulase-negative *Staphylococci* presented the *icaADCB* genotype. No association was found between methicillin-resistance and biofilm formation.

Conclusions: Cefoxitin is enough to define the resistance phenotype and is associated with the *mecA* genotype. All strains formed biofilms and were related to the presence of the *icaADCB* operon. Biofilm formation and methicillin resistance were independent features in both groups of strains.

Keywords: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; biofilms; México.

Las infecciones asociadas con la atención en salud representan un problema de salud pública debido a su alta morbilidad y mortalidad. Los agentes patógenos que las causan en México pertenecen al grupo de bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa negativa*, al de las bacterias Gram negativas *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*, y al de especies pertenecientes a Enterobacteriaceae (1,2).

Staphylococcus spp. son cocos Gram positivos de 0,5 a 1,5 μm de diámetro que se agrupan en racimos, son inmóviles, anaerobios facultativos, fermentadores de glucosa, positivos para catalasa y negativos para oxidasa, con un contenido de G+C de 30 a 39 %, y son oportunistas (3). *Staphylococcus aureus* es la especie más virulenta; se la considera una bacteria extracelular que induce alteraciones en los tejidos y produce lesiones localizadas con supuración y cicatrización, y es responsable de varias infecciones en el humano (4).

Los factores que incrementan la probabilidad de adquirir dichas infecciones incluyen la hospitalización durante periodos prolongados, los procedimientos preoperatorios, la utilización de catéteres o prótesis y la permanencia en lugares de alto riesgo (unidades de cuidados intensivos, entre otros), pero los principales factores de riesgo son la virulencia, el potencial para formar abscesos y la multirresistencia a los antibióticos (5).

La Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica de México ha reportado que la mortalidad en pacientes infectados con *S. aureus* varía de 5 a 70 %. La información proveniente de los hospitales generales, pediátricos, universitarios y de especialidades señala que *S. aureus* ocupó el tercer lugar en morbilidad y el cuarto lugar en mortalidad en el periodo de 1997 a 2003 (5).

La resistencia del género *Staphylococcus* a los β -lactámicos, como las penicilinas, las cefalosporinas y los carbapenémicos, es un problema de salud pública (6). La resistencia a la penicilina en *S. aureus* surgió a finales de la década de 1950 y obligó al desarrollo de nuevos antimicrobianos. Así aparecieron las primeras cefalosporinas estables frente a las penicilinasas y las penicilinas semisintéticas, entre ellas la meticilina. Un año después de su introducción, se aisló en Europa la primera cepa de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) y, en 1963, se reportó el primer brote hospitalario; desde entonces se han notificado en todo el mundo (4).

Los mecanismos de resistencia de *S. aureus* a los β -lactámicos son la producción de enzimas β -lactamasas, la presencia de proteínas ligadas a la penicilina (*Penicillin Binding Protein*, PBP) modificadas (conocida como resistencia intrínseca a la meticilina) y los fenómenos de tolerancia. Las penicilinas resistentes a penicilinasas (oxacilina, meticilina, cloxacilina) poseen una estructura molecular que las protege frente a la acción de las β -lactamasas. El mecanismo de resistencia de *S. aureus* a la meticilina se

basa en la síntesis de una nueva PBP (PBP2a o PBP2'), la cual exhibe poca afinidad por la meticilina y otros β -lactámicos, bloquea la llegada del antibiótico a su sitio blanco y produce, así, un patrón de resistencia (7).

El elemento genético cromosómico responsable de la resistencia es el gen *mecA*, cuya expresión depende de dos genes, el *mecR1*, que regula la transcripción, y el *mecI*, que codifica la proteína represora. El antibiótico β -lactámico induce un proceso catalítico en la membrana bacteriana, y el gen *mecA* se transcribe y se sintetiza en la proteína de membrana PBP2a (8,9).

Otras modalidades de resistencia en las que no se evidencia la presencia del gen *mecA*, son la resistencia límite a la oxacilina (*Borderline Oxacillin-Resistant S. aureus*, BORSA) en bacterias hiperproductoras de β -lactamasas, y la resistencia modificada (*Modified S. aureus*, MODSA) en aquellas que presentan modificaciones en la afinidad de las PBP 1, 3 y 4, por lo que exhiben débil resistencia a la meticilina. Otros genes de resistencia son el gen *blaZ* y el *fem* (factor esencial de resistencia a la meticilina) (7).

Asimismo, está la producción de biopelículas, la cual se considera un factor de virulencia. La biopelícula es una comunidad de microorganismos recubiertos de un polímero extracelular o matriz de exopolisacáridos, con la capacidad de adherirse a superficies bióticas o abióticas (10); se ha demostrado que son estructuras tridimensionales (11). La matriz de exopolisacáridos favorece el intercambio de metabolitos con el exterior y confiere una barrera protectora contra ambientes adversos, como la hiperosmolaridad, la anaerobiosis, los anticuerpos, los macrófagos y los antibióticos. Este crecimiento 'protegido' permite la supervivencia en un medio antagonista (11).

La adhesina intercelular de polisacáridos (*Polysaccharide Intercellular Adhesin*, PIA), llamada poli-N-acetilglucosamina (PNAG), es un polímero de 28 kDa, homoglucano lineal de la glucosamina, con una estructura bioquímica de β -1,6-N-acetil-glucosamina (10). La biosíntesis de la PIA de *Staphylococcus* spp. participa en la formación de biopelículas (10,12) y se sintetiza por la acción de cuatro proteínas homólogas organizadas en el operón *ica*, las cuales forman parte del grupo de adhesinas intercelulares (*Intercellular Cluster Adhesin*, ICA) codificadas por los genes *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC* (13). El gen *bap* puede mediar un mecanismo independiente de la PIA para la formación de la biopelícula (13,14). Por otra parte, la proteína Bap (*Biofilm-Associated Protein*) se localiza en la superficie bacteriana asociada a la pared celular y desempeña un papel relevante en los procesos infecciosos de la mastitis bovina ocasionada por diferentes especies de *Staphylococcus* (13,15).

Existe un interés creciente en la formación de biopelículas de bacterias patógenas capaces de adherirse a dispositivos como prótesis ortopédicas, válvulas cardíacas artificiales, marcapasos, injertos de plástico y dispositivos intravenosos temporales o permanentes (11). La tolerancia a los agentes antimicrobianos en el 60 % de las infecciones bacterianas está asociada a la formación de biopelículas y la concentración del agente antimicrobiano requerida para introducirse en la biopelícula y tener efecto en las bacterias (16).

Las cepas de SARM se asocian con infecciones hospitalarias en las que se se pueden formar biopelículas, y se caracterizan por ser persistentes, virulentas y difíciles de eliminar (10). En ese contexto, el objetivo del estudio fue investigar la asociación de la resistencia a la meticilina de los genotipos *mecA* e *icaADCB* con la formación de biopelículas en cepas de *S. aureus*

y *Staphylococcus* coagulasa negativa, aisladas de muestras clínicas de pacientes hospitalizados en el Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” de Ciudad de México.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas provenían de muestras clínicas (heridas quirúrgicas, secreciones bronquiales, hemocultivos, puntas de catéter, cultivos óseos) recolectadas durante el periodo de febrero a julio del 2010. Se estudiaron 23 cepas de *Staphylococcus* spp.: 11 de *S. aureus* y 12 de *Staphylococcus* coagulasa negativa. Los aislamientos se obtuvieron por resiembra en placas de gelosa con sangre de carnero y medio agar de sal y manitol. Todas las cepas aisladas fueron positivas para catalasa y negativas para oxidasa. Según la prueba de coagulasa, las cepas se clasificaron como *Staphylococcus* coagulasa positivas, entre ellas las de *S. aureus*, y *Staphylococcus* coagulasa negativas. La identificación del género y de la especie se llevó a cabo con un panel bioquímico usando un sistema automatizado (MicroScan Instruments, Dade-Behring). Las cepas se conservaron en caldo de cerebro y corazón con glicerol al 20 % y a -70 °C hasta su procesamiento.

Se usó la cepa ATCC 25923 de *S. aureus* como control negativo para las pruebas de resistencia a la meticilina, la ATCC 43300, como control positivo de la presencia del gen *mecA*, la ATCC 27543, como control positivo para la producción de biopelícula, y la ATCC 12228, para la detección de los genes *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*.

Prueba de difusión en disco para oxacilina y cefoxitina

La sensibilidad a la meticilina se determinó mediante el método de Kirby y Bauer o de difusión mediante el uso de discos de cefoxitina (30 µg) (BD BBL Sensi-Disc Antimicrobial™) como método de referencia, según las guías y normas del CLSI (2018) para establecer la sensibilidad a los antimicrobianos mediante discos (17).

Para preparar el inóculo, se seleccionaron cuatro colonias que se colocaron en tubos con 4 ml de caldo Müeller-Hinton; se ajustó la turbidez al 0,5 usando un nefelómetro con el estándar de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml); se sembraron con hisopo en tres direcciones en placas de agar Müeller-Hinton y se colocaron los discos.

Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C y se midieron los diámetros de los halos de inhibición en milímetros usando un escalímetro; los resultados se compararon con los valores establecidos en el manual del CLSI (2018) para su clasificación como resistentes o sensibles.

Producción de biopelícula

La producción de biopelícula se cuantificó con el método de titulación en microplaca de poliestireno utilizando cristal violeta (18). A partir de un cultivo de 24 horas de cada cepa, se preparó una suspensión en caldo de cultivo Müeller-Hinton, y se ajustó a la turbidez del tubo número 3 de McFarland, equivalente a $9,0 \times 10^8$ UFC/ml. Cada ensayo se hizo por cuadruplicado para cada control y para las cepas problemáticas.

Se agregaron 100 μ l de esa suspensión a cuatro pozos de microplacas de polipropileno de 96 pozos con fondo plano (Nunc MicroWell™); en los pozos de control negativo se agregó solo el medio Müeller-Hinton y, después, se incubó durante 24 horas a 37 °C. Se aspiró el contenido con micropipetas empleando puntas de 200 μ l estériles y los pozos se lavaron con 100 μ l de solución tampón fosfato salino (PBS) estéril.

Las bacterias adheridas se fijaron con 100 μ l de glutaraldehído al 2,5 % durante un minuto a temperatura ambiente, se retiró el exceso aspirando nuevamente y cada uno de los pozos se lavó con 100 μ l de PBS. Se agregaron 100 μ l de cristal violeta al 4 % en cada pozo y se incubó a temperatura ambiente durante dos minutos; se retiró el exceso de cristal violeta por aspiración y se lavaron dos veces con PBS. El cristal violeta adherido en cada pozo se disolvió con 100 μ l de alcohol y acetona en proporción 80:20 (v/v), y el volumen final se ajustó a 2 ml con la misma solución.

Las lecturas se hicieron con un espectrofotómetro a una absorbancia de 570 nm: se promediaron los valores de las cuatro lecturas de absorbancia, y se calcularon la media y la desviación estándar (DE) para cada una de las cepas y el control negativo. El punto de corte (AbsC) se definió como el valor de tres DE por encima del promedio de las absorbancia del control negativo (AbsC=absorbancia media de los controles + 3X DE de los controles). La absorbancia final de cada una de las cepas se calculó sustrayendo el valor de AbsC (absorbancia=absorbancia de una cepa – AbsC).

Cuando el valor obtenido de absorbancia resultó negativo, se consideró como valor cero; cualquier valor positivo indicaba que había producción de biopelícula. La producción de biopelículas se agrupó en cuatro categorías: nula o no adherente (absorbancia \leq 0,001), baja adherencia (absorbancia=0,001-0,500), moderada (absorbancia=0,051-0,900) y alta adherencia (absorbancia \geq 0,901) (19,20).

Extracción del ADN genómico

Para la extracción del ADN genómico, se empleó el método de tiocianato de guanidina: cada cepa se sembró por estría masiva en agar Müeller-Hinton y se incubó a 37 °C durante 24 horas; las colonias se suspendieron en un ml de NaCl al 0,85 %, se centrifugaron a 14,000g durante cinco minutos, se lavaron dos veces con 200 μ l de agar de *Salmonella* y *Shigella* y se suspendieron de nuevo en 100 μ l de solución tampón tris EDTA (1mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0).

Se agregaron después 500 μ l de solución tampón de tiocianato de guanidinio 5M y EDTA (0,1M pH 6,0), y 25 μ l de N-Lauril-sarcocinato de sodio al 10 %; se mezcló por inversión durante cinco minutos a temperatura ambiente y cinco minutos en hielo. Se agregaron 250 μ l de acetato de amonio 7,5M y 500 μ l de cloroformo alcohol isoamílico en proporción 24:1 (v/v); se mezcló por inversión y se centrifugó a 14.000g durante siete minutos. Se recuperó la fase acuosa, se agregaron 500 μ l de isopropanol frío y se dejó a -20 °C toda la noche.

El ADN se recuperó por centrifugación durante 10 minutos a 10.000g; la pastilla obtenida se lavó con 200 μ l de etanol frío al 70 % (v/v), se centrifugó a 10.000g y se dejó secar al aire durante dos horas para, finalmente, disolverla en 80 μ l de agua para biología molecular.

Identificación de los genes *mecA* e *icaADBC* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se emplearon los iniciadores específicos diseñados para la amplificación de los genes *mecA* e *icaADBC* (21). Las secuencias de los iniciadores específicos, las condiciones de amplificación y los tamaños esperados de cada amplicón se presentan en el cuadro 1.

El volumen final de la mezcla de reacción para la amplificación por PCR fue de 25 μ l; las concentraciones finales de cada uno de los iniciadores fueron de 0,1 μ M, 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 mM de dNTP y agua para biología molecular.

Se utilizaron 30 ciclos de desnaturalización inicial durante cinco minutos a 94 °C, desnaturalización durante 30 s a 94 °C, alineamiento y extensión durante 1,5 minutos a 72 °C y una extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Los productos de la amplificación se visualizaron mediante electroforesis en agarosa al 1,5 % en solución tampón TBE (tris, borato, EDTA) teñido con bromuro de etidio; el tamaño de los amplicones se calculó comparándolos con un marcador de talla molecular comercial de 100 pb. El control positivo para la presencia del gen *mecA* fue el ADN de la cepa ATCC43300 de *S. aureus*.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de la producción de biopelícula se hizo con el programa SPSS™, versión 20.0. Se hizo un análisis bivariado con las pruebas de ji al cuadrado y el coeficiente V de Cramér para examinar la asociación entre la resistencia a la meticilina y la formación de biopelícula.

Resultados

Las 23 cepas de *Staphylococcus* spp. de origen clínico aisladas se dividieron en dos grupos: el primero con 11 (48 %) cepas de *S. aureus*, y el segundo con 12 (52 %) cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativa.

El fenotipo resistente a meticilina se encontró en 9 (81,8 %) cepas de *S. aureus* y 2 (18,2 %) fueron sensibles. En las cepas del grupo *Staphylococcus* coagulasa negativa, 8 (66,7 %) fueron resistentes y, 4 (33,3 %), sensibles a meticilina (cuadro 2).

Cuadro 1. Secuencias de los iniciadores específicos y condiciones para la amplificación de los genes *mecA* e *icaADBC*

Iniciador	Secuencia	Condiciones de alineamiento	Amplicón (pb)
icaA-F	5'-CGTTGATCAAGATGCACC-3'	30s/50 °C	319 pb
icaA-R	5'-CCGCTTGCCATGTGTTG-3'	30s/50 °C	
icaB-F	5'-TGGATTAAC TTTGATGATATGG-3'	60s/54 °C	409 pb
icaB-R	5'-AGGAAAAAGCTGCACACC-3'	60s/54 °C	
icaC-F	5'-GGTCAATGGTATGGCTATTT-3'	60s/54 °C	148 pb
icaC-R	5'-CGAACAACACAGCGTTTC-3'	60s/54 °C	
icaD-F	5'-GGTCAAGCCCAGACAGAG-3'	60s/54 °C	150 pb
icaD-R	5'-GAAATTCATGACGAAAGTATC-3'	60s/54 °C	
mecA-F	5'-TGGCTATCGTGCACAATCG-3'	30s/55 °C	310 pb
mecA-R	5'-CTGGAAC TTTGTTGAGCAGAG-3'	30s/55 °C	

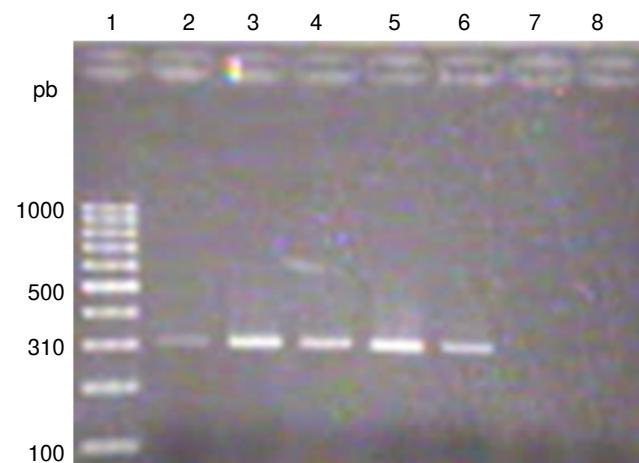
Cuadro 2. Fenotipos de sensibilidad y resistencia a la meticilina establecidos por difusión en disco de las cepas de los grupos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus aureus* coagulasa negativa

Grupo de cepas	Fenotipo de sensibilidad a meticilina		Total n (%)
	Sensible a cefotitina n (%)	Resistente a cefotitina n (%)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	2 (9)	9 (39)	11 (48)
<i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa negativa	4 (17)	8 (35)	12 (52)
Total	6 (26)	17 (74)	23 (100)

En cuanto a la correlación entre el fenotipo de resistencia a la meticilina y la presencia del gen *mecA*, el producto de amplificación mediante PCR de punto final fue el esperado, un amplicón de 310 pares de bases observado por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (figura 1); de las 23 cepas, 18 (78 %) presentaron este gen.

De las nueve cepas de SARM, ocho presentaron el gen *mecA* y solo en una no se detectó. En diez cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativa se detectó el gen *mecA*, es decir, se encontró en las ocho cepas resistentes a la meticilina y, además, en dos cepas con fenotipo sensible a la meticilina y presencia del gen *mecA* (19).

En cuanto a la formación de biopelícula como mecanismo de virulencia, se encontró que con las categorías establecidas: nula o no adherente (absorbancia \leq 0,001), de baja adherencia (absorbancia=0,001-0,500), de moderada adherencia (absorbancia=0,051-0,900) y de alta adherencia (absorbancia \geq 0,901), todas las cepas produjeron biopelícula cuando se empleó la cepa ATCC 27543 como control positivo para dicha producción (cuadro 3).

**Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % con los amplicones de 310 pb del gen *mecA*. 1: marcador de talla molecular 100 pb; 2: control positivo con *S. aureus* ATCC 43300; 3-6: ADN de cepas clínicas de *S. aureus*; 7: control negativo con *S. aureus* ATCC 25923; 8: control de reactivos**Cuadro 3.** Capacidad de producción de biopelícula en cepas de los grupos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus aureus* coagulasa negativa

Grupo de cepas	Fenotipo de producción de biopelícula			
	Baja n (%)	Moderada n (%)	Alta n (%)	Total n (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 (13)	7 (30)	1 (5)	11 (52)
<i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa negativa	2 (9)	7 (30)	3 (13)	12 (48)

En el grupo de cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativa se encontraron tres (13 %) con alta producción en comparación con una (5 %) de *S. aureus*. En ambos grupos hubo el mismo número de cepas (7; 30 %) con producción moderada de biopelícula, en tanto que solo tres cepas de *S. aureus* y dos de *Staphylococcus* coagulasa negativa presentaron el fenotipo de baja producción de biopelícula.

Se amplificaron de manera independiente los genes *A*, *D*, *B* y *C* del operón *ica*, con el propósito de correlacionar su presencia con el fenotipo de formación de biopelícula en las cepas de *Staphylococcus* spp. Las cepas de los dos grupos presentaron el operón *icaADBC* al usar como control la cepa ATCC 12228 de *S. epidermidis* para la presencia de los genes *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC* (figura 2). La electroforesis en gels de agarosa al 1,5 % evidenció en cada cepa los amplicones de cada uno de los genes con el tamaño esperado.

En el análisis estadístico de asociación entre la producción de biopelícula y los dos grupos de cepas de *S. aureus* y *Staphylococcus* coagulasa negativa mediante el *V* de Cramér y la prueba de χ^2 al cuadrado, se encontraron valores de *V* de 0,245 y de *p* de 0,111, lo que indica que las dos variables fueron independientes entre sí. La producción de biopelícula se asoció con las cepas SARM *Staphylococcus* coagulasa negativa resistente a la metilicina (*Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococcus aureus*, MRSCN). El análisis estadístico también determinó que la producción de biopelícula se daba independientemente de la resistencia a la metilicina, con un valor de *V* de 0,115 y uno de *p* de 0,252.

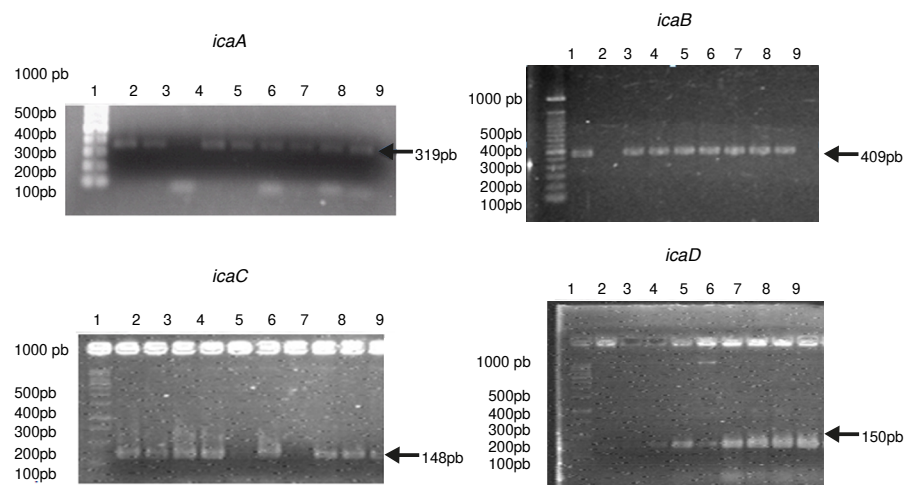


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % con los amplicones de los genes *icaADBC*. 1: marcador de talla molecular de 100 pb; 2: control positivo con ATCC 12228; 3-10: cepas clínicas de *S. aureus*.

Discusión

Las infecciones asociadas con la atención en salud constituyen un grave problema de salud pública en todo el mundo y afectan gravemente a los países de menores recursos. Las infecciones hospitalarias se encuentran entre las principales causas de morbilidad y mortalidad, y su manejo ocasiona costos elevados para los pacientes y el sistema de salud (22).

Staphylococcus aureus y varias especies de *Staphylococcus* coagulasa negativa, se caracterizan por ser resistentes a la metilicina, lo que, a su

vez, les confiere resistencia a varios antibióticos β -lactámicos y dificulta enormemente su erradicación. Por ello, ha sido necesario establecer protocolos específicos de tratamiento con otros antibióticos para las infecciones causadas por este tipo de *Staphylococcus* spp., con la consiguiente presión selectiva que favorece la diseminación de dichas cepas.

La acumulación y la diseminación de la resistencia en *S. aureus* son producto del intercambio de factores determinantes de resistencia preexistentes en elementos genéticos móviles, como los plásmidos y los transposones (5).

En las muestras de *Staphylococcus* spp. analizadas en este estudio fue posible determinar el fenotipo resistente a la meticilina utilizando discos con cefoxitina. Las cepas SARM presentaron el mismo rango de sensibilidad y especificidad frente a los dos antibióticos. Estos resultados coinciden con un estudio comparativo de varios métodos de detección de cepas aisladas de muestras clínicas hospitalarias, que presentaron una sensibilidad de 98 % y una especificidad de 100 % utilizando discos de cefoxitina (23).

En las cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativa se detectó el fenotipo de resistencia a la meticilina con los valores de corte de los halos de inhibición. En este sentido, los resultados del presente estudio son similares a los hallados por otros autores (24).

Los métodos de tipificación molecular basados en la detección del gen *mecA* mediante PCR de punto final están cada vez más al alcance de los laboratorios clínicos y representan una alternativa rápida y eficaz para la detección de cepas SARM. Además, tienen la gran ventaja de no depender de condiciones de cultivo especiales y se pueden usar en un gran número de aislamientos para establecer el fenotipo de resistencia a la meticilina y sus asociaciones.

En el presente estudio encontramos una correlación entre el fenotipo y el genotipo de resistencia a la meticilina; únicamente en una cepa de fenotipo SARM no se encontró el gen *mecA*.

En cuanto a la formación de biopelícula como factor de virulencia de los estafilococos mediante su adherencia y colonización de células, tejidos y materiales inertes, su determinación *in vitro* en cepas clínicas ha evolucionado e incluye desde métodos poco reproducibles, como el agar de rojo Congo, hasta los métodos espectrofotométricos semicuantitativos sobre superficies inertes (25).

El método empleado en el presente trabajo presentó una buena reproducibilidad y permitió establecer en los dos grupos tres niveles de formación de biopelícula, predominantemente el moderado.

En diversos estudios se ha demostrado que tanto *S. aureus* como *Staphylococcus* coagulasa negativa de origen clínico tienen la misma capacidad de formar biopelículas (26). En cepas clínicas de *S. aureus*, resistentes y sensibles a meticilina se ha detectado un nivel moderado de formación de biopelículas, en menor medida, un nivel alto, y en muy pocas cepas, un nivel bajo, sin que se pudiera establecer una correlación entre la resistencia a la meticilina y la capacidad de producción de biopelícula.

Las cepas de *S. aureus* aisladas de la piel de pacientes presentaron una mayor capacidad de producir biopelícula, hecho que favorecería las condiciones para la colonización y la persistencia en el humano si se considera que se trata de uno de los principales microorganismos de la microbiota de la piel (27).

El operón *ica* es un elemento importante en la formación y acumulación de biopelícula; consta de cuatro genes que codifican para la adhesina intercelular de polisacárido de las bacterias. En este estudio se encontró que el 91 % de las cepas del grupo de *S. aureus* y el 92 % de las del grupo de *Staphylococcus* coagulasa negativa presentaron los genes *icaADBC*. La capacidad de formar biopelícula depende, en parte, de la actividad del locus *icaADBC* y del gen *icaR* implicados en la producción de la adhesina intercelular de polisacárido la cual es necesaria funcionalmente para la adherencia entre células y para la acumulación de biopelícula. Estos resultados coinciden con los de otro estudio (14), en el que se obtuvo una alta frecuencia de genes *icaADBC* en todos los aislamientos clínicos.

Aunque esta adhesina es un factor muy importante en la formación de biopelícula, se identificaron cepas que no codificaron para los genes *icaADBC* y, por lo tanto, no sintetizan el polisacárido. Este resultado no implica que no tengan la capacidad de formar biopelícula, sino que otros genes no incluidos en el estudio citado, como el *SigB*, el *SarA* y el *LuxS*, que también participan en la producción de biopelícula, podrían estar implicados (14).

La resistencia a la meticilina y la producción de biopelícula en los aislamientos clínicos de *S. aureus* y *Staphylococcus* coagulasa negativa son factores de virulencia que se expresan de manera independiente. Se obtuvo una importante correlación entre el fenotipo resistente a la meticilina y el genotipo del *mecA* en las cepas de origen clínico. Prácticamente todas las cepas fueron capaces de formar biopelícula, ya fuera por la participación del operón *ica* o por la de otros genes que no fueron parte de esta investigación.

Los estudios biotecnológicos fenotípicos y biomoleculares mediante PCR en infecciones hospitalarias han contribuido a un mejor conocimiento de su persistencia y resistencia antimicrobiana, y favorecen un mejor manejo clínico y terapéutico. La metodología empleada permitió aislar y clasificar las 23 cepas de *Staphylococcus* spp. procedentes de diferentes casos clínicos en dos grupos: *S. aureus* y *Staphylococcus* coagulasa negativa. Se pudo determinar mediante PCR que 18 de las 23 cepas presentaron el gen *mecA*, pero en una cepa con fenotipo de resistencia no se lo detectó, lo que sugiere un mecanismo de resistencia alterno. No se demostró asociación entre la producción de biopelícula y la resistencia a la meticilina.

Referencias

1. Guzmán-Blanco M, Mejía C, Isturiz R, Álvarez C, Bavestrello L, Gotuzzo E, *et al.* Epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. Int J Antimicrob Agents. 2009;34:304-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.06.005>
2. Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica. Informe anual 2015. México: Secretaría de Salud; 2015.
3. Bannerman TL, Peacock SJ. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of clinical microbiology. 9th edition. Washington, D.C.: ASM Press; 2007. p. 390-411.
4. Bustos-Martínez JA, Hamdan-Partida A, Gutiérrez-Cárdenas. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev Biomed. 2006;17:287-305.
5. Velázquez-Meza ME. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. Salud Pública de México. 2005;47:381-7.
6. Marín M, Gudíol F. Antibióticos beta-lactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003;21:42-55. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(03\)72873-0](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(03)72873-0)
7. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol. 2009;7:629-41. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2200>

8. Zhang HZ, Hackbart CJ, Chansky KM, Chambers HF. A proteolytic transmembrane pathway and resistance to β lactams in staphylococci. *Science*. 2001;291:1962-5. <https://doi.org/10.1126/science.1055144>
9. Hiramatsu K. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*: A new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis*. 2001;1:147-55 [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00091-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00091-3)
10. Hernández JB, Novales GM. Biofilm. ¿Amenaza latente o factor de protección? Estado de arte. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;27:22-8.
11. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2:95-108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
12. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* the “accidental” pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7:555-67. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2182>
13. Lasa I. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *Int Microbiol*. 2006;9:21-8.
14. O’Gara PJ. *ica* and beyond: Biofilms mechanism and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2007;270:179-88. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x>
15. Cucarella C, Tormo MA, Knecht E, Amorena B, Lasa I, Foster TJ, *et al*. Expression of the biofilm associate protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infect Immun*. 2002;70:3180-8. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.6.3180-3186.2002>
16. Rodríguez-Martínez JM, Pascual Á. Actividad de los antimicrobianos en biocapas bacterianas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26:107-14. <https://doi.org/10.1157/13115546>
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimicrobial susceptibility testing standards. M02-A11, M07-A9, and M11-A8. Wayne: ILSI; 2014.
18. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2000;40:175-9. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
19. García-Barreto AA. Biofilm de *Staphylococcus* spp. de origen intrahospitalario: genes asociados (tesis). México: Instituto Politécnico Nacional; 2010.
20. Acosta-Pérez G, Rodríguez-Ábrego G, Longoria-Revilla E, Castro-Mussot ME. Evaluación de cuatro métodos para la detección de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente de muestras clínicas en un hospital regional. *Salud Pública de México*. 2012;54:1-6.
21. Gómez J, Gómez-Lus ML, Bas P, Ramos C, Cafini F, Maestre JR, *et al*. ¿Es la cuantificación del biofilm un elemento diferenciador en la patogenia de bacilos gramnegativos? *Rev Esp Quimioter*. 2013;26:97-102.
22. Ducl G, Fabry J, Nicolle L. Prevención de las infecciones nosocomiales. Guía práctica. Segunda edición. México: Organización Mundial de la Salud; 2003. p. 1-65.
23. Zayas-Tamayo ÁM, Barreras-García G, Álvarez-Varela E. Detección mediante el Sistema DIRAMIC de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y comparación con otros métodos utilizado en la práctica clínica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2013;44. Fecha de consulta: 23 de noviembre de 2017. Disponible en: <https://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/CB28-12.pdf>
24. Corso A, Soloaga R, Faccione D, Gagetti P, Corbella S, Iglesias M, *et al*. Improvement of a latex agglutination test for the evaluation of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004;50:223-5. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.06.005>
25. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiplex methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods*. 2007;11:9-18. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.11.010>
26. Arslan S, Ozkardes F. Slime production and antibiotic susceptibility in *Staphylococci* isolated from clinical samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:29-33. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007000100004>
27. Smith K, Pérez A, Ramage G, Lappin D, Gemmell CG, Lang S. Biofilm formation by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Med Microb*. 2008;57:1018-23. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/000968-0>

Original article

Effects of high-intensity interval training compared to moderate-intensity continuous training on maximal oxygen consumption and blood pressure in healthy men: A randomized controlled trial

Víctor Hugo Arboleda-Serna¹, Yuri Feito², Fredy Alonso Patiño-Villada¹, Astrid Viviana Vargas-Romero¹, Elkin Fernando Arango-Vélez¹

¹ Grupo de Investigación en Actividad Física para la Salud, Instituto de Educación Física, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Department of Exercise Science and Sport Management, Kennesaw State University, Kennesaw, GA, USA

Introduction: Aerobic exercise generates increased cardiorespiratory fitness, which results in a protective factor for cardiovascular disease. High-intensity interval training (HIIT) might produce higher increases on cardiorespiratory fitness in comparison with moderate-intensity continuous training (MICT); however, current evidence is not conclusive.

Objective: To compare the effects of a low-volume HIIT and a MICT on maximal oxygen consumption (VO_{2max}), systolic blood pressure, and diastolic blood pressure during eight weeks in healthy men between 18 and 44 years of age.

Materials and methods: We conducted a randomized controlled trial. Forty-four volunteers were randomized to HIIT (n=22) or MICT (n=22). Both groups performed 24 sessions on a treadmill. The HIIT group completed 15 bouts of 30 seconds (90-95%, maximal heart rate, HRmax), while the MICT group completed 40 minutes of continuous exercise (65-75% HRmax). The study is registered as a clinical trial via clinicaltrials.gov with identifier number: NCT02288403.

Results: Intra-group analysis showed an increase in VO_{2max} of 3.5 ml/kg/min [95% confidence interval (CI) 2.02 to 4.93; p=0.0001] in HIIT and 1.9 ml/kg/min (95% CI -0.98 to 4.82; p=0.18) in MICT. However, the difference between the two groups was not statistically significant (1.01 ml/kg/min. 95% CI -2.16 to 4.18, p=0.52). MICT generated a greater reduction in systolic blood pressure compared to HIIT (median 8 mm Hg; p<0.001). No statistically significant differences were found between the groups for DBP.

Conclusions: Results indicated no significant change in VO_{2max} with a low-volume HIIT protocol versus MICT after 24 sessions. In contrast, MICT provided a greater reduction in systolic blood pressure compared to HIIT.

Keywords: High-intensity interval training; blood pressure; exercise; cardiorespiratory fitness; randomized controlled trial.

Efecto del entrenamiento con intervalos de gran intensidad comparado con el entrenamiento continuo de intensidad moderada en el consumo máximo de oxígeno y la presión arterial en hombres sanos: estudio clínico aleatorio

Introducción. El ejercicio aeróbico incrementa la capacidad cardiorrespiratoria, considerada como factor de protección frente a enfermedades cardiovasculares. El entrenamiento con intervalos de gran intensidad (*High Intensity Interval Training*, HIIT) podría causar mayores incrementos en la capacidad cardiorrespiratoria comparado con el entrenamiento continuo de intensidad moderada, aunque la información actual no es concluyente.

Objetivo. Comparar los efectos del entrenamiento con intervalos de gran intensidad de bajo volumen y del entrenamiento continuo de intensidad moderada, en el volumen máximo consumido de oxígeno (VO_{2max}), la presión arterial sistólica y la presión arterial diastólica, durante ocho semanas en hombres sanos entre los 18 y los 44 años de edad.

Materiales y métodos. Se hizo un ensayo clínico controlado con asignación al azar. Se incluyeron 44 voluntarios, 22 a entrenamiento con intervalos de gran intensidad y 22 a uno continuo de intensidad moderada. Ambos grupos hicieron 24 sesiones en tapiz rodante. El primer grupo completó 15 cargas de 30 segundos (90-95 % de la frecuencia cardíaca máxima y, el segundo hizo 40 minutos continuos (65-75 % de la frecuencia cardíaca máxima). El estudio está registrado en clinicaltrials.gov, código: NCT02288403.

Resultados. El análisis dentro de cada grupo mostró un aumento en el volumen máximo consumido de oxígeno de 3,5 ml/kg por minuto (intervalo de confianza, $IC_{95\%}$ 2,02 a 4,93; p=0,0001) con el entrenamiento con intervalos de gran intensidad, y de 1,9 ml/kg por minuto ($IC_{95\%}$ -0,98 a 4,82; p=0,18) con el continuo de intensidad moderada. Sin embargo, las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas (1,01 ml/kg por minuto; $IC_{95\%}$ -2,16 a 4,18; p=0,52). El entrenamiento continuo de intensidad moderada

Received: 12/04/18

Accepted: 31/10/18

Published: 12/12/18

Citation:

Arboleda-Serna VH, Feito Y, Patiño-Villada FA, Vargas-Romero AV, Arango-Vélez EF. Effects of high-intensity interval training compared to moderate-intensity continuous training on maximal oxygen consumption and blood pressure in healthy men: A randomized controlled trial. *Biomédica*. 2019;39:524-36. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4451>

Corresponding author:

Víctor Hugo Arboleda-Serna, Grupo de Investigación en Actividad Física para la Salud, Instituto de Educación Física, Universidad de Antioquia, Calle 70 N° 52-21, Medellín, Colombia
Telephone: (574) 219 9286
victor.arboleda@udea.edu.co

Author contributions:

Víctor Hugo Arboleda-Serna, Elkin Fernando Arango-Vélez and Yuri Feito: Conception and design of the study and data acquisition
Fredy Alonso Patiño-Villada and Astrid Viviana Vargas-Romero: Development of the experimental aspects
All authors participated in the analysis and interpretation of the data and the writing of the manuscript.

Funding:

The study was partially funded by the *Grupo de Epidemiología de la Facultad Nacional de Salud Pública, Universidad de Antioquia* through compensation for the trainers.

Conflicts of interest:

The authors report no conflicts of interest.

generó una mayor reducción en la presión arterial sistólica, comparado con el de intervalos de gran intensidad (mediana: 8 mm Hg; $p < 0,001$). Por último, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos en la presión arterial diastólica.

Conclusiones. Los resultados no evidenciaron diferencias en el efecto sobre el VO_2 máx con un protocolo de entrenamiento con intervalos de gran intensidad de bajo volumen, en comparación con el continuo de intensidad moderada. Por el contrario, con este último, la reducción en la presión arterial sistólica fue mayor que con el de intervalos de gran intensidad.

Palabras clave: entrenamiento con intervalos de gran intensidad; presión sanguínea; ejercicio; capacidad cardiovascular; ensayo clínico controlado aleatorio.

Maximum oxygen consumption (VO_2 max) is considered the main indicator to evaluate cardiorespiratory fitness (1,2). VO_2 max is directly related to cardiovascular health and its increase is associated with a reduced risk of death from cardiovascular disease and for all-cause mortality (3-5). Moderate-intensity continuous training (MICT) has been the most widely used method to increase VO_2 max in the past. However, in recent years, high-intensity interval training (HIIT) methods have been practiced by individuals with different health conditions and its use is increasing (6,7).

Currently, the gain in VO_2 max achieved with HIIT versus MICT is under discussion. Some studies have shown that HIIT generated faster and more significant adaptations in VO_2 max when compared to MICT (8-14) while other investigations have found less pronounced increases in VO_2 max with HIIT, which indicates that some limitations exist with these types of programs (15-17). Nonetheless, it should be noted that the protocols used in these HIIT studies were comprised of short periods of load and more extensive recovery periods compared to other interventions (9,10,14,18,19).

High blood pressure is a common health condition that is associated with increases in the incidence of all-cause mortality and cardiovascular disease. Cornelissen, *et al.* (20) reported a decrease in systolic blood pressure and diastolic blood pressure of 3.5 mm Hg (95% CI 2.3-4.6) and 2.5 mm Hg (95% CI 1.7-3.2) with aerobic exercise, respectively. Moreover, studies comparing continuous training and HIIT among non-exercisers hypertensive controls reported significant decreases of 8-mmHg for SBP in all groups (12), and mean decreases in systolic blood pressure and diastolic blood pressure with HIIT of 12 and 8 mmHg, respectively, compared with continuous workouts that achieved non-significant reductions of 4.5, and 3.5 mm Hg (21). Although exercise is a fundamental aspect in the primary prevention, treatment, and control of hypertension, the optimal frequency, intensity, time, and type of exercise to reduce systolic blood pressure and diastolic blood pressure values are still unclear (22).

Therefore, the primary objective of this study was to compare the effect of a low-volume HIIT program versus a MICT program in VO_2 max among healthy men. The secondary objective was to identify the effect of both exercise programs on systolic and diastolic blood pressure. We hypothesize that those in the HIIT group would have significantly greater improvements in VO_2 max and BP responses compared to the MICT group.

Materials and methods

This two-arm randomized control trial with parallel groups was developed following the CONSORT statement for randomized trials of non-pharmacological treatment (23) and it is registered as a clinical trial under identifier number NCT02288403.

Participants were recruited via posters, word of mouth, social media, and email around the academic community of a public university in Medellín, Colombia. We asked men between 18 and 44 years of age who did not meet the physical activity recommendations of 150 minutes of aerobic exercise per week to participate. Those who responded and agreed to participate voluntarily in the study were asked to sign an informed consent form. The *Universidad de Antioquia* Research Ethics Committee approved all forms and study protocols.

Individuals with any of the following characteristics were excluded from the study: Those who practiced HIIT, smoked, had a history of pulmonary, metabolic or cardiovascular disease, arrhythmias, heart failure, hypertension, diabetes mellitus, were being treated with anticoagulants, beta-blockers, calcium antagonists, bronchodilators, steroids, or had cognitive, sensory, neuromotor, and/or musculoskeletal disorders that could affect their participation in any of the study protocols. All subjects were evaluated by a sports medicine physician who authorized their participation in the study according to the criteria mentioned above.

For the purpose of this study, we were interested in examining changes in maximal oxygen consumption ($VO_2\text{max}$) in the two groups. We evaluated $VO_2\text{max}$ via a graded exercise test on a treadmill (Trackmaster™, model TMX 425C) using a portable gas analyzer (K4b², Cosmed Inc., IL, USA).

We were also interested in examining changes in both systolic blood pressure and diastolic blood pressure between the groups. Blood pressures was measured with an Omron M3 HEM-7200-E™ (Omron Healthcare, Co., Ltd., Kyoto, Japan) automatic blood pressure monitor.

A detailed description of the study design along with specific details of the protocols utilized to measure the primary and secondary outcomes have been published elsewhere (24). Briefly, participants were randomly assigned to a high-intensity interval training (HIIT) group or a moderate-intensity continuous training (MICT) group. All training sessions for groups were monitored using a heart rate monitor (Polar FT1™; Polar, Lake Success, NY) and supervised by a qualified trainer on alternate days (3 times/week) for eight-weeks. Prior to their assigned exercise session, all participants completed a five-minute warm-up at 50-60% maximal heart rate and completed their respective session with a three-minute cool-down at 40-50% maximal heart rate.

The MICT group was prescribed a 40-minute treadmill session at 65-75% of maximal heart rate throughout the eight-week intervention. The HIIT group underwent 15 bouts of 30 seconds at 90–95% maximal heart rate followed by 60 seconds of recovery at an equivalent speed to achieve 50-55 % of maximal oxygen consumption on a treadmill. In addition, they were encouraged to continue with their regular daily routines but were discouraged to engage in any other form of exercise. They were provided an Omron HJ-112™ (Bannockburn, IL) pedometer to monitor their daily ambulatory activity.

We used the percentage of $VO_2\text{max}$ for recovery to determine an accurate speed during the recovery period for each participant considering that 60 seconds is not enough time for the heart rate to decrease and provide an accurate measurement of recovery. We considered using this method to provide a more accurate estimate of recovery intensity.

A qualified trainer was present throughout each session to ensure participants reached and maintained the desired intensity. The speed of the

treadmill was adjusted manually while the elevation was maintained constant at 10%. In addition, following their respective interventions, all participants performed a resistance-training program three times per week following established guidelines (22) with a qualified trainer. The purpose of this non-differential co-intervention was simply to introduce participants to the benefits of resistance training. Considering its intensity, we believe this intervention did not have any influence on any of the primary or secondary outcomes (24).

To control selection bias and minimize confounding variables, a randomization sequence was generated through four- and six-size permuted blocks with a 1:1 ratio between the groups (25). The concealment was made using numbered, sealed envelopes, and the volunteers were assigned to either the HIIT or the MCIT group according to the order of entry in the study. An investigator without direct contact with any of the study participants completed the blinding procedures. Besides, to control information bias, those responsible for recruitment, evaluation, and analysis of the outcome data were blinded to the group assignment and only completed the testing sessions. The staff responsible for conducting the exercise intervention was trained according to the protocols designed for each program. The initial and final evaluations of the outcomes were made at the same time of day, and the interventions were carried out individually (24). Identification codes were used for the participants and all the information was stored in file cabinets and password-secured computers only available to the researchers.

In order to determine appropriate sample size, a mean difference in $VO_2\text{max}$ of 3.5 ml/kg/min with standard deviations (SD) of 2.6 and 4.6 for the HIIT and MICT groups, respectively (10), was considered as a minimal difference to reduce cardiovascular disease risk (3,4). We used a 95% confidence level, an alpha error of 5%, and a beta error of 20% assuming a 1:1 ratio between the groups. Using Epidat software (version 4.0), a sample of 20 individuals per group plus 10% for potential losses was calculated.

Intention-to-treat analyses were conducted for comparisons between groups. Also, sensitivity analyses (per protocol analysis) were completed for subjects who completed $\geq 70\%$ of the training sessions. Normality, homoscedasticity, and linearity tests were considered as basic assumptions for the use of t tests and analysis of covariance (ANCOVA) (26) to control for the baseline value of $VO_2\text{max}$ and adjust for possible confounding variables. Logarithmic transformations and Box-Cox transformations were performed only for secondary outcomes (systolic blood pressure and diastolic blood pressure). However, it was not possible to comply with the parametric assumptions. As summary measures, means and SD were used.

The Mann-Whitney U test was adopted when the assumptions for parametric analyses could not be obtained; in this case, the values are reported in medians and interquartile ranges (IQR). Two-tailed statistical significance tests with a $p < 0.05$ and a 95% confidence level (95% CI) were used. Multiple imputation techniques were applied to the management of missing data for $VO_2\text{max}$, systolic blood pressure, and diastolic blood pressure (27). All calculations were performed with the Stata software (version 13).

Results

Data were collected between March, 2015, and May, 2016. A total of 135 individuals who responded to our request to participate were evaluated. Of those who responded, 26 did not meet the selection criteria, three did

not agree to participate, and 62 did not enter the study for other reasons (primarily due to time difficulties to comply with the sessions). The final sample consisted of 44 men distributed evenly between the HIIT and MICT groups (N=22 for HIIT group, and N=22 for MICT group) (figure 1).

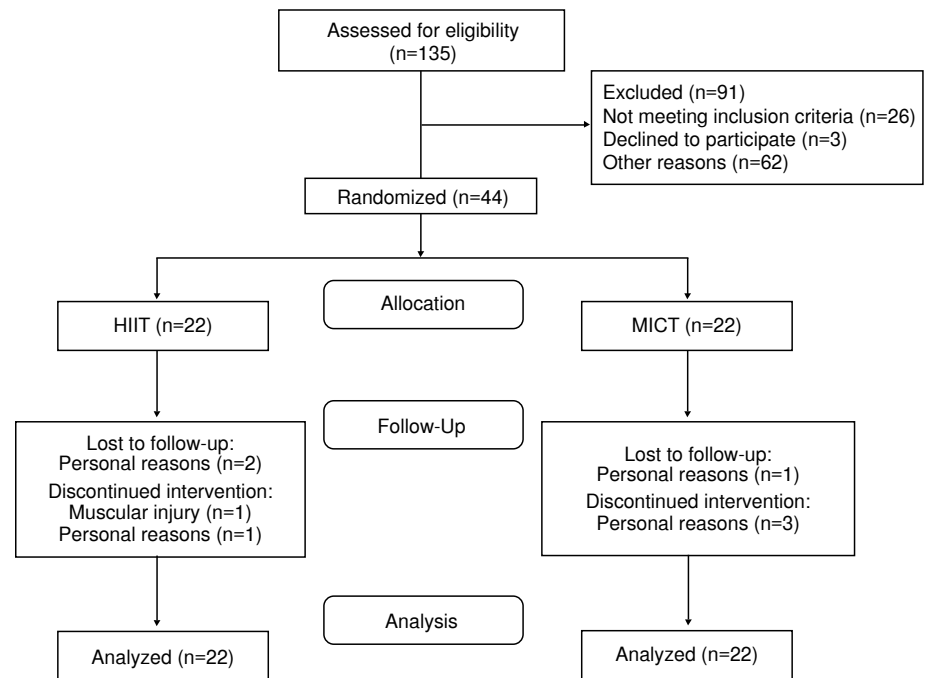


Figure 1. Participant enrollment flow diagram

Participant baseline characteristics are presented in table 1. At baseline, the HIIT group was significantly older and heavier than the MICT group. Besides, the HIIT group had a significantly higher body mass index (BMI), waist circumference, and fat mass (%) than the MICT group. Fat-free mass was significantly higher in the MICT group compared to the HIIT group. In the other variables evaluated, no differences were found between the groups (table 1). Regarding the losses to follow-up, two were reported in the HIIT group and one in the MICT group (figure 1). For these three subjects, multiple imputation techniques described above were used and conducted with intention-to-treat analyses.

After adjusting for baseline values, age, BMI, weight, and height there was no significant difference in the primary outcome (VO_2 max) between the HIIT and MICT groups (difference (Δ) 0.98 ml/kg/min; 95% CI -2.26 to 4.23, $p=0.54$) (table 2). VO_2 max increased significantly in those who received the HIIT intervention (39.2 ± 6.0 ml/kg/min vs. 42.7 ± 6.0 ml/kg/min; Δ 3.5 ml/kg/min; 95% CI 2.02 to 4.93; $p=0.0001$) while in the MICT group, the increase of this variable did not reach significance (VO_2 max change 1.9 ml/kg/min; 95% CI -0.98 to 4.82; $p=0.18$). When analyzing the VO_2 max changes individually, it was possible to identify that the participants of the HIIT group presented an average gain of 9.4% vs. 6.0% found in the subjects in the MICT protocol ($p=0.67$) with a positive intervention response of 81.8% in HIIT compared to 59% for MICT ($p=0.09$).

In the per protocol analyses (those who completed $\geq 70\%$ of the programmed training sessions), no differences were found in the primary outcome (VO_2 max) between groups post-training (HIIT: 44.0 ± 5.8 ml/kg/min vs. MICT: 45.1 ± 8.9 ml/kg/min; $p=0.74$). In the intragroup analyses, statistically significant

differences and important practical differences were found in both those who received the HIIT intervention (40.4 ± 6.0 ml/kg/min vs. 44.0 ± 5.8 ; $p= 0.0004$), as well as in the MICT group (41.7 ± 9.8 ml/kg/min vs. 45.1 ± 8.9 ; $p= 0.03$).

Systolic blood pressure and diastolic blood pressure values did not meet the assumption needed to utilize the ANCOVA test, therefore, the non-parametric Mann-Whitney U test was used. In the intention to treat analyses, a lower value of systolic blood pressure was found post-intervention in those in the MICT group (HIIT: 124.5 mm Hg, IQR 120.0–129.5 vs. MICT: 116.5 mmHg, IQR 115.0–119.0); median difference 8 mm Hg ($p<0.001$). In addition, no significant differences were found after eight-weeks in diastolic blood pressure between the groups (HIIT: 79.2 mmHg, IQR 76.0–85.0 vs. MICT: 79.0 mm Hg, IQR 71.5–83.0); median difference 0.2 mm Hg ($p= 0.15$) (table 2).

Table 1. Baseline characteristics of study subjects

	HIIT (n=22)	MICT (n=22)	p
Age (years)**	29.5 (25-38)	23.5 (20-34)	0.03‡
Height (cm)*	173.5 (5.79)	171.9 (5.69)	0.36
Weight (kg)**	79.1 (74.6-85.9)	69.3 (63.2-77.4)	0.008‡
BMI (kg/m ²)**	26.2 (24.6–27.3)	23.5 (22.0–26.8)	0.03‡
WC (cm)**	87.9 (83.0–91.7)	79.2 (74.7–87.0)	0.006‡
FM (%)*	26.2 (5.6)	20.7 (7.4)	0.008‡
FFM (%)*	35.9 (3.5)	39.7 (5.0)	0.006‡
PAL (Mets/min/week)**	880.0 (540.0-1440.0)	960.0 (360.0-1280.0)	0.91
VO ₂ máx (mL/kg/minutes)*	39.2 (6.0)	42.2 (9.1)	0.20
SBP (mm Hg)**	120.7 (116.0-133.5)	118.2 (116.0-126.0)	0.40
DBP (mm Hg)**	79.2 (76.0-85.0)	77.7 (70.5-87.5)	0.72

BMI: Body mass index; WC: Waist circumference; FM: Fat mass; FFM: Fat-free mass; PAL: Physical activity level; VO₂máx: Maximum oxygen consumption; SBP: Systolic blood pressure; DBP: Diastolic blood pressure

* Values are given as mean \pm SD.

** Values are given as medians and interquartile ranges.

‡ Differences between groups at base line, $p<0.05$

Table 2. Effects of HIIT versus MICT on VO₂max and systolic blood pressure/diastolic blood pressure after eight weeks: **A)** Intention-to-treat analysis, and **B)** per-protocol analysis

A. Intention to treat analysis				
Variables	HIIT (n=22)	MICT (n=22)	Differences between groups (post-intervention)	p
VO ₂ máx (ml/kg/min)*	42.7 (6.0)	44.1 (8.7)	0.98 (-2.26 to 4.23)	0.54
SBP (mm Hg)**	124.5 (120.0-129.5)	116.5 (115.0-119.0)	8.0	<0.001‡
DBP (mm Hg)**	79.2 (76.0-85.0)	79.0 (71.5-83.0)	0.2	0.15
B. Subjects who completed the protocol				
Variables	HIIT (n=18)	MICT (n=18)	Differences between groups (post-intervention)	p
VO ₂ máx (ml/kg/min)*	44.0 (5.8)	45.1 (8.9)	0.50 (-2.64 to 3.63)	0.75
SBP (mm Hg)**	125.7 (120.0-129.5)	117.2 (115.5-121.0)	8.5	0.0005‡
DBP (mm Hg)**	79.2 (75.0-85.0)	79.2 (71.5-83.0)	0.0	0.26

For maximum oxygen consumption (VO₂máx), values were adjusted for base line and confounding variables (age, body mass index, weight and height).

SBP: Systolic blood pressure; DBP: Diastolic blood pressure

* Values are given as mean \pm SD.

** Values are given as medians and interquartile ranges.

‡ Differences between groups post-intervention, $p<0.05$

ANCOVA (95 % confidence interval) for VO₂máx

Mann-Whitney U Test for SBP and DBP

In the intra-group analyses, no median differences were observed in systolic blood pressure for those who received the HIIT intervention (120.7 mm Hg, IQR 116.0-133.5 vs. 124.5 mm Hg, IQR 120.0 - 129.5; median difference 3.8 mm Hg; $p=0.15$), or in diastolic blood pressure (79.2 mm Hg, IQR 76.0-85.0 vs. 79.2 mm Hg, IQR 76.0-85.0; $p=0.40$). In the MICT group, systolic blood pressure was significantly reduced after the intervention (118.2 mm Hg, IQR 116.0-126.0 vs. 116.5 mm Hg, IQR 115.0-119.0); median difference -1.7 mm Hg ($p=0.02$), while diastolic blood pressure did not change (77.7 mm Hg, IQR 70.5-87.5 vs. 79.0 mm Hg, IQR 71.5-83.0); median difference 1.3 mm Hg ($p=0.77$).

In the per protocol analyses, the post-intervention values of systolic blood pressure were lower in the MICT group compared to the HIIT group (MICT: 117.2 mm Hg, IQR 115.5-121.0 vs. HIIT: 125.7 mm Hg, IQR 120.0-129.5; $p<0.001$), whereas for the diastolic blood pressure, the differences did not achieve statistical or practical difference (MICT: 79.2 mm Hg, IQR 71.5-83.0 vs. HIIT: 79.2 mm Hg, IQR 75.0-85.0; $p=0.26$). In the intragroup analysis of the per protocol analyses, no statistically significant differences were found in the systolic blood pressure and diastolic blood pressure values (table 2).

Training intensities were individually monitored and controlled by trained personnel who continuously supervised the heart rate monitor of each participant during the exercise sessions to guarantee compliance with the intensities for each load. The mean heart rate was determined to be 169.6 beats per minute, equivalent to 91.2% maximum heart rate.

In total, five adverse events (three in the MICT group and two in the HIIT group) occurred during the interventions period, all of which affected the musculoskeletal system. The three events in the MICT group included one event of Hoffitis in the right knee not associated with training in this study, as it was the result of lifting a heavy object at home. The second event was muscle fatigue in the gastrocnemius associated with running on the treadmill, which improved by reducing the training load. The third event was a right medial ankle contusion not associated with the interventions, which occurred while the participant played soccer a day after finishing the training sessions and forced us to postpone the final evaluations for 12 days.

In the HIIT group, there were two adverse events associated with the intervention. The first was right pes anserine bursitis due to training and associated with the inclination of the treadmill. The participant abandoned the intervention after 15 sessions because the symptoms did not improve, despite treatment with oral non-steroidal anti-inflammatories. The second event was tendinitis in the vastus medialis oblique in its insertion in the patella, which was associated with training on the treadmill. The participant partially improved after reducing the training load and medication with non-steroidal anti-inflammatory drugs.

Regarding adherence, 18 individuals in the HIIT group and 19 in the MICT group (81.8% vs. 86.4%, respectively; $p=0.71$) completed $\geq 70\%$ of the planned sessions. It should be noted that 13 subjects in the HIIT group and 10 volunteers in the MICT group completed $\geq 90\%$ of the sessions.

Discussion

Our main finding suggests that after adjusting for confounding variables, such as age, BMI, weight, height, and baseline $VO_2\max$, the HIIT protocol was not superior to the MICT protocol in improving the $VO_2\max$ of this group of apparently healthy young men who engaged in physical activity for less than

150 minutes/week. This finding is congruent with recent meta-analysis results from apparently healthy young adults reporting that HIIT-based interventions (regardless of their characteristics) did not improve significantly the performance with cardiorespiratory fitness compared to MICT protocols (17,28,29).

Conversely, from the practical and statistical points of view, those with health impairments, such as classic cardiovascular risk factors (i.e., obesity, hypertension, and blood glucose disorders, among others), coronary heart disease, and heart failure, the HIIT protocols have shown to be more advantageous than the MICT ones to increase $VO_2\text{max}$, (15,30-34). It is noteworthy that in these individuals, an increase of 1.0 ml/kg/min in $VO_2\text{max}$ has been associated with a reduction in overall mortality, which is considered a clinically significant and relevant change. However, in apparently healthy individuals, an increase of at least 3.5 ml/kg/min in $VO_2\text{max}$ (1 *metabolic equivalent of task*, MET) is required for long-term reductions in mortality and morbidity (4,35,36).

As it is well known, randomization aims at balancing and accounting for known and unknown factors that could affect the dependent variables; however, it cannot fully guarantee the identification of these factors, especially when sample sizes are small. Therefore, when there are differences between groups in some of the variables, as in this case, they should be adjusted in the final analyses (37), which justifies the use of an ANCOVA in our $VO_2\text{max}$ analyses.

It should be noted that the HIIT group had a baseline $VO_2\text{max}$ that was 3.0 ml/kg/min lower than the MICT group, which could explain the higher gain obtained by this group (+3.5 ml/kg/min) compared to the increase in the MICT group (+1.9 ml/kg/min). This finding is congruent with previous results revealing that HIIT has an apparent adaptive effect on $VO_2\text{max}$ in favor of less trained subjects (30). Besides, we should mention that individuals in the HIIT group were about six years older than those in the MICT group; yet, despite these differences, participants in the HIIT group were still able to improve $VO_2\text{max}$ values, although it is well established that $VO_2\text{max}$ decreases about 10% per decade, regardless of physical activity (38). These findings support the notion that HIIT is beneficial to improve aerobic capacity regardless of age and initial fitness levels.

In the intragroup analyses, the $VO_2\text{max}$ increase was clinically significant in the participants undergoing HIIT, as it changed from 39.2 ml/kg/min at baseline to 42.7 ml/kg/min at the end of the intervention. This finding is similar to that in other studies, which show that a HIIT program improves aerobic power in young, sedentary adults after two and eight weeks of training (39) compared to those who do not exercise. Moreover, the intragroup gains in $VO_2\text{max}$ observed in HIIT averaged 9.4% reaching up to 28.9% while the MICT group only averaged a $VO_2\text{max}$ increase of 5.9% with increases up to 43.1%.

The improvement in $VO_2\text{max}$ among those who completed HIIT could be explained by central adaptations including increases in systolic volume and cardiac output, as well as peripheral changes (40). Also, peripheral changes, increased number and size of mitochondria, increased mitochondrial enzyme activity, arterial vasodilation, increased nitric oxide bioavailability, and reduced oxidative stress may achieve significant improvements in CRF. It should be noted that although no differences were found in $VO_2\text{max}$ changes when comparing HIIT vs. MICT, interval training achieved a clinically significant increase in this variable. This benefit occurred with a 7.5-minute stimulus representing 19% of the continuous protocol stimulus and 56%

of the total effective exercise time. These findings suggest that important beneficial physiological adaptations could be generated in a shorter amount of time. Besides, in previous studies (9,10,14,18,19), researchers used HIIT interventions with longer load periods and recovery times and fewer or equal intervals compared to this randomized clinical trial.

In regards to the secondary outcome, a lower systolic blood pressure was found in individuals who received the MICT intervention, a difference that achieved statistical and clinical significance. It is worth noting that systolic blood pressure in the HIIT group increased by 3.8 mm Hg compared to its initial value, whereas the MICT group systolic blood pressure was reduced by 1.7 mm Hg from baseline. These changes explain the difference in blood pressures between the groups. Our findings disagree with previous data about the benefits attributed to aerobic exercise, as both HIIT and MICT contributed to the reduction of systolic blood pressure and diastolic blood pressure with higher decreases in hypertensive individuals (21).

Nonetheless, no physiological explanations can be provided by the authors to support the increase in systolic blood pressure in the HIIT group other than coincidence, as all the evaluations were performed at the same time of day, under equal conditions, and following the same protocols. This finding differs from that reported in two meta-analyses involving people with cardiovascular risk factors in which no differences in systolic blood pressure were found in those trained with HIIT vs. MICT (15,40).

On the other hand, there is evidence indicating that to improve vascular function, the long-duration HIIT is more effective than the short-duration training (40). This could explain the reduction in systolic blood pressure in those receiving the MICT, as the HIIT stimulus only lasted a little over seven minutes.

For diastolic blood pressure, no differences were found between the groups after the intervention or when the baseline and post-intervention values were compared within each of the groups. These results are partially consistent with those found in the meta-analysis by Ramos, *et al.* (40), who found that postmenopausal women with cardiovascular risk factors achieved a reduction in this blood-pressure component. These results also coincide with the findings in Hwang, *et al.*'s (15) meta-analysis reporting no differences in the systolic blood pressure and diastolic blood pressure values in individuals with cardio-metabolic alterations.

While we applied the stimulus with the strength protocol in both groups as a non-differential co-intervention, it is possible that it had some influence on the effect of VO_2 max, as well as systolic blood pressure and diastolic blood pressure. However, according to the results presented by Buckley, *et al.* (41) in their randomized clinical trial, when they compared a HIIT protocol against a protocol including HIIT and strength exercises in recreationally active women, they found no statistically significant differences between the groups for VO_2 max (38.3 ± 4.6 vs. 38.5 ± 5.4 ml/kg/min; $p=0.99$). Similarly, a recent study among patients with cardiovascular disease compared the effects of a six-month HIIT program and those of an MICT including resistance training during the previous three months and reported no significant improvements in VO_2 peak for either of the two groups with three and six months of training (HIIT: 28 ± 17 % vs. MICT: 26 ± 29 %; $p = 0.824$) or systolic blood pressure and diastolic blood pressure ($p \geq 0.05$) (42). Therefore, we believe our 'secondary intervention' did not play a significant role in altering VO_2 max for any of the groups.

The practical justification for having the strength component in both intervention protocols lies in the need to include strength exercises as a fundamental part of any holistically oriented physical activity program given the importance of incorporating physical fitness, cardiorespiratory endurance, muscular strength, and endurance in exercise intervention programs. Thus, our study focused on improving not only cardiovascular health, but also musculoskeletal health in apparently healthy adults (22). Our results may have a greater practical applicability, given that recommendations for physical activity aim to develop the different components of physical fitness, especially the cardiorespiratory and musculoskeletal ones.

A familiarization period before the intervention protocol may be beneficial in reducing the adverse effects of exercise training. Although our study only reported a total of five incidents in the groups, it would be beneficial to reduce such events. The familiarization period could help individuals adjust to the demand of the different loads, given the subjects' low level of physical activity.

Besides the methodological design used (randomized clinical trial), the main strength of our study was conducting the training sessions in an individualized manner and under the constant supervision of a qualified trainer. Nevertheless, our study is not without limitations: Firstly, we could not control the participants' physical activity levels beyond the research interventions, which may have affected the variations in VO_2 max from baseline values and hindered the detection of possible differences between the two groups. Although the volunteers were given a pedometer to monitor their physical activity, it was not possible to record the steps in all of the participants. Another limitation was not using the VO_2 max baseline values as an inclusion criterion for the volunteers. Although the level of physical activity was used as an inclusion criterion through the Global Physical Activity Questionnaire (GPAQ), some of the individuals who were randomly assigned to the MICT group had VO_2 max baseline values above the average among subjects with low physical activity levels according to age. Given the characteristics of the interventions in both arms of our study, based on exercise sessions with a group of volunteers exercising at moderate intensity and another group at high intensity, it was difficult to blind participants to the interventions. Finally, we should note that the sample size was calculated with an 80% power.

In summary, the results of this randomized clinical trial do not allow us to affirm that HIIT is superior to MICT for increasing VO_2 max in healthy 18 to 44-year-old men or vice versa. However, it may be said, as in Milanovic, *et al.*'s (17) meta-analysis, that both methods increase VO_2 max, although when compared none of them shows a more beneficial outcome. As suggested by Gist, *et al.* (28) and Weston, *et al.* (30), additional studies are required not only to test the effectiveness of HIIT on VO_2 max, but also its viability vis-à-vis musculoskeletal limitations, exercise tolerance, and adherence to the protocol. Finally, since most exercise intervention studies have been developed and completed in controlled environments and under constant supervision, it would be very practical to carry out further investigations under less controlled conditions in the context of participants' daily life.

Acknowledgments

The authors are indebted to everyone in the laboratory of physical activity and sports sciences at *Universidad de Antioquia* for their help and support throughout the project.

References

1. Adams K. Exercise physiology. In: Swain D, Brawner C, Chambliss H, Nagelkir P, Paternostro M, Swank A, editors. ACSM's Resource Manual for Exercise Testing and Prescription. 7th edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2014. p. 57-8.
2. Kenney W, Wilmore J, Costill D. Adaptations to aerobic and anaerobic training. In: Physiology of Sport and Exercise. 5th edition. Champaign, IL: Human Kinetics; 2012. p. 14.
3. Gulati M, Pandey DK, Arnsdorf MF, Lauderdale DS, Thisted RA, Wicklund RH, *et al.* Exercise capacity and the risk of death in women: The St James Women Take Heart Project. *Circulation*. 2003;108:1554-9. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000091080.57509.E9>
4. Myers J, Prakash M, Froelicher V, Do D, Partington S, Atwood JE. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. *N Engl J Med*. 2002;346:793-801. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa011858>
5. Laukkanen JA, Lakka TA, Rauramaa R, Kuhanen R, Venäläinen JM, Salonen R, *et al.* Cardiovascular fitness as a predictor of mortality in men. *Arch Intern Med*. 2001;161:825-31. <https://doi.org/10.1001/archinte.161.6.825>
6. Thompson WR. Worldwide survey of fitness trends for 2017. *ACSM'S Health & Fitness Journal*. 2016;20:8-17. <https://doi.org/10.1249/FIT.0000000000000252>
7. Thompson WR. Worldwide survey of fitness trends for 2016: 10th anniversary edition. *ACSM'S Health & Fitness Journal*. 2015;19:9-18. <https://doi.org/10.1249/FIT.0b013e3182a955e6>
8. Wisloff U, Stoylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognum O, Haram PM, *et al.* Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: A randomized study. *Circulation*. 2007;115:3086-94. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.675041>
9. Helgerud J, Høydal K, Wang E, Karlsen T, Berg P, Bjerkaas M, *et al.* Aerobic high-intensity intervals improve V O₂max more than moderate training. *Med Sci Sports Exerc*. 2007;39:665-71. <https://doi.org/10.1249/mss.0b013e3180304570>
10. Tsekouras YE, Magkos F, Kellas Y, Basioukas KN, Kavouras SA, Sidossis LS. High-intensity interval aerobic training reduces hepatic very low-density lipoprotein-triglyceride secretion rate in men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295:E851-E8. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90545.2008>
11. Gibala MJ, McGee SL. Metabolic adaptations to short-term high-intensity interval training: A little pain for a lot of gain? *Exerc Sport Sci Rev*. 2008;36:58-63. <https://doi.org/10.1097/JES.0b013e318168ec1f>
12. Nybo L, Sundstrup E, Jakobsen MD, Mohr M, Hornstrup T, Simonsen L, *et al.* High-intensity training versus traditional exercise interventions for promoting health. *Med Sci Sports Exerc*. 2010;42:1951-8. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181d99203>
13. Ziemann E, Grzywacz T, Luszczuk M, Laskowski R, Olek RA, Gibson AL. Aerobic and anaerobic changes with high-intensity interval training in active college-aged men. *J Strength Cond Res*. 2011;25:1104-12. <https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e3181d09ec9>
14. Tjønnå AE, Leinan IM, Bartnes AT, Jenssen BM, Gibala MJ, Winett RA, *et al.* Low-and high-volume of intensive endurance training significantly improves maximal oxygen uptake after 10-weeks of training in healthy men. *PloS One*. 2013;8:e65382. <https://doi.org/doi.org/10.1371/journal.pone.0065382>
15. Hwang C-L, Wu Y-T, Chou C-H. Effect of aerobic interval training on exercise capacity and metabolic risk factors in people with cardiometabolic disorders: A meta-analysis. *J Cardiopulm Rehabil Prev*. 2011;31:378-85. <https://doi.org/10.1097/HCR.0b013e31822f16cb>
16. Bacon AP, Carter RE, Ogle EA, Joyner MJ. VO₂max trainability and high intensity interval training in humans: A meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8:e73182. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073182>
17. Milanovic Z, Sporis G, Weston M. Effectiveness of high-intensity interval training (HIT) and continuous endurance training for VO₂max improvements: A systematic review and meta-analysis of controlled trials. *Sports Med*. 2015;45:1469-81. <https://doi.org/10.1007/s40279-015-0365-0>
18. Hatle H, Støbakk PK, Mølmen HE, Brønstad E, Tjønnå AE, Steinshamn S, *et al.* Effect of 24 sessions of high-intensity aerobic interval training carried out at either high or moderate frequency, a randomized trial. *PloS One*. 2014;9:e88375. <https://doi.org/doi.org/10.1371/journal.pone.0088375>

19. Moholdt TT, Amundsen BH, Rustad LA, Wahba A, Lovo KT, Gullikstad LR, *et al.* Aerobic interval training versus continuous moderate exercise after coronary artery bypass surgery: A randomized study of cardiovascular effects and quality of life. *Am Heart J.* 2009;158:1031-7. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2009.10.003>
20. Cornelissen VA, Smart NA. Exercise training for blood pressure: A systematic review and meta-analysis. *J Am Heart Assoc.* 2013;2:e004473. <https://doi.org/10.1161/JAHA.112.004473>
21. Molmen-Hansen HE, Stolen T, Tjonna AE, Aamot IL, Ekeberg IS, Tyldum GA, *et al.* Aerobic interval training reduces blood pressure and improves myocardial function in hypertensive patients. *Eur J Prev Cardiol.* 2012;19:151-60. <https://doi.org/10.1177/1741826711400512>
22. Garber CE, Blissmer B, Deschenes MR, Franklin BA, Lamonte MJ, Lee IM, *et al.* American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: Guidance for prescribing exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2011;43:1334-59. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e318213fefb>
23. Boutron I, Moher D, Altman DG, Schulz KF, Ravaud P, Group C. Extending the CONSORT statement to randomized trials of nonpharmacologic treatment: Explanation and elaboration. *Ann Intern Med.* 2008;148:295-309. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-148-4-200802190-00008>
24. Arboleda-Serna VH, Arango-Vélez EF, Gómez-Arias RD, Feito Y. Effects of a high-intensity interval training program versus a moderate-intensity continuous training program on maximal oxygen uptake and blood pressure in healthy adults: Study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2016;17:413. <https://doi.org/10.1186/s13063-016-1522-y>
25. Saghaei M. Random allocation software for parallel group randomized trials. *BMC Med Res Methodol.* 2004;4:26. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-4-26>
26. Vickers AJ, Altman DG. Analysing controlled trials with baseline and follow up measurements. *BMJ.* 2001;323:1123-4. <https://doi.org/10.1136/bmj.323.7321.1123>
27. Sterne JA, White IR, Carlin JB, Spratt M, Royston P, Kenward MG, *et al.* Multiple imputation for missing data in epidemiological and clinical research: Potential and pitfalls. *BMJ.* 2009;338:b2393. <https://doi.org/10.1136/bmj.b2393>
28. Gist NH, Fedewa MV, Dishman RK, Cureton KJ. Sprint interval training effects on aerobic capacity: A systematic review and meta-analysis. *Sports Med.* 2014;44:269-79. <https://doi.org/10.1007/s40279-013-0115-0>
29. Weston KS, Wisloff U, Coombes JS. High-intensity interval training in patients with lifestyle-induced cardiometabolic disease: A systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med.* 2014;48:1227-34. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2013-092576>
30. Weston M, Taylor KL, Batterham AM, Hopkins WG. Effects of low-volume high-intensity interval training (HIT) on fitness in adults: A meta-analysis of controlled and non-controlled trials. *Sports Med.* 2014;44:1005-17. <https://doi.org/10.1007/s40279-014-0180-z>
31. Liou K, Ho S, Fildes J, Ooi SY. High intensity interval versus moderate intensity continuous training in patients with coronary artery disease: A meta-analysis of physiological and clinical parameters. *Heart Lung Circ.* 2016;25:166-74. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2015.06.828>
32. Elliott AD, Rajopadhyaya K, Bentley DJ, Beltrame JF, Aromataris EC. Interval training versus continuous exercise in patients with coronary artery disease: A meta-analysis. *Heart Lung Circ.* 2015;24:149-57. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2014.09.001>
33. Pattyn N, Coeckelberghs E, Buys R, Cornelissen VA, Vanhees L. Aerobic interval training vs. moderate continuous training in coronary artery disease patients: A systematic review and meta-analysis. *Sports Med.* 2014;44:687-700. <https://doi.org/10.1007/s40279-014-0158-x>
34. Haykowsky MJ, Timmons MP, Kruger C, McNeely M, Taylor DA, Clark AM. Meta-analysis of aerobic interval training on exercise capacity and systolic function in patients with heart failure and reduced ejection fractions. *Am J Cardiol.* 2013;111:1466-9. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2013.01.303>
35. Kavanagh T, Mertens DJ, Hamm LF, Beyene J, Kennedy J, Corey P, *et al.* Peak oxygen intake and cardiac mortality in women referred for cardiac rehabilitation. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:2139-43. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2003.07.028>
36. Kodama S, Saito K, Tanaka S, Maki M, Yachi Y, Asumi M, *et al.* Cardiorespiratory fitness as a quantitative predictor of all-cause mortality and cardiovascular events in healthy men and women: A meta-analysis. *JAMA.* 2009;301:2024-35. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.681>

37. Abel U, Koch A. The role of randomization in clinical studies: Myths and beliefs. *J Clin Epidemiol.* 1999;52:487-97. [https://doi.org/10.1016/S0895-4356\(99\)00041-4](https://doi.org/10.1016/S0895-4356(99)00041-4)
38. Fernández-Vaquero A. Consumo de oxígeno: concepto, bases fisiológicas y aplicaciones. In: López-Chicharro J, Fernández -Vaquero A, editors. *Fisiología del Ejercicio.* 3rd edición. Madrid: Panamericana; 2008. p. 409-10.
39. Sloth M, Sloth D, Overgaard K, Dalgas U. Effects of sprint interval training on VO2max and aerobic exercise performance: A systematic review and meta-analysis. *Scand J Med Sci Sports.* 2013;23:e341-52. <https://doi.org/10.1111/sms.12092>
40. Ramos JS, Dalleck LC, Tjonna AE, Beetham KS, Coombes JS. The impact of high-intensity interval training versus moderate-intensity continuous training on vascular function: A systematic review and meta-analysis. *Sports Med.* 2015;45:679-92. <https://doi.org/10.1007/s40279-015-0321-z>
41. Buckley S, Knapp K, Lackie A, Lewry C, Horvey K, Benko C, *et al.* Multimodal high-intensity interval training increases muscle function and metabolic performance in females. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2015;40:1157-62. <https://doi.org/10.1139/apnm-2015-0238>
42. Currie KD, Bailey KJ, Jung ME, McKelvie RS, MacDonald MJ. Effects of resistance training combined with moderate-intensity endurance or low-volume high-intensity interval exercise on cardiovascular risk factors in patients with coronary artery disease. *J Sci Med Sport.* 2015;18:637-42. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2014.09.013>

Artículo original

Síndrome de desgaste profesional, índice de masa corporal y otros factores asociados con la labor de profesores de educación física de Ibagué, Colombia

Felipe Augusto Reyes-Oyola^{1,2}, Constanza Palomino-Devia³, Néstor William Aponte-López³

¹ Programa de Licenciatura en Pedagogía Infantil, Corporación Universitaria Minuto de Dios, Ibagué, Colombia

² Programa de Licenciatura en Educación Física, Facultad de Ciencias de la Educación, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia

³ Facultad de Ciencias de la Educación, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia

Introducción. El síndrome de desgaste profesional en profesores ha ido en aumento durante las últimas décadas y ha suscitado interés por su estudio.

Objetivo. Determinar los grados del síndrome de desgaste profesional y su asociación con otros factores de los profesores de educación física de las instituciones educativas del municipio de Ibagué.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio descriptivo y transversal de 111 docentes de educación física de los colegios de Ibagué, con edades entre los 26 y los 65 años. Las variables sociodemográficas incluyeron el sexo y la edad, y se analizaron las variables propias del síndrome. La información se recolectó utilizando la versión para profesionales de la educación del 'Cuestionario para la evaluación del síndrome de quemarse (sic) con el trabajo' (CESQT-PE).

Resultados. Los profesores de educación física presentaron niveles bajos del síndrome; 22 docentes (19,8 %) presentaron niveles elevados y de estos, 15 respondían al perfil 1 (síndrome sin sentimientos de culpa) y siete al perfil 2 (síndrome con sentimientos de culpa). En los hombres la prevalencia del síndrome fue mayor, en tanto que en las mujeres las cifras fueron mayores en las dimensiones de desgaste físico y emocional, indolencia y sentimientos de culpa.

Conclusiones. Es necesario diseñar e implementar programas de formación orientados a explicar qué es el síndrome de desgaste profesional, cómo y por qué aparece, cómo evoluciona y cuáles son sus síntomas, así como estrategias de prevención e intervención individual que incluyan técnicas de relajación física y de control respiratorio.

Palabras clave: agotamiento profesional; síndrome de desgaste profesional; docentes; educación y entrenamiento físico; índice de masa corporal; grupos de edad; sexo.

Burnout syndrome, body mass index and other factors related to the practice of physical education teachers in Ibagué, Colombia

Introduction: The burnout syndrome in teachers has been increasing during the last decades, which explains its becoming a very important study area.

Objective: To determine the levels of the burnout syndrome and its relation with other factors among the physical education teachers in some schools of Ibagué.

Materials and methods: We conducted a cross-descriptive correlational study among 111 physical education teachers from Ibagué with ages ranging from 26 to 65 years. We included gender and age as the sociodemographic variables, as well as the burnout syndrome-related variables. For data collection, we used a questionnaire in Spanish for the evaluation of the burnout syndrome specifically among teaching professionals.

Results: The physical education teachers interviewed had low levels of burnout syndrome; 22 teachers (19.8%) had high levels and 15 of these responded to profile 1 (burnout syndrome without feelings of guilt) and 7 to profile 2 (burnout syndrome with feelings of guilt). Burnout syndrome prevalence was higher in men while in women the prevalence of physical and emotional exhaustion, indolence and negative attitudes, and feelings of guilt was higher.

Conclusions: It is necessary to design and implement training programs aimed at explaining what burnout syndrome is, how and why it appears, its progress and symptoms, as well as strategies of individual prevention and intervention such as physical relaxation and respiratory control techniques.

Keywords: Burnout, professional; faculty, physical education and training; body mass index; age; sex.

Recibido: 24/01/18

Aceptado: 15/01/19

Publicado: 23/01/19

Citación:

Reyes-Oyola FA, Palomino-Devia C, Aponte-López NW. Síndrome de desgaste profesional, índice de masa corporal y otros factores asociados con la labor de profesores de educación física de Ibagué, Colombia. *Biomédica*. 2019;39:537-46. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4282>

Correspondencia:

Felipe Augusto Reyes-Oyola, Programa de Licenciatura en Pedagogía Infantil, Corporación Universitaria Minuto de Dios, Santa Helena Parte Alta, Ibagué, Colombia
Teléfono: 277 1212
fareyeso@ut.edu.co; freyesoyola@uniminuto.edu.co

Contribución de los autores:

Constanza Palomino-Devia y Felipe Augusto Reyes: trabajo de campo

Todos los autores participaron en todas las fases del desarrollo de este trabajo: concepción y diseño, revisión y búsqueda bibliográfica, tabulación, análisis e interpretación de los datos, redacción y revisión crítica del manuscrito, y aprobación de su versión final.

Financiación:

El estudio no requirió financiamiento.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

El síndrome de desgaste profesional (*burnout syndrome*), característico de los profesionales de servicios de ayuda o de servicios humanos, se caracteriza por un estado de agotamiento como consecuencia del trabajo intenso, en el que se descuidan las necesidades propias. Las personas que lo padecen se agotan por su abnegada dedicación al trabajo (1). En este sentido, para satisfacer las exigencias de su trabajo y cumplir con sus obligaciones laborales, los individuos se exigen y se esfuerzan más allá de sus posibilidades, pasan sobre sus propios intereses y capacidades, y pagan un elevado precio para incrementar su rendimiento.

El síndrome de desgaste profesional en el profesorado ha ido en aumento durante las últimas décadas. En este contexto, en un estudio en el que se analizó el síndrome en una muestra amplia de profesionales de distintos ámbitos laborales (n=3.758), se encontró que los docentes están entre los que más se ven afectados por él, comparados con los de otras ramas, como los gerentes y directivos, los psicoterapeutas y trabajadores sociales, los médicos y dentistas, los enfermeros, las amas de casa y los trabajadores. En los profesores de ambos sexos se encontró un mayor agotamiento emocional y un menor logro personal, y se registraron en mayor proporción actitudes y comportamientos negativos hacia las demás personas (2).

La educación, específicamente la labor docente, es una de las profesiones en las que predomina un continuo contacto social con otras personas; por ello, su ejercicio implica mayores posibilidades de desarrollar el síndrome de desgaste profesional, con las consecuencias nocivas previsibles para la calidad de la enseñanza. El síndrome afecta a los profesores de todas las áreas de formación escolar sin excepción y desencadena un proceso de desgaste profesional caracterizado por un estado de frialdad, alienación, cinismo y apatía, que evidentemente puede perjudicar el clima organizacional y social del aula, así como la calidad de la enseñanza, además de incidir en el aumento del ausentismo laboral (3). Asimismo, los profesores agotados entregan menos información a sus alumnos y no reconocen sus logros, aceptan en menor medida sus ideas e interactúan con menor frecuencia con ellos, son menos simpáticos en su lugar de trabajo, presentan una menor tolerancia a las interrupciones durante las clases, preparan ineficazmente el material de enseñanza, y su nivel de entrega y dedicación profesional es menor; es decir, se sienten alienados con respecto a su trabajo (4).

El síndrome no solo afecta la calidad de la enseñanza, sino que también perjudica la salud de los docentes en todas sus dimensiones. Un profesor no corre el riesgo de caerse de un andamio, ni se ve afectado por la silicosis, pero su entorno también supone un riesgo para su salud física y, sobre todo, mental (5).

Entre las variables sociodemográficas del profesorado asociadas con este síndrome sobresalen el sexo y la edad. En estudios sobre profesores griegos (6), brasileños (7), españoles (8), italianos (9) y venezolanos (10), se determinó la relación entre el estado del síndrome de desgaste profesional y la edad. Asimismo, en un estudio en docentes argentinos se estableció la relación entre las dimensiones del síndrome y la adiposidad con base en el índice de masa corporal (IMC), y se establecieron relaciones significativas entre este y la dimensión de la realización profesional, lo que indicó que, cuando un sujeto se siente profesionalmente realizado, se preocupa más por su salud, incluido el mantenimiento de un peso adecuado (11).

La naturaleza de la enseñanza de la educación física puede ocasionar en los docentes grados moderados o elevados del síndrome. Los docentes

de educación física se encuentran constantemente expuestos a factores laborales estresantes debido a las características de la asignatura, el constante movimiento del alumnado en la clase, el bajo estatus social entre el colectivo docente, y la falta de instalaciones y equipos adecuados o a sus malas condiciones (12), así como a la escasez del material didáctico disponible. Todo esto origina la disminución de los grados de motivación y la aparición del agotamiento físico y mental entre los profesionales (13).

En este contexto, y con base en las variables determinantes que explican la etiología del síndrome de desgaste profesional, el objetivo central del presente estudio fue determinar sus su intensidad y su relación con el IMC en los profesores de educación física de instituciones educativas del municipio de Ibagué, así como comparar los grados del síndrome entre los grupos por sexo y edad.

Materiales y métodos

El estudio tuvo un enfoque cuantitativo, no experimental, de diseño transversal y descriptivo (14). La población incluyó a los profesores del área de educación física de 61 instituciones educativas del municipio de Ibagué —55 establecimientos oficiales y seis privados—, distribuidas en las 13 comunas y seis corregimientos de la ciudad (15).

En el estudio se incluyeron a todos los docentes de educación física de Ibagué que laboraban en básica primaria, básica secundaria y media. El 76,6 % correspondía a hombres ($n=85$) y el 23,4 % a mujeres ($n=26$); las edades de los participantes estaban entre los 26 y los 65 años ($45,1 \pm 10,2$); el 84,7 % de ellos trabajaba en el sector oficial y el 15,3 % en el sector privado. Los profesores debían ser licenciados en el área de Educación Física y no se incluyó a quienes tenían a cargo la asignatura de educación física pero eran especializados en otra área educativa. Todos los docentes seleccionados accedieron a participar en el estudio.

La información se recolectó en tres etapas. En la primera, se registró la identificación general del docente, su edad, su sexo y la institución educativa a la cual pertenecía. En la segunda etapa, se determinó la masa corporal utilizando una báscula FitScan Body Monitor™ (BF-679F) (Tanita) y la estatura con un tallímetro mecánico para niños y adultos (ref. 216, seca), siguiendo los protocolos internacionales para la valoración antropométrica de la *International Society for the Advancement of Kinanthropometry* (ISAK) (16).

En la tercera etapa, se empleó el 'Cuestionario para la evaluación del síndrome de quemarse (sic) con el trabajo', en su versión para profesionales de la educación (CESQT-PE) (17), el cual consta de 20 preguntas cerradas con escalonamiento de tipo Likert. Las opciones de respuesta son: 0 (nunca), 1 (raramente: algunas veces al año), 2 (a veces: algunas veces al mes), 3 (frecuentemente: algunas veces por semana) y 4 (muy frecuentemente: todos los días).

Este cuestionario está conformado por las dimensiones de 'ilusión por el trabajo' (5 ítems), 'desgaste psíquico' (4 ítems), 'indolencia' (6 ítems) y 'culpa' (5 ítems). La 'ilusión por el trabajo' es el deseo del individuo de alcanzar las metas laborales porque supone una fuente de placer personal; el 'desgaste psíquico' es la aparición del agotamiento emocional y físico por el trato diario con personas que tienen problemas o los causan; la 'indolencia' es la aparición de actitudes negativas de indiferencia y cinismo hacia los

receptores de la labor que se desempeña, y la 'culpa' aparece a causa de los comportamientos y las actitudes negativas en el trabajo, en especial, hacia las personas con las que se establecen relaciones laborales (17).

Cuando las puntuaciones en la dimensión de la 'ilusión por el trabajo' son bajas y las del 'desgaste psíquico e indolencia' y de 'culpa' son altas, se considera que hay grados elevados del síndrome (17). Para determinar los grados altos y bajos del síndrome, se utilizó el procedimiento de Shiron, en el cual se consideran altas las puntuaciones de aquellos participantes con un promedio igual o superior a 2 (algunas veces al mes) en las dimensiones de 'desgaste psíquico', 'indolencia' y 'culpa' y con uno inferior a 2 (algunas veces al mes) en la dimensión de 'ilusión por el trabajo' (18).

Para categorizar los niveles del síndrome como 'perfil 1' o 'perfil 2', además de considerar las cuatro dimensiones mencionadas, el CESQT también permite una puntuación total del síndrome, la cual es el resultado de promediar las puntuaciones en los 15 ítems que conforman las dimensiones de 'ilusión por el trabajo', 'desgaste psíquico' e 'indolencia'. Los ítems de la dimensión de 'culpa' no contribuyen al cálculo de la puntuación del síndrome, ya que esta tiene como función distinguir entre dos perfiles diferenciados del síndrome: el perfil 1 (sin niveles altos de culpa) y el perfil 2 (con grados altos de culpa) (19).

Más explícitamente, el perfil 1 corresponde a individuos que sufren estrés moderado relacionado con el trabajo, y se caracterizan por demostrar poco entusiasmo para hacerlo y presentar altos niveles de agotamiento psicológico e indolencia, pero que, a pesar de tales problemas, todavía son capaces de hacer su trabajo y no experimentan fuertes sentimientos de culpa. Las personas que responden al perfil 2 son aquellas afectadas con mayor intensidad por los síntomas, pues no pueden hacer su trabajo correctamente y ello las lleva a desarrollar sentimientos de culpa (20).

La información recolectada se analizó con el paquete estadístico IBM-SPSS™, versión 23, mediante un análisis descriptivo que arrojó la media, la desviación estándar, la frecuencia absoluta y la frecuencia relativa expresadas en porcentajes, según el caso. Se obtuvieron los intervalos de confianza de las medias de 95 % como indicador de fiabilidad. Para las comparaciones entre grupos, se usó un modelo lineal general multivariante. La significación estadística se estableció con un valor de $p < 0,05$.

Para efectuar la comparación de medias de las dimensiones del síndrome de desgaste profesional según los grupos de edad, se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor. Para comprobar la existencia de diferencias entre las medias de las variables analizadas, se utilizó la prueba t de Student para dos muestras independientes. Por último, se determinó la relación entre las variables del síndrome y la edad y el IMC empleando el coeficiente de correlación de Pearson (r).

El estudio se ajustó a los parámetros éticos, como el derecho a no recibir ofensas, a la determinación personal, a la privacidad (en cuanto a los sentimientos, actitudes, valores, información personal, etc.) y a la conservación de la integridad personal.

Resultados

En el cuadro 1 se presenta el índice de masa corporal de los profesores participantes clasificado en bajo peso, peso normal, sobrepeso, obesidad I, obesidad II y obesidad III (21). Según los resultados obtenidos, el 60,4 % de

ellos tenía sobrepeso y obesidad, y el 38,7 %, peso normal. La distribución de los niveles del IMC por sexo también evidenció la prevalencia de sobrepeso en hombres (54,1 %) y en mujeres (57,7 %), y también, por grupos etarios: en menores de 40 años (54,1 %), de 40 a 50 años (58,3 %) y más de 50 años (52,6 %). Además, los valores del IMC en los hombres (25,82 kg/m²) fueron mayores que los de las mujeres (25,22 kg/m²), aunque sin diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$).

En el cuadro 2 se presentan los grados del síndrome de desgaste profesional de los participantes. Los resultados reflejan que el 80,2 % (n=89) de ellos presentaba grados bajos del síndrome y, el 19,8 % (n=22), grados altos.

De los 22 profesores con grados altos del síndrome, 15 (68,2 %) respondían al perfil 1 (sin sentimientos de culpa) y siete (31,8 %) al perfil 2 (con sentimientos de culpa). Los profesores con altos grados en el perfil 1 correspondían al 13,5 % del total y, en el perfil 2, al 6,3 %. Además, los análisis descriptivos de cada dimensión del síndrome evidenciaron que el 98,2 % de los profesores presentaba grados altos en la dimensión de 'ilusión por el trabajo', es decir, se sentían motivados por su trabajo, percibiéndolo como atractivo y agradable. En cuanto a la dimensión de 'indolencia', el 24,32 % de los profesores presentó grados altos, evidenciando actitudes negativas como cinismo e indiferencia frente a los demás integrantes de la comunidad educativa; por otro lado, el 75,68 % presentó promedios bajos en esta dimensión.

Con respecto a la dimensión de 'desgaste psíquico', el 65,77 % de los profesores obtuvo grados bajos, en tanto que el 34,23 % registró niveles altos de "agotamiento", tanto físico como emocional. Por último, en la dimensión de "culpa" el 82,88 % de los educadores presentó grados bajos, y el restante 17,12 %, promedios altos, lo que refleja que estos profesores pueden sentir mucha preocupación por los daños ocasionados, enojo contra sí mismos o temor de ser descubiertos.

Cuadro 1. Valores del índice de masa corporal, distribución por sexo y grupos etarios

Niveles de IMC [§]	Bajo peso (%)	Peso normal (%)	Sobrepeso (%)	Obesidad (%)
Todos (n=111)	0,9	38,7	55	5,4
Sexo				
Femenino (n=26)	0	38,5	57,7	3,8
Masculino (n=85)	1,2	38,8	54,1	5,4
Grupos etarios años				
<40 (n=37)	0	43,2	54,1	2,7
40 a 50 (n=36)	2,8	33,3	58,3	5,6
>50 (n=38)	0	39,5	52,6	7,9

[§] Índice de masa corporal

Cuadro 2. Frecuencia y porcentaje de profesores de educación física con grados altos y bajos del síndrome de desgaste profesional

SDP* y dimensiones	Niveles altos (≥ 2)		Niveles bajos (< 2)		Total	Total
	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)		
SDP	22	19,8	89	80,2	111	100
Perfil 1	15	68,2	-	-	15	13,5
Perfil 2	7	31,8	-	-	7	6,3
Ilusión por el trabajo	109	98,2	2	1,8	111	100
Indolencia	27	24,3	84	75,7	111	100
Desgaste psíquico	38	34,2	63	65,8	111	100
Culpa	19	17,1	92	82,9	111	100

* Síndrome de desgaste profesional

En el cuadro 3 se presentan los resultados del análisis estadístico descriptivo y la comparación de los grupos por sexo. Los resultados evidenciaron que los hombres tuvieron mayores grados de ilusión y motivación hacia su profesión en comparación con las mujeres, aunque sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Las mujeres tuvieron grados más altos en las dimensiones de 'desgaste psíquico', 'indolencia' o 'conductas negativas y sentimientos de culpa', con diferencias significativas en la dimensión de 'desgaste psíquico' ($p < 0,05$).

En el cuadro 4 se presentan los resultados de la comparación entre los grupos de edad en las dimensiones del síndrome. En la dimensión de 'ilusión por el trabajo', se observó que con la edad aumentaban los valores en la motivación por la labor docente. La indolencia disminuyó con la edad y el desgaste psíquico fue mayor en los docentes de menos de 30 años y en el grupo de 30 a 40 años. Los sentimientos de culpa fueron mayores en el grupo de los menores de 30 años. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones de los grupos de edad en las dimensiones del síndrome ($p > 0,05$).

En el cuadro 5 se registran los resultados de la prueba estadística del coeficiente de Pearson para determinar las posibles relaciones entre las dimensiones del síndrome y la edad y el IMC. Solo se evidenció una relación entre la edad y el síndrome, específicamente una correlación negativa débil entre la edad y la dimensión de 'desgaste psíquico' ($r = -0,214$; $p = 0,024$), es decir, a medida que aumentaba la edad, disminuyeron los grados de agotamiento emocional y físico en los profesores. El IMC no mostró ninguna relación con las dimensiones del síndrome ($p > 0,05$).

Cuadro 3. Niveles de las dimensiones del síndrome de desgaste profesional, comparación según sexo

Dimensión	Todos (n=111)		Mujeres (n=26)		Hombres (n=85)		p*
	X ± DE	IC ^{95%} †	X ± DE	IC ^{95%} †	X ± DE	IC ^{95%} †	
Ilusión por el trabajo	3,65±0,5	3,56-3,75	3,56±0,49	3,37-3,76	3,68±0,50	3,57-3,79	0,319
Desgaste psíquico	1,22±1,03	1,02-1,41	1,61±1,02	1,20-2,02	1,10±1	0,88-1,32	0,026
Indolencia	1,1±0,81	0,94-1,25	1,24±0,88	0,88-1,60	1,05±0,79	0,88-1,23	0,315
Culpa	0,94±0,73	0,80-1,08	0,96±0,81	0,63-1,28	0,93±0,71	0,78-1,09	0,891

X ± DE: promedio ± desviación estándar

† Media ± desviación estándar e intervalo de confianza de 95 %

* Nivel de significación entre promedios por sexo

Cuadro 4. Comparación entre grupos de edad en años de los profesores de educación física de Ibagué

Dimensión	<30 años (n=8)		30-40 años (n=32)		41-50 años (n=33)		>50 años (n=38)		p*
	X ± DE	IC ^{95%} †	X ± DE	IC ^{95%} †	X ± DE	IC ^{95%} †	X ± DE	IC ^{95%} †	
Ilusión por el trabajo	3,45±0,69	2,87-4,02	3,61±0,47	3,44-3,78	3,69±0,57	3,48-3,89	3,7±0,42	3,55-3,84	0,587
Desgaste psíquico	1,40±1,01	0,55-2,25	1,48±0,96	1,13-1,83	1,21±0,96	0,87-1,56	0,96±1,11	0,6-1,33	0,199
Indolencia	1,54±0,59	1,04-2,03	1,23±1,01	0,87-1,06	1,01±0,65	0,77-1,24	0,97±0,77	0,71-1,22	0,206
Culpa	1,05±0,93	0,27-1,82	0,98±0,79	0,7-1,27	1,01±0,67	0,77-1,24	0,82±0,69	0,59-1,05	0,677

X ± DE: promedio ± desviación estándar

† Media ± desviación estándar e intervalo de confianza de 95 % (IC95%)

* Nivel de significación entre promedios por grupos de edad

Cuadro 5. Correlación entre las variables del síndrome de desgaste profesional y la edad de los profesores de educación física

Variables		Dimensiones del SDP [‡]			
		Ilusión por el trabajo	Desgaste psíquico	Indolencia	Culpa
Edad	r [*]	0,086	-0,214*	-0,158	-0,106
	Nivel de significación	0,372	0,024	0,098	0,266
IMC [‡]	r [*]	-0,171	0,081	-0,048	0,026
	Nivel de significación	0,073	0,400	0,620	0,789

[‡] Síndrome de desgaste profesional

[‡] Índice de masa corporal

* Correlación de Pearson

* Correlación significativa= 0,05 (bilateral).

Discusión

Los resultados del presente estudio permitieron determinar los grados del síndrome de desgaste profesional y del índice de masa corporal en los profesores de educación física de las instituciones educativas del municipio de Ibagué; además, se determinó la relación entre las dimensiones del síndrome, la edad y el IMC.

Los datos del cuadro 1 evidencian que un poco más del 60 % de los profesores tenían sobrepeso y obesidad, cifra preocupante debido al papel de los profesionales de esta área en la promoción de buenos hábitos y estilos de vida. Esta imagen corporal afectaría la llamada triada de empatía, puesto que en estos profesores la falta de adecuada apariencia física repercute en la poca o nula influencia de sus mensajes sobre la práctica del deporte y el ejercicio físico y la salud dirigidos a los estudiantes (22).

Al comparar el IMC de los docentes de Ibagué con el registrado en otros estudios, se evidenció que en 479 profesores mexicanos de escuelas de zonas rurales y urbanas los valores fueron ligeramente más elevados, con prevalencias de sobrepeso y obesidad del 64 %; la prevalencia de sobrepeso fue de 51 % en los hombres y de 36 % en mujeres, en tanto que la obesidad afectó al 20 % de los maestros y al 22 % de las maestras (23). Por el contrario, en un estudio con 186 docentes de la provincia de Córdoba, Argentina, de edades entre los 23 y los 64 años, se reportó que el 78,5 % de ellos tenía un peso normal, en tanto que solo el 21,5 % tenía sobrepeso y obesidad (11); en cuanto a los niveles de IMC por sexo, se reportó un peso normal en 68,7 % de los hombres y en 86,4 % de las mujeres (11).

Los resultados reportados en el cuadro 2 indican grados bajos del síndrome en los participantes de Ibagué, lo que coincide con el estudio hecho en 106 docentes de educación física mexicanos, quienes registraron grados bajos en las dimensiones del síndrome de fatiga crónica (24). Asimismo, se hallaron bajos índices del síndrome en estudios sobre docentes de educación física de México (24) y Brasil (25-29).

Se consultaron algunos estudios sobre docentes de educación física de los sectores oficial y privado, por ejemplo, en España (8,26), en los que no se analizaron los grados del síndrome según el sector laboral. Es el caso de un estudio sobre profesores de todas las áreas llevado a cabo en dos instituciones educativas formales, una privada y una pública, de Cali, en el cual el 15 % de los profesores del colegio público y el 22 % de los educadores del privado presentaba grados moderados del síndrome (27).

En el mismo cuadro 2 se evidencia que el 34,2 % de los docentes de educación física de Ibagué se sentía agotado tanto física como emocionalmente, lo que probablemente conlleva conductas y actitudes negativas de cinismo, indiferencia, empleo de malas palabras en contra de los estudiantes, otros profesores, directivos e, incluso, padres de familia, con los consecuentes remordimientos debido a sus malos comportamientos.

En este sentido, en un estudio de 94 docentes de educación física brasileros de la ciudad de Pelotas (Estado de Río Grande del Sur), se encontraron altos grados de agotamiento emocional (60,6 %) y de despersonalización (22,3 %) (9). En otro estudio sobre profesores del municipio de Piraquara (Estado de Paraná), se encontró que 13 individuos (37,14 %) presentaban valores elevados de desgaste psíquico, tres (8,57 %), de indolencia, y tres, de culpa (25).

En este sentido, resulta positivo que la mayoría de los maestros de educación física de Ibagué presentaron grados elevados de ilusión por el trabajo, es decir, se sentían motivados frente a su labor educativa, y lograban las metas y propósitos profesionales establecidos, lo que constituye una fuente de satisfacción personal. Datos semejantes se hallaron en un estudio de 357 docentes de educación física españoles, que presentaban altos valores en la motivación intrínseca y la eficacia profesional (26) y, en otro de profesores brasileros, el porcentaje (5,71 %) (n=2) de valores bajos en la subescala de 'ilusión por el trabajo' fue mínimo (25).

En el cuadro 3 se evidencia que las profesoras registraron cifras más elevadas en las dimensiones de 'desgaste psíquico', 'indolencia' y 'culpa' en comparación con los hombres; esto coincide con los estudios sobre docentes brasileros (28,29), portugueses (30) y franceses (31), en los cuales se encontró que las profesoras registraban niveles más altos de agotamiento emocional y despersonalización. No obstante, en estos estudios las mujeres también reportaron un mayor sentimiento de realización personal, lo que no sucedió en el estudio de Ibagué, puesto que fueron los profesores quienes tuvieron mayores grados de ilusión por su trabajo. Asimismo, en un estudio de 219 profesores de educación física de escuelas secundarias italianas, se encontró que las mujeres tuvieron mayores puntuaciones en la dimensión de 'agotamiento emocional' y 'baja realización personal' que los hombres (9).

Los resultados que se presentan en el cuadro 4 evidencian que los profesores de educación física de Ibagué de 40 años o menos registraron las cifras más elevadas en las dimensiones de 'desgaste psíquico' e 'indolencia', resultados similares a los datos empíricos que indican que los profesores jóvenes se ven más afectados por el agotamiento emocional y físico y las actitudes negativas hacia los demás (32-34).

En el cuadro 5, se puede apreciar que la edad solo tuvo una correlación negativa débil con la dimensión de 'desgaste psíquico'. Por el contrario, en un estudio de docentes venezolanos de educación física no se encontraron relaciones entre el grado del síndrome, sus dimensiones y la edad (10), y en uno de 217 profesores brasileros en el que se determinaron los niveles del síndrome y su asociación con variables demográficas (entre ellas, el sexo y la edad) y ocupacionales, no se encontró una asociación significativa ($p > 0,05$) entre las dimensiones del síndrome y las variables demográficas (35).

En el presente estudio se logró determinar que la mayoría de los profesores de educación física participantes tenían sobrepeso y obesidad, con lo cual el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, diabetes,

trastornos del aparato locomotor y algunos cánceres, se incrementa. Asimismo, presentaron grados bajos del síndrome, aunque hubo un número importante de aquellos con el perfil 1 que presentó grados altos del síndrome, en tanto que los de perfil 2 presentaron desgaste psíquico, indolencia y sentimientos de culpa. Solo en la dimensión de 'desgaste psíquico' se encontró una asociación significativa con factores como la edad.

En este sentido, deben implementarse intervenciones individuales y en el lugar de trabajo (cognitivas, conductuales, de relajación e integrales) para prevenir este síndrome (36,37). A partir de los resultados del estudio, puede inferirse que la mayoría de los profesores del área de educación física de Ibagué presentaban bajos grados del síndrome, aunque no deben descuidarse las estrategias para prevenirlo.

Referencias

1. Freudenberger H. The psychologist in a free clinic setting: An alternative model in healthcare. *Psychotherapy: Theory, Research, and Practice*. 1973;10: 52-61.
2. Heus P, Diekstra R. Do teachers burn out more easily? A comparison of teachers with other social professions on work stress and burnout symptom. En: Vandenberghe R, Huberman AM, editors. *Understanding and preventing teacher burnout: A sourcebook of international research and practice*. New York: Cambridge University Press. p. 269-84. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511527784.019>
3. Calvete E, Villa A. Estrés y burnout docente: influencia de variables cognitivas. *Revista de Educación*. 1999;319:291-303.
4. Capel SA. The incidence of and influences on stress and burnout in secondary school teachers. *Br J Educ Psychol*. 1987;57:279-88. <https://doi.org/10.1111/j.2044-8279.1987.tb00857.x>
5. Arias W, Jiménez N. Síndrome de *burnout* en docentes de educación básica regular de Arequipa. *Educación*. 2013;21:53-76.
6. Kroupis I, Kourtessis T, Kouli O, Tzetzis G, Derri V, Mavrommatis G. Job satisfaction and burnout among Greek P.E. teachers. A comparison of educational sectors, level and gender. *Cultura, Ciencia y Deporte*. 2017;12:5-10. <https://doi.org/10.12800/ccd.v12i34.827>
7. Cunha E, Da Rosa M, Bicca J, Oliveira G. Síndrome de *burnout*: um estudo com professores de Educação Física. *Movimento*. 2014;20:519-39. <https://doi.org/10.22456/1982-8918.43226>
8. Bartholomew K, Ntoumanis N, Cuevas R, Lonsdale C. Job pressure and ill-health in physical education teachers: The mediating role of psychological need thwarting. *Teaching and Teacher Education*. 2014;37:101-7. <https://doi.org/10.1016/j.tate.2013.10.006>
9. Carraro A, Scarpa S, Gobbi E, Bertollo M, Robazza C. Burnout and self-perceptions of physical fitness in a sample of Italian physical education teachers. *Percept Mot Skills*. 2010;111:790-8. <https://doi.org/10.2466/06.07.11.14.PMS.111.6.790-798>
10. Vilorio H, Paredes M, Paredes L. *Burnout* en profesores de educación física. *Revista de Psicología del Deporte*. 2003;12:133-46.
11. Ranchal A, Vaquero M. *Burnout*, variables fisiológicas y antropométricas: un estudio en el profesorado. *Med Segur Trab*. 2008;54:47-55.
12. Sánchez-Oliva D, Sánchez-Miguel P, Pulido J, López J, Cuevas R. Motivación y *burnout* en profesores de educación física: incidencia de la frustración de las necesidades psicológicas básicas. *Cuadernos de Psicología del Deporte*. 2014;14:75-82.
13. Fernández B. Un análisis multidimensional del síndrome de burnout en profesorado de conservatorios y enseñanza secundaria (tesis). Valencia: Universidad de Valencia; 2011.
14. Hernández R, Fernández C, Baptista M. Metodología de la investigación. Sexta edición. México, D.F.: McGraw Hill Education; 2014. p. 601.
15. Secretaría de Educación Municipal. Docentes de Educación Física por institución educativa. Ibagué: Grupo de Cobertura Educativa; 2015.
16. Sociedad Internacional para el Avance de la Cineantropometría. Normas internacionales para la valoración antropométrica. Peso y estatura. Potchefstroom: Librería Nacional de Austria; 2005. p. 77.

17. Gil-Monte P, Rojas S, Sandoval J. Validez factorial del "Cuestionario para la evaluación del Síndrome de Quemarse por el Trabajo" (CESQT) en una muestra de maestros mexicanos. *Salud Mental*. 2009;32:205-14. <https://doi.org/10.1037/t21442-000>
18. Figueiredo H, Gil-Monte P, Grau-Alberola E. Prevalencia del síndrome de quemarse por el trabajo (SQT) en una muestra de maestros portugueses. *Aletheia*. 2009;29:6-15.
19. Gil-Monte P. Manual del Cuestionario para la Evaluación del Síndrome de Quemarse por el Trabajo. Madrid: TEA Ediciones, S.A.; 2011.
20. Gil-Monte P, Carlotto M, Gonçalves S. Prevalence of burnout in a sample of Brazilian teachers. *Eur J Psychiat*. 2011;25:205-12. <https://doi.org/10.4321/S0213-61632011000400003>
21. Heyward V. Evaluación de la aptitud física y prescripción del ejercicio. Quinta edición. Madrid: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2008. p. 426.
22. Galera A. Manual de didáctica de la Educación Física I. Una perspectiva constructivista integradora. Barcelona: Paidós; 2001.
23. Rodríguez L, Díaz F, Rodríguez E. Sobrepeso y obesidad en profesores. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2006;67:224-9. <https://doi.org/10.15381/anales.v67i3.1303>
24. Díaz U, Gómez J, Quintana R, Hernández A, González A. Factores asociados a la presencia de burnout en educadores físicos veracruzanos. *Rev Digital EFDeportes*. 2015;20. Fecha de consulta: 1 de abril de 2016. Disponible en: <https://www.efdeportes.com/efd211/presencia-de-burnout-en-educadores-fisicos.htm>
25. Tiera V, Ulbricht L, Ripka W. A prevalência da síndrome de *burnout* nos profissionais de Educação Física. *Lecturas: Educación Física y Deportes*. 2011;16:1-11.
26. Sánchez-Oliva D, Sánchez-Miguel P, Pulido J, López J, Cuevas R. Motivación y *burnout* en profesores de educación física: incidencia de la frustración de las necesidades psicológicas básicas. *Cuadernos de Psicología del Deporte*. 2014;14:75-82.
27. Díaz F, López A, Varela M. Factores asociados al síndrome de *burnout* en docentes de colegios de la ciudad de Cali, Colombia. *Univ Psychol*. 2012;11:217-27.
28. Carlotto M. Síndrome de *burnout* e gênero em docentes de instituições particulares de ensino. *Revista Psicologia da Universidade do Contestado*. 2003;1:15-23.
29. Mallar S, Capitão C. *Burnout* e hardiness: Um estudo de evidência de validade. *Psico-USF*. 2004;9:19-29. <https://doi.org/10.1590/S1413-82712004000100004>
30. Gomes R, Silva M, Mourisco S, Silva S, Mota A, Montenegro N. Problemas e desafios no exercício da actividade docente: um estudo sobre o estresse, *burnout*, saúde física e satisfação profissional em professores do 3º ciclo e ensino secundário. *Revista Portuguesa de Educação*. 2006;19:67-93.
31. Vercambre M, Brosselin P, Gilbert F, Nerrière E, Kovess-Masféty V. Individual and contextual covariates of *burnout*: A cross-sectional nationwide study of French teachers. *BMC Public Health*. 2009;9:333. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-9-333>
32. Crane S, Iwanicki E. Perceived role conflict. Role ambiguity and *burnout* among special education teachers. *Remedial and Special Education*. 1986;7:24-31. <https://doi.org/10.1177/074193258600700206>
33. Schwab R, Iwanicki E. Who are our burned out teachers? *Educational Research Quarterly*. 1982;7:5-16.
34. Lau P, Yuen M, Chan R. Do demographic characteristics make a difference to burnout among Hong Kong secondary school teachers? *Social Indicators Research*. 2005;71:491-516. <https://doi.org/10.1007/s11205-004-8033-z>
35. Carlotto M, Palazzo M. Síndrome de *burnout* e factores associados: um estudo epidemiológico com professores. *Cad Saúde Pública*. 2006;22:1017-26. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2006000500014>
36. Gil-Monte P. El síndrome de quemarse por el trabajo (*burnout*). Una enfermedad laboral en la sociedad del bienestar. Madrid: Pirámide; 2005.
37. Gil-Monte P, Salanova M, Aragón J, Schaufeli W. El síndrome de quemarse por el trabajo en servicios sociales. Valencia: Diputación de Valencia; 2006. p. 70.

Artículo original

La leptina promueve la expresión de Hic-5 y la formación de puntos de actina por la vía dependiente de FAK-Src en células epiteliales mamarias MCF10A.

Raúl Isaías-Tizapa, Erika Acosta, Arvey Tacuba-Saavedra, Miguel Mendoza-Catalán, Napoleón Navarro-Tito

Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo de los Bravo, México

Introducción. La leptina es una hormona secretada por los adipocitos que se ha relacionado con el proceso de la transición de epitelio a mesénquima (*Epithelial-Mesenchymal Transition*, EMT). Promueve la migración e invasión de las células del epitelio mamario mediante la activación de las cinasas FAK y Src, un complejo regulador de vías de señalización que favorecen la expresión de las proteínas relacionadas con la formación de estructuras proteolíticas implicadas en la invasión y progresión del cáncer. Recientemente, se ha descrito que la sobreexpresión y activación de la proteína Hic-5 durante el mencionado proceso de transición, favorece la formación de los puntos de actina (indicativa de la formación y funcionalidad de los invadopodios), lo cual promueve la degradación local de los componentes de la matriz extracelular y la metástasis del cáncer.

Objetivos. Evaluar el papel de las cinasas FAK y Src sobre la expresión y localización subcelular de Hic-5 y la formación de puntos de actina inducida por la leptina en la línea celular MCF10A de epitelio mamario no tumoral.

Materiales y métodos. Se utilizaron los inhibidores específicos de la FAK (PF-573228) y la Src (PP2) para evaluar el papel de ambas cinasas en los niveles de expresión y localización subcelular de la proteína Hic-5 mediante *Western blot* e inmunofluorescencia, así como la formación de puntos de actina mediante la tinción con faloidina-TRITC en células MCF10A estimuladas con leptina.

Resultados. La leptina indujo el incremento en la expresión de Hic-5 y la formación de puntos de actina. El tratamiento previo con los inhibidores de las cinasas FAK (PF-573228) y Src (PP2), promovió la disminución en la expresión de Hic-5 y de los puntos de actina en la línea celular MCF10A de epitelio mamario no tumoral.

Conclusión. La leptina indujo la expresión y la localización perinuclear de Hic-5 y la formación de puntos de actina mediante un mecanismo dependiente de la actividad de las cinasas FAK y Src en las células MCF10A.

Palabras clave: leptina; neoplasias; metástasis de la neoplasia; actinas; transición de epitelio a mesénquima.

Leptin induced Hic-5 expression and actin puncta formation by the FAK/Src-dependent pathway in MCF10A mammary epithelial cells.

Introduction: Leptin is a hormone secreted by adipocytes that has been associated with the epithelial-mesenchymal transition (EMT). Additionally, leptin promotes the migration and invasion of mammary epithelial cells through the activation of FAK and Src kinases, which are part of a regulatory complex of signaling pathways that promotes the expression of proteins related to the formation of proteolytic structures involved in the invasion and progression of cancer. Recently, overexpression and activation of Hic-5 during the EMT have been shown to induce the formation of actin puncta; these structures are indicative of the formation and functionality of invadopodia, which promote the local degradation of extracellular matrix components and cancer metastasis.

Objective: To evaluate the role of FAK and Src kinases in the expression of Hic-5 during the epithelial-mesenchymal transition induced by leptin in MCF10A cells.

Materials and methods: We used specific inhibitors of FAK (PF-573228) and Src (PP2) to evaluate Hic-5 expression and subcellular localization by Western blot and immunofluorescence assays and to investigate the formation of actin puncta by epifluorescence in MCF10A cells stimulated with leptin.

Results: Leptin induced an increase in Hic-5 expression and the formation of actin puncta. Pretreatment with inhibitors of FAK (PF-573228) and Src (PP2) promoted a decrease in Hic-5 expression and actin puncta formation in the non-tumorigenic mammary epithelial cell line MCF10A.

Recibido: 13/02/18
Aceptado: 29/01/19
Publicado: 30/01/19

Citación:

Isaías-Tizapa R, Acosta E, Tacuba-Saavedra A, Mendoza-Catalán M, Navarro-Tito N. La leptina promueve la expresión de Hic-5 y la formación de puntos de actina por la vía dependiente de FAK-Src en células epiteliales mamarias MCF10A. *Biomédica*. 2019;39:547-60.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.4313>

Correspondencia:

Napoleón Navarro-Tito, Laboratorio de Biología Celular del Cáncer, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Avenida Lázaro Cárdenas s/n, Chilpancingo, Guerrero, 39090, México
Teléfono: (747) 472 5503; fax: (747) 472 5503
nnavarro@uagro.mx

Contribución de los autores:

Raúl Isaías-Tizapa, Erika Acosta y Arvey Tacuba-Saavedra: experimentos, análisis de resultados y escritura del manuscrito
Miguel Mendoza-Catalán: análisis e interpretación de resultados y escritura del manuscrito
Napoleón Navarro-Tito: concepción del estudio y escritura del manuscrito

Financiación:

El presente trabajo fue financiado por el proyecto SEP/Conacyt, clave CB-2014-01-239870.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran que durante este trabajo no tuvieron conflicto de intereses alguno.

Conclusion: In MCF10A cells, leptin-induced Hic-5 expression and perinuclear localization, as well as the formation of actin puncta through a mechanism dependent on the kinase activity of FAK and Src.

Keywords: Leptin; neoplasms; neoplasm metastasis; actins; epithelial-mesenchymal transition.

La leptina es una hormona codificada por el gen *LEP* en humanos y es secretada en la placenta y los ovarios. Su función primordial en el tejido adiposo es regular la saciedad y el gasto energético, actuando directamente en el hipotálamo (1,2). Los niveles séricos de leptina en personas con peso normal (índice de masa corporal, IMC, de 18,5 a 24,9 kg/m²) se encuentran en un rango entre 5 y 50 ng/ml, en tanto que, en personas obesas, los niveles superan los 100 ng/ml (3).

La leptina está implicada en la regulación de procesos fisiológicos y, recientemente, se la ha asociado con la progresión tumoral del cáncer de mama, la cual se caracteriza por la proliferación acelerada y descontrolada de las células del epitelio glandular mamario (4). Este tipo de cáncer es el más común entre las mujeres a nivel mundial. En Latinoamérica, la tasa de incidencia del cáncer de mama es de 100.000 casos anuales, aproximadamente, siendo la causa de muerte más importante por tumores malignos en las mujeres, incluso, más que el cáncer de cuello uterino, con una tasa de mortalidad del 18 % del total de las defunciones por tumores malignos y del 3 % del total de las muertes en mujeres (5,6).

Yuan, *et al.*, han reportado que la leptina indujo la proliferación y la migración de la línea celular MCF-7 de cáncer mamario y han sugerido que es una hormona capaz de inducir cambios en la proliferación, la supervivencia y el crecimiento, y que promueve la invasión y la metástasis de las células tumorales (7). Por otra parte, estos autores describieron cómo el tratamiento con leptina en líneas celulares de cáncer de mama indujo el proceso de transición de epitelio a mesénquima (*Epithelial-Mesenchymal Transition*, EMT), proceso biológico relacionado con la progresión tumoral, y con un fenotipo invasivo y metastásico (8).

La transición de epitelio a mesénquima ocurre cuando las células epiteliales pierden su polaridad apical-basolateral, presentan una disminución en las uniones adherentes entre las células y entre estas y la matriz extracelular (transición de epitelio a mesénquima), adquiriendo características mesenquimatosas, entre estas, una morfología similar a los fibroblastos, resistencia a la apoptosis y mayor capacidad migratoria e invasiva (9,10).

A nivel molecular, se ha registrado disminución en la expresión de los marcadores epiteliales, como las proteínas cadherina-E, citoqueratinas y ocludinas, así como aumento en la expresión de marcadores mesenquimatosos como cadherina-N, vimentina y fibronectina.

Inicialmente, la transición de epitelio a mesénquima se asoció con procesos no patológicos, como la embriogénesis y la regeneración de tejidos; sin embargo, también puede ocurrir en eventos patológicos como la progresión tumoral (11,12). Se han descrito diversos inductores de dicha transición, entre ellos, el factor transformador de crecimiento β (*Transforming Growth Factor*, TGF- β), el factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*, EGF) y factores de transcripción como el Snail, el Slug y el Twist; recientemente, la leptina también se ha asociado como inductora de este programa (13).

Se ha establecido que la leptina ejerce su acción biológica mediante la unión a su receptor ObR, al promover la activación de diversas vías de

señalización, como la vía PI-3K/Akt, que se asocia con el crecimiento y la supervivencia celular; la vía JAK/STAT3, que participa en la transcripción del gen del factor de crecimiento del endotelio vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) favorecedor de la angiogénesis; la vía MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), que promueve la proliferación celular mediante la inactivación del inhibidor del ciclo celular pRb, y la vía PI-3K/Rac, la cual está implicada en la migración e invasión celular y, en consecuencia, en la progresión del cáncer (14,15).

Uno de los eventos asociados con la invasión celular es la formación de 'invadopodios', pequeñas protuberancias ricas en actina F organizadas en forma de puntos, las cuales se localizan en el frente invasivo de las células tumorales que degradan los componentes de la matriz extracelular de manera local. La formación de invadopodios se caracteriza por el reclutamiento y la activación de múltiples proteínas que regulan la polimerización de la actina, como la N-WASP, la Arp 2/3 y la cortactina, proteínas de señalización como la FAK y la Src, y proteínas adaptadoras, como la Hic-5, que tiene un peso molecular de 55 kDa y es codificada por el gen *TGFB11*.

En los estudios recientes se ha evidenciado la sobreexpresión y la activación de la Hic-5 durante la formación de los puntos de actina como parte de la formación de los invadopodios (10,16,17). La Hic-5 está constituida por un dominio N-terminal que contiene cuatro regiones ricas en leucina y aspartato (LD 1-4), y el dominio C-terminal, con cuatro regiones ricas en cisteína (LIM 1-4) (18,19). Los dominios LD y LIM regulan la interacción entre proteínas con diversas moléculas de señalización, como la FAK, promoviendo la formación de las adhesiones focales (20).

La FAK es una cinasa de tirosina con un peso molecular de 125 kDa que se activa mediante interacciones con las integrinas, los receptores de cinasa de tirosina, los receptores de citocinas y los receptores acoplados a proteínas G (21). La activación de la FAK se inicia con la autofosforilación en la tirosina 397, creando un sitio de unión para el dominio SH2 de la cinasa Src al promover su autofosforilación en la tirosina 419 y, en consecuencia, su activación.

La interacción entre la FAK y la Src permite que esta última fosforile las tirosinas 576 y 577 localizadas en el dominio cinasa de la FAK y promueva su máxima actividad catalítica. El complejo de cinasas FAK-Src regula importantes procesos celulares, como la adhesión, la motilidad, la proliferación y la supervivencia celular (22-24).

Recientemente, se ha reportado en modelos *in vitro* que la sobreexpresión, la localización subcelular y la activación de la proteína Hic-5 dependen de la actividad de las cinasas FAK y Src. Este evento es necesario para la formación y la funcionalidad de los invadopodios, los cuales están asociados con procesos invasivos durante la transición de epitelio a mesénquima inducida por el TGF- β en las células MCF10A (17,25).

En un estudio anterior, se reportó que la leptina inducía la activación de las cinasas FAK y Src en células MFC10A y en células cancerosas mamarias (Juárez-Cruz JC, García-Rodríguez E, Castañeda-Saucedo E, Mendoza-Catalán MA, Villegas S, *et al.* Leptin induces cell migration, gelatinases secretion and invasion in a FAK-Src dependent pathway in breast cancer cell. 2018. En prensa) (26). Sin embargo, no se ha estudiado la asociación existente entre la actividad de las cinasas FAK y Src y la expresión y la localización subcelular de la Hic-5 y la participación de esta en la formación de puntos de

actina durante la transición de epitelio a mesénquima inducida por la leptina en células MCF10A del epitelio mamario no tumoral.

En este trabajo se evaluaron el efecto directo de la leptina y el papel de las cinasas FAK y Src sobre los niveles de expresión de la Hic-5 y la formación de estructuras de invasión local en células epiteliales mamarias MCF10A no tumorales.

Materiales y métodos

Anticuerpos y reactivos

La leptina recombinante humana, el EGF, la hidrocortisona, el medio DMEM/F12, el Fluoroshield/DAPI™, los inhibidores de FAK (PF-573228) y el inhibidor de Src (PP2), se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Los anticuerpos primarios anti-Hic-5, anti-actina β y los anticuerpos secundarios antirrátón y anticonejo, se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). El anticuerpo secundario Alexa Flour 488™ se obtuvo de Molecular Probes by Life Technologies (Eugene, Oregon, USA), la faloidina-TRITC™, de Thermo Fisher (Waltham, MA), el anticuerpo anti-GAPDH™, de Cell Signaling Technology (Danvers, MA), la insulina, de Humulin, y el suero fetal bovino (SFB), de By Productos (Guadalajara, MX).

Cultivo celular

Las líneas celulares MCF10A y MDA-MB-231 se obtuvieron de la *American Type Culture Collection*, ATCC. La línea celular MCF10A derivada de epitelio mamario no tumoral, se cultivó en medio DMEM/F12 con suplemento de 10 % de SFB, 10 $\mu\text{g/ml}$ de insulina, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de hidrocortisona, 20 ng/ml de EGF y 1 % de antibióticos (penicilina G y estreptomina), en una atmósfera humidificada con 5 % de CO_2 a temperatura constante de 37 °C.

Para los fines experimentales, en los cultivos confluentes se suprimieron el SFB y los utilizados durante cuatro horas antes del tratamiento con leptina y con los suplementos químicos de la FAK y la Src. La línea celular MDA-MB-231 se sembró en cubreobjetos y se mantuvo con medio DMEM/F12 y suero fetal bovino al 5 % hasta el momento de la inmunofluorescencia.

Protocolo de estimulación

Para la técnica de inmunofluorescencia, los cultivos celulares se sembraron sobre cubreobjetos en placas de 24 pozos hasta adquirir el 60 % de confluencia y, para la técnica *Western blot*, los cultivos se mantuvieron en cajas de 60 mm hasta adquirir una confluencia del 80 al 90 %. En los cultivos celulares se suprimió el SFB con medio basal (DMEM/F12) durante cuatro horas y luego se trataron con los inhibidores selectivos de la FAK (PF-573228, 10 μM) y de la Src (PP2, 10 μM), ambos disueltos en DMSO, 30 minutos antes del estímulo durante 24 horas con leptina (400 ng/ml); la estimulación celular se concluyó con la remoción del medio. Los controles se trataron con el vehículo de leptina (Tris-HCl, pH 7,4).

Para los ensayos de formación de puntos de actina, se hizo la supresión en los cultivos confluentes y, luego, se estimularon y se cosecharon; posteriormente, las células se sembraron durante seis horas en cubreobjetos recubiertos con una matriz de gelatina bovina. Todos los experimentos se hicieron por triplicado y en momentos independientes.

Western blot

Para la extracción de las proteínas totales, las células se diluyeron en 0,5 ml de solución tampón RIPA, con 50 mM de HEPES (Sigma-Aldrich), pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1 mM de ácido egtáxico (EGTA, Sigma-Aldrich), 1 mM de ortovanadato de sodio, 100 mM de NaF, 10 mM de pirofosfato de sodio, 10 % de glicerol, 1 % de tritón X-100, 1 % de deoxicolato de sodio, 1,5 Mm de MgCl₂, 0,1 % de dodecilsulfato sódico (SDS), y 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF).

Se colocaron 20 µg de proteínas totales de cada condición y se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE) para, después, transferirlas a una membrana de nitrocelulosa.

La expresión de la proteína Hic-5 se determinó incubando la membrana con el anticuerpo primario anti-Hic-5 (dilución 1:500) y usando como controles de carga la actina β (dilución de 1:1000), incubada durante toda la noche a 4 °C, y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en dilución de 1:500, durante cuatro horas a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación, las membranas se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario anticonejo y antirratón durante dos horas a temperatura ambiente.

Por último, la inmunodetección se hizo con el kit Immun-Star WesternC™ (BIO-RAD) y placas autorradiográficas. La intensidad relativa se determinó mediante un análisis densitométrico de las bandas con el programa Image J, versión 1,44p.

Inmunofluorescencia

Los cubreobjetos se dejaron toda la noche en ácido sulfúrico al 20 %; después, se esterilizaron con etanol al 96 % por dos horas. Posteriormente, los cultivos de las células MCF10A se sembraron sobre los cubreobjetos durante 48 horas hasta alcanzar una confluencia del 60 % y, enseguida, se aplicó el protocolo de estimulación durante 24 horas con las diferentes condiciones experimentales.

Al finalizar el tratamiento de las células MCF10A y las células MDA-MB-231 de cáncer de mama sin tratar, estas se fijaron y permeabilizaron con formaldehído al 4 % y tritón X-100 al 0,5 % en PBS y se bloquearon con albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*, BSA) al 3 %. Se incubaron con el anticuerpo primario anti-Hic-5 en una dilución de 1:100 durante dos horas a temperatura ambiente y el anticuerpo secundario antirratón marcado con Alexa Fluor 488™ en una dilución de 1:400 durante 30 minutos a 37 °C, se montaron en los cubreobjetos en Fluoroshield™/DAPI y, por último, se observaron bajo el microscopio de epifluorescencia Olympus BX43™ con el objetivo de 100X.

Ensayo de formación de puntos de actina

Los cultivos confluentes fueron estimulados bajo las condiciones experimentales descritas en el protocolo de estimulación; al terminar, se cosecharon, se sembraron durante seis horas sobre una matriz de gelatina bovina no fluorescente. A las 6 horas, las células se fijaron y permeabilizaron con formaldehído al 4 % y tritón X-100 al 0,5 % en PBS, y se bloquearon con BSA al 3 %. Se incubaron con faloidina-TRITC 1:500 durante 30 minutos a 37 °C, se montaron en los cubreobjetos en Fluoroshield™/DAPI y, finalmente,

se observaron bajo el microscopio de epifluorescencia Olympus BX43™ utilizando el objetivo de 100X.

Análisis estadístico

Los datos se examinaron mediante la prueba t de Student y el análisis de varianza (ANOVA) de una vía con la prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls, y los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (DE), tomando como estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. Por último, los resultados de los ensayos se graficaron con el programa estadístico GraphPad Prism 5,0.

Resultados

La leptina promovió la expresión de la Hic-5 en la línea celular MCF10A.

Para determinar el efecto de la leptina en la expresión de la proteína Hic-5, se utilizó la prueba *Western blot* a partir de los extractos de proteínas de cultivos de células MCF10A estimuladas con 400 ng/ml de leptina durante 24 horas, y se utilizó como control el vehículo de leptina (Tris-HCl).

Los resultados demostraron que la leptina indujo un incremento de la expresión de la Hic-5 en la línea celular MCF10A de epitelio mamario no tumoral, comparada con el control (figura 1 A y B). La localización subcelular de la Hic-5 se evaluó mediante inmunofluorescencia, y se observó una mayor expresión y distribución perinuclear de la Hic-5 en los cultivos estimulados con leptina que en las células no estimuladas. Como control positivo de la expresión de la Hic-5, se emplearon cultivos de células MDA-MB-231 de cáncer mamario (figura 1C).

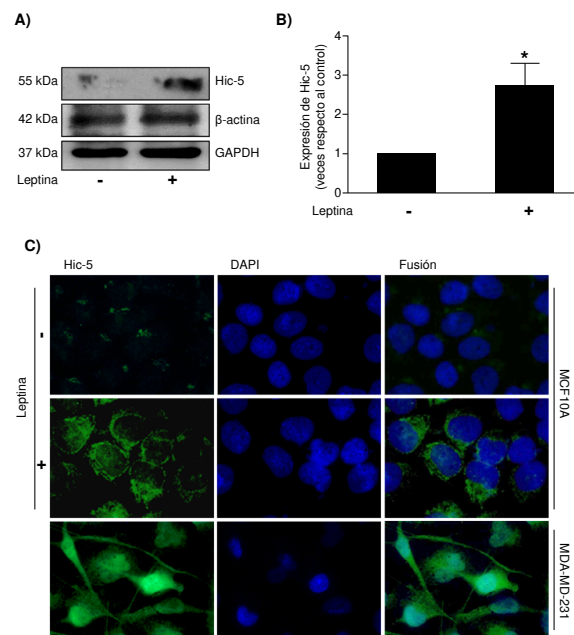


Figura 1. Expresión y localización subcelular de la proteína Hic-5 en cultivos de la línea celular MCF10A estimulados con 400 ng/ml de leptina durante 24 horas. **A)** *Western blot* de la expresión de la Hic-5, se utilizaron anticuerpos anti-actina β y GAPDH como controles de carga. **B)** Gráfica correspondiente al análisis densitométrico y estadístico mediante la prueba t de Student. **C)** Localización subcelular de la Hic-5 por inmunofluorescencia; la línea celular MDA-MB-231 se utilizó como control positivo de la expresión de la Hic-5. Las imágenes fueron procesadas empleando el programa Image J y son representativas de un experimento realizado por triplicado de manera independiente.

La leptina indujo la expresión de la Hic-5 mediante la actividad cinasa de la FAK en la línea celular MCF10A.

Para determinar si la leptina inducía la expresión de la proteína Hic-5 mediante la actividad cinasa de la FAK en la línea celular MCF10A, los cultivos celulares se sometieron a supresión con medio basal durante cuatro horas y se trataron con el inhibidor de la FAK (PF-573228) 30 minutos antes de estimularlos con 400 ng/ml de leptina durante 24 horas.

Se extrajeron las proteínas totales y se hicieron las pruebas *Western blot* utilizando un anticuerpo específico para la Hic-5. En este modelo experimental, los resultados mostraron una mayor expresión de la Hic-5 con leptina comparada con el control; sin embargo, al agregar el tratamiento previo con el inhibidor de FAK más leptina, la expresión de la Hic-5 disminuyó, comparada con la leptina sola (figura 2 A, B).

Además, en este estudio se observó una mayor expresión y localización perinuclear de la Hic-5 bajo el estímulo con leptina que con el control. Sin embargo, con el inhibidor de la FAK y el estímulo con leptina, la expresión de la Hic-5 disminuyó en comparación con el estímulo de la leptina únicamente (figura 2 C). Estos resultados reflejan que la expresión y la localización perinuclear de la Hic-5 ocurren mediante un mecanismo que depende de la actividad cinasa de la FAK.

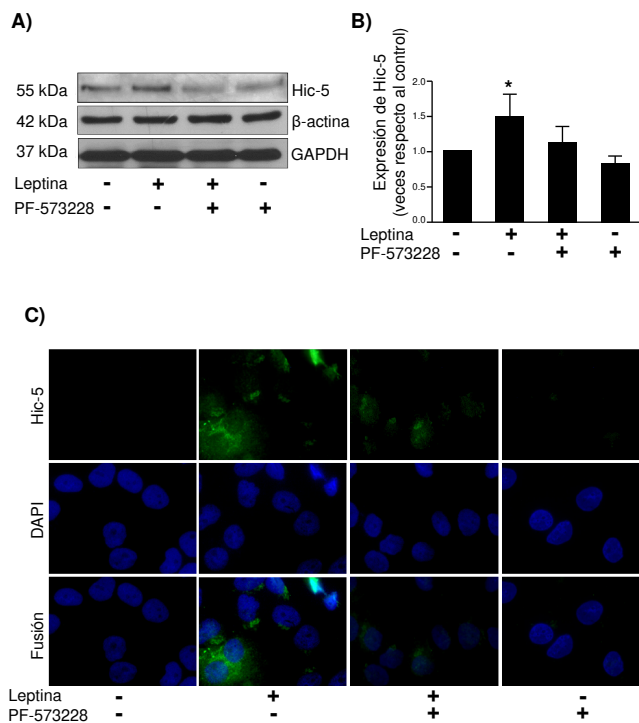


Figura 2. La leptina indujo la expresión y la localización subcelular de la proteína Hic-5 dependiente de la actividad de la cinasa FAK en la línea celular MCF10A. Los cultivos celulares se estimularon con 400 ng/ml de leptina durante 24 horas, y se empleó el inhibidor de la cinasa FAK (PF-573228). Condiciones experimentales: control, leptina, leptina + PF y PF-573228. **A)** *Western blot* de la expresión de la Hic-5, actina β y GAPDH como controles de carga. **B)** Gráfica correspondiente al análisis densitométrico y estadístico mediante ANOVA de una vía, empleando una prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls. Significación estadística: * $p < 0,05$. **C)** Localización subcelular de la Hic-5 por inmunofluorescencia. Las imágenes se procesaron empleando el programa Image J y son representativas de un experimento realizado por triplicado de manera independiente.

La leptina indujo la expresión de la Hic-5 mediante la actividad cinasa de la Src en la línea celular MCF10A.

En cuanto al papel de la cinasa Src en la expresión y localización celular de la Hic-5, se observó un incremento en la expresión de esta proteína al emplear leptina comparada con el control; sin embargo, al agregar el tratamiento previo con el inhibidor de la Src y el estímulo con leptina, la expresión de la Hic-5 disminuyó en comparación con el estímulo de leptina únicamente (figura 3A, B).

Tanto en la condición con el inhibidor de la FAK como con el de la Src, con y sin tratamiento con leptina, la expresión y la localización perinuclear de la Hic-5 disminuyeron comparadas con el estímulo con leptina (figura 3C), lo cual sugiere que Hic-5 se produce mediante un mecanismo que depende de la actividad de cinasa de Src y de FAK.

La leptina indujo la formación de puntos de actina de manera dependiente de la actividad cinasa de la FAK y la Src en la línea celular MCF10A.

Para determinar si la leptina promovía la formación de puntos de actina en la línea celular MCF10A, los cultivos celulares se estimularon con 400 ng/ml de leptina durante 24 horas, y posteriormente, se cosecharon y sembraron en

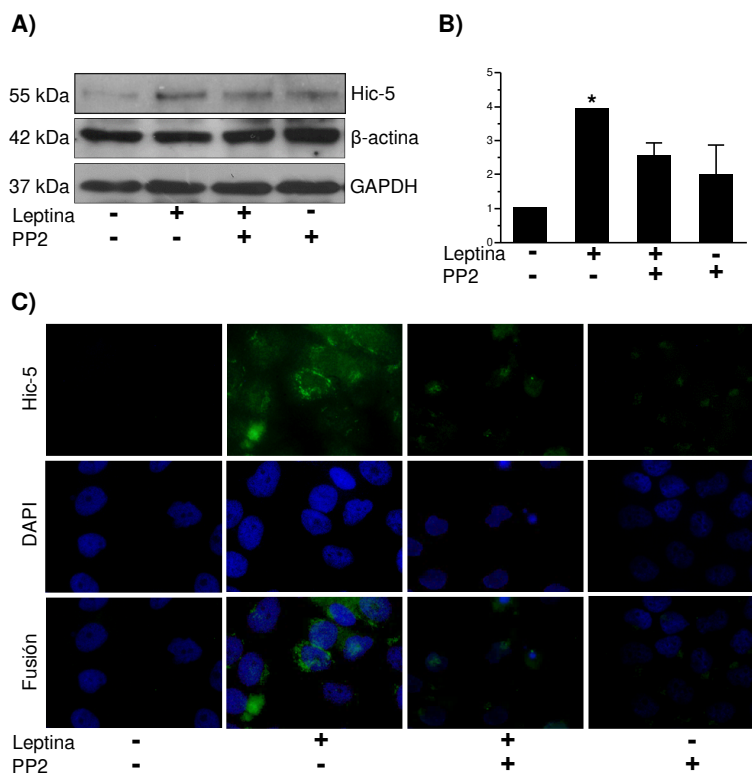


Figura 3. La leptina indujo la expresión y la localización subcelular de la proteína Hic-5 dependiente de la actividad de la cinasa Src en la línea celular MCF10A. Los cultivos celulares se estimularon con 400 ng/ml de leptina durante 24 horas, y se empleó el inhibidor de la cinasa Src (PP2). Condiciones experimentales: control, leptina, leptina+PP2 y PP2. **A)** Western blot de la expresión de Hic-5, actina β y GAPDH como controles de carga. **B)** Gráfica correspondiente al análisis densitométrico y estadístico mediante ANOVA de una vía, empleando una prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls. Significación estadística: *p<0,05. **C)** Localización subcelular de la Hic-5 por inmunofluorescencia. Las imágenes se procesaron empleando el programa Image J y son representativas de un experimento realizado de manera independiente.

una matriz de gelatina bovina no fluorescente durante seis horas, con lo que se observaron estructuras densas de F-actina en forma de puntos, sugestivas de la formación de invadopodios como reacción a la estimulación con leptina.

El efecto de la actividad de las cinasas FAK y Src se evaluó mediante cultivos tratados previamente con los inhibidores de la FAK (PF-573228) y la Src (PP2) y posteriormente estimulados con 400 ng/ml de leptina durante 24 horas.

Los datos obtenidos evidenciaron que la formación de puntos de actina como reacción a la leptina fue dependiente de la actividad de las cinasas FAK y Src (figura 4). Llamó la atención la formación de fibras de estrés en las células estimuladas con leptina, en comparación con las células estimuladas con el vehículo de leptina. Además, se observó la disminución de estas fibras en presencia de los inhibidores de las cinasas FAK y Src (figura 4).

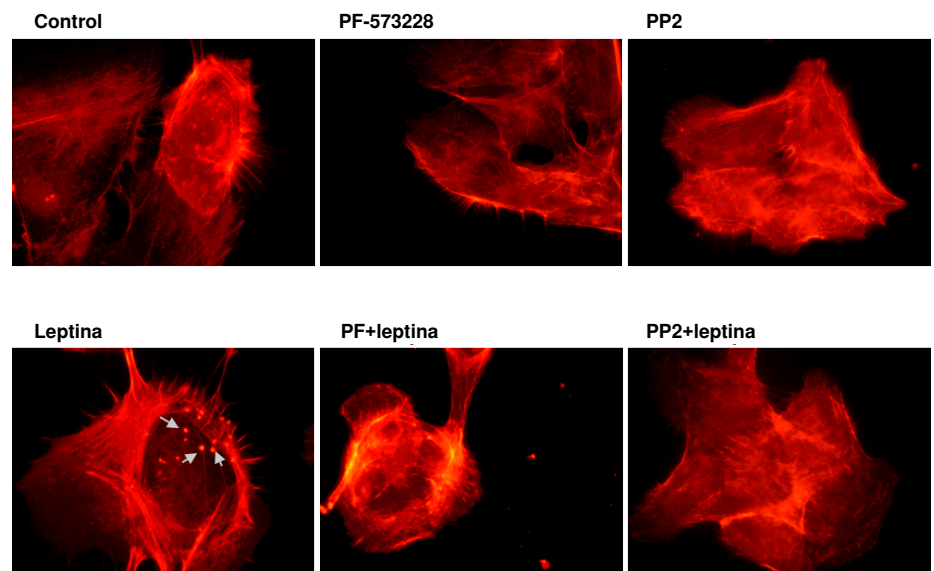


Figura 4. La leptina indujo la formación de puntos de actina dependiente de la actividad de las cinasas FAK y Src en la línea celular MCF10A. Los cultivos celulares se estimularon con 400 ng/ml de leptina durante 24 horas, y se emplearon los inhibidores de las cinasas FAK (PF-573228) y Src (PP2). Condiciones experimentales: control, leptina, PF-573228+leptina, PF-573228, PP2+leptina, PP2. Las células se sembraron sobre una matriz de gelatina bovina para el ensayo de fluorescencia de detección de la actina. Los acercamientos corresponden a los puntos de actina formados como reacción a la leptina. Las imágenes se procesaron empleando el programa Image J y son representativas de un experimento realizado por triplicado de manera independiente.

Discusión

En diversos estudios clínicos y epidemiológicos, se ha determinado que las altas concentraciones de leptina en el suero se relacionan con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama en mujeres antes y después de la menopausia (27).

Los datos publicados por Garofalo, *et al.*, demostraron que tanto la leptina como su receptor ObR se encuentran sobreexpresados en el 83 % de los tumores de cáncer mamario en estadio primario y metastásico, comparados con tejido no canceroso (28). En modelos *in vitro* se ha descrito que la leptina actúa como inductor del proceso de la transición de epitelio a mesénquima y la activación de las cinasas FAK y Src (Juárez-Cruz JC, García-Rodríguez E, Castañeda-Saucedo E, Mendoza-Catalán MA, Villegas S, *et al.* Leptin induces cell migration, gelatinases secretion and invasion in a FAK-Src

dependent pathway in breast cancer cell. 2018. En prensa) (26). Pignatelli, *et al.*, demostraron que la actividad de estas cinasas promueve la activación de la Hic-5, una proteína adaptadora que participa en las adhesiones focales y que en los últimos años se ha asociado con la progresión tumoral (17).

En el presente estudio se observó que la leptina promovió la expresión y la localización perinuclear de la Hic-5 en células MCF10A del epitelio mamario no tumoral (figura 1). En este sentido, en estudios de pacientes con cáncer de ovario e hígado, se ha establecido que la Hic-5 se encuentra sobreexpresada en el tejido canceroso en comparación con el tejido sano; además, en líneas celulares de cáncer de mama se ha reportado la sobreexpresión de esta proteína y se ha asociado con procesos que favorecen la progresión del cáncer (29-31).

Los datos publicados por Sheta, *et al.*, demostraron que la Hic-5 regulaba la transición de epitelio a mesénquima mediante un mecanismo independiente del TGF β 1 en células de cáncer de ovario (30). Asimismo, Pignatelli, *et al.*, demostraron que la invasión inducida por el TGF β en células MCF10A requiere de la activación de la Hic-5 mediante la cinasa Src, y reportaron que la Hic-5 activa participa en la formación de invadopodios, estructuras ricas en actina especializadas en la degradación de los componentes de dicha transición y que promueven la migración y la invasión celulares (17).

Se ha reportado que la activación de la FAK regula procesos celulares como la angiogénesis, la transición de epitelio a mesénquima y la metástasis de células cancerosas, al asociarse con la progresión a un fenotipo más agresivo en tumores mamarios (32). Además, un análisis con las pruebas de *Northern* y *Western blot* demostró que los niveles del ARNm y la proteína de la FAK se encontraban elevados en las muestras de los tumores de mama invasivos y metastásicos, en comparación con los tejidos normales, lo que sugiere la participación activa de la FAK en la invasión y metástasis en el cáncer de mama (33).

Por este motivo, en el presente estudio se decidió evaluar el papel de la FAK en los niveles de expresión de la Hic-5 en células tratadas con leptina. Los resultados obtenidos demostraron que la leptina promueve la expresión de la Hic-5 y que ello depende de la actividad cinasa de la FAK (figura 2A, B). Los resultados que relacionan la participación del complejo Src-FAK con la expresión de la Hic-5 explicarían la activación de la Src cuando se une a la tirosina 397 fosforilada de la FAK; una vez activa, la Src promueve la fosforilación de la tirosina 925 de la FAK, lo cual genera un sitio de interacción con la proteína adaptadora Grb2 y, subsecuentemente, la activación de la vía de señalización de la MAPK (34).

Por otro lado, se ha reportado que la asociación de la FAK con la Src causa la fosforilación en p130Cas y el reclutamiento de Crk (35). Este complejo permite, a su vez, la activación de la JNK, una proteína relacionada con la activación del factor de transcripción c-Jun que, según observaciones, promueve la expresión de la Hic-5 (31). En este contexto, se ha propuesto la FAK como un importante biomarcador para la carcinogénesis y la progresión del cáncer mamario (36). Asimismo, se ha descrito que la leptina induce la migración celular en dos líneas de cáncer de mama: la MDA-MB-231, con fenotipo invasivo, y la línea no invasiva MCF7 (Juárez-Cruz JC, García-Rodríguez E, Castañeda-Saucedo E, Mendoza-Catalán MA, Villegas S, *et al.* Leptin induces cell migration, gelatinases secretion and invasion in a FAK-Src dependent pathway in breast cancer cell. 2018. En prensa). También, se ha descrito que la leptina promueve la fosforilación y la activación de la FAK y la

ERK, proteínas relacionadas con la transición de epitelio a mesénquima en las células MCF10A. Estos datos sugieren que la expresión de la Hic-5 está relacionada con una vía dependiente de las cinasas Src-FAK y ERK en la línea celular MCF10A (26).

La Src regula múltiples procesos celulares relacionados con la progresión tumoral, como la angiogénesis, la adhesión, la motilidad, la invasión y la migración celular, lo cual sugiere que la Src tiene un papel importante en el desarrollo del tumor y la metástasis (37-39). Verbeek, *et al.*, encontraron que en las muestras de tejido de cáncer de mama había un aumento en la expresión y la actividad de la Src, comparadas con las del tejido mamario normal (40). Además, en los estudios de pacientes con cáncer de mama, se ha descrito que el aumento de la expresión y la actividad de la Src reducía considerablemente su tasa de supervivencia (41,42).

Por esta razón, en el presente estudio, se evaluó el efecto de la cinasa Src sobre los niveles de expresión de la Hic-5 en células tratadas con leptina. Resultó interesante observar que la expresión de Hic-5 aumentaba con el tratamiento con leptina, sin embargo, disminuyó tras la inhibición química de la Src (figura 3A y 3B).

Este evento puede ocurrir por la activación del receptor de la leptina durante el tratamiento, lo que favorece su fosforilación en los sitios de las tirosinas 985, 1077 y 1138 (43). La Src posee un dominio SH2 en su extremo N-terminal, el cual reconoce tirosinas fosforiladas y puede unirse a la caja 1 del receptor de leptina y, en consecuencia, promover su activación; cuando esto ocurre, se puede inducir la activación de la cinasa FAK fosforilando los residuos de las tirosinas 576 y 577 localizados en el dominio cinasa de esta proteína y ocasionando su máxima actividad catalítica (44). Cuando la Src no se activa se interrumpen todos los eventos moleculares regulados por dicha activación, en este caso particular, la expresión de la Hic-5 inducida por la leptina en las células MCF10A del epitelio mamario.

La función de las proteínas en las células se relaciona, en parte, con su localización subcelular. Para determinar la localización subcelular de la Hic-5, en el presente estudio se hicieron pruebas de inmunofluorescencia cuyos resultados evidenciaron una mayor expresión bajo el estímulo con leptina y una distribución perinuclear de esta proteína. En la figura 2C se observa una mayor expresión y localización perinuclear de la Hic-5 con leptina, en comparación con el control; sin embargo, con el inhibidor de la FAK y el estímulo con leptina, la expresión y la localización perinuclear de la Hic-5 disminuyeron en comparación con lo que sucede con el estímulo con leptina. Además, con el inhibidor de la Src más el estímulo con leptina, la expresión y la localización perinuclear de la Hic-5 disminuyeron en comparación lo que sucede con el estímulo con leptina (figura 3C).

Cabe resaltar que la localización perinuclear de la Hic-5 podría estar relacionada con un marcador de la transición de epitelio a mesénquima y la formación de invadopodios. Pignatelli, *et al.*, demostraron que el TGF- β promueve la formación de invadopodios y un aumento en la expresión de la Hic-5 (17). Curiosamente, la inhibición de la expresión de la Hic-5 disminuyó la degradación de la matriz extracelular, lo que sugiere que es responsable de la degradación de la transición de epitelio a mesénquima inducida por el TGF- β .

Por otro lado, se ha determinado que la FAK se encuentra activa en los invadopodios y que su sobreexpresión promueve la degradación de la matriz

extracelular. Asimismo, la actividad de la Src es necesaria para la formación de invadopodios. Estos datos sugieren que la leptina promueve la expresión y la localización perinuclear de la Hic-5 y que ello podría relacionarse con un evento crucial durante la transición de epitelio a mesénquima consistente en la invasión local o formación de invadopodios (17).

En experimentos *in vitro* se ha demostrado que la forma activa de la FAK y la Src promueve la polimerización y reorganización de la actina, generando diferentes estructuras, incluidos los lamelopodios, las fibras de estrés y los puntos de actina, necesarios para la movilidad e invasión local de las células. Asimismo, Yamaguchi, *et al.*, asociaron la formación de estos puntos de actina con etapas iniciales de la formación de los invadopodios en células tumorales, lo que promueve la degradación de la matriz extracelular (45-47).

En el presente estudio, se confirmó que la leptina promueve la formación de puntos de actina por una vía dependiente de la FAK y la Src en células MCF10A, un evento biológico que permite la formación y la maduración de los invadopodios y, en consecuencia, la metástasis del cáncer (figura 4).

Al observar que la expresión de la Hic-5 inducida por la leptina se da parcialmente mediante un mecanismo dependiente del complejo de las cinasas FAK y Src, se propone que dicha expresión ocurre, en parte, mediante ambas cinasas y que otros mecanismos de señalización están involucrados con esta expresión. Además, se sugiere que la expresión de la Hic-5 se relaciona con procesos invasivos, como la formación de invadopodios y la posterior degradación de la matriz extracelular.

Los datos obtenidos en este estudio podrían estar relacionados con un evento biológico *in vivo* en el que el microambiente tumoral, específicamente la abundancia de leptina y su receptor, participan activamente en eventos relacionados con la transición de epitelio a mesénquima y, en consecuencia, con la invasión y metástasis de células tumorales en pacientes que presentan tanto obesidad como cáncer de mama.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Guerrero y al SEP/Conacyt, por el apoyo en el financiamiento de esta investigación.

Referencias

1. Friedman J, Halaas J. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998;395:763-70. <https://doi.org/10.1038/27376>
2. Sánchez JC. Perfil fisiológico de la leptina. *Colombia Med*. 2005;36:50-9.
3. Grossmann M, Ray A, Nkhata K, Malakhov D, Regozina O, Dogan S, *et al.* Obesity and breast cancer: Status of leptin and adiponectin in pathological processes. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29:641-53. <https://doi.org/10.1007/s10555-010-9252-1>
4. González-Fernández J, Ugalde-Ovares CE. La glándula mamaria, embriología, histología, anatomía y una de sus principales patologías, el cáncer de mama. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*. 2012;602:317-20.
5. DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics. *CA Cancer J Clin*. 2014;64:252-71. <https://doi.org/10.3322/caac.21235>
6. Lozano-Ascencio R, Gómez-Dantés H, Lewis S, Torres-Sánchez L, López-Carrillo L. Tendencias del cáncer de mama en América Latina y El Caribe. *Salud Pública Mex*. 2009;51:147-56.
7. Yuan HJ, Sun KW, Yu K. Leptin promotes the proliferation and migration of human breast cancer through the extracellular-signal regulated kinase pathway. *Mol Med Rep*. 2014;9:350-4. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1786>

8. Yan D, Avtanski D, Saxena NK, Sharma D. Leptin-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells requires β -catenin activation via Akt/GSK3- and MTA1/Wnt1 protein-dependent pathways. *J Biol Chem*. 2012;287:8598-612. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.322800>
9. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119:1420-8. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
10. Maier HJ, Wirth T, Beug H. Epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Cancers*. 2010;2:2058-83. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers2042058>
11. Foroni C, Broggin M, Generali D, Damia G. Epithelial–mesenchymal transition and breast cancer: Role, molecular mechanisms and clinical impact. *Cancer Treat Rev*. 2012;38:689-97. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.001>
12. Nantajit D, Lin D, Li JJ. The network of epithelial-mesenchymal transition: Potential new targets for tumor resistance. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014;141:1697-713. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1840-y>
13. Avtanski DB, Nagalingam A, Bonner MY, Arbiser JL, Saxena NK, Sharma D. Honokiol activates LKB1-miR-34a axis and antagonizes the oncogenic actions of leptin in breast cancer. *Oncotarget*. 2015;6:29947-62. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4937>
14. Garofalo C, Surmacz E. Leptin and cancer. *J Cell Physiol*. 2006;207:12-22. <https://doi.org/10.1002/jcp.20472>
15. Wang L, Tang C, Cao H, Li K, Pang X, Zhong L, *et al*. Activation of IL-8 via PI3K/Akt-dependent pathway is involved in leptin-mediated epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer cells. *Cancer Biol Ther*. 2015;16:1220-30. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1056409>
16. Beaty B, Condeelis J. Digging a little deeper: The stages of invadopodium formation and maturation. *Eur J Cell Biol*. 2014;93:438-44. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2014.07.003>
17. Pignatelli J, Tumbarello DA, Schmidt RP, Turner CE. Hic-5 promotes invadopodia formation and invasion during TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*. 2012;197:421-37. <https://doi.org/10.1083/jcb.201108143>
18. Shibanuma M, Mochizuki E, Maniwa R, Mashimo J, Nishiya N, Imai S, *et al*. Induction of senescence-like phenotypes by forced expression of hic-5, which encodes a novel LIM motif protein, in immortalized human fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 1997;17:1224-35. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.3.1224>
19. Thomas SM, Hagel M, Turner CE. Characterization of a focal adhesion protein, Hic-5, that shares extensive homology with paxillin. *J Cell Sci*. 1999;112:181-90.
20. Varney SD, Betts CB, Zheng R, Wu L, Hinz B, Zhou J, *et al*. Hic-5 is required for myofibroblast differentiation by regulating mechanically dependent MRTF-A nuclear accumulation. *J Cell Sci*. 2016;129:774-87. <https://doi.org/10.1242/jcs.170589>
21. Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: In command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6:56-68. <https://doi.org/10.1038/nrm1549>
22. Alexander NR, Branch KM, Parekh A, Clark ES, Iwueke CI, Guelcher SA, *et al*. Extracellular matrix rigidity promotes invadopodia activity. *Curr Biol*. 2008;18:1295-9. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.090>
23. Calalb MB, Polte TR, Hanks SK. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: A role for Src family kinases. *Mol Cell Biol*. 1995;15:954-63.
24. Parekh A, Weaver AM. Regulation of cancer invasiveness by the physical extracellular matrix environment. *Cell Adh Migr*. 2009;3:288-92. <https://doi.org/10.4161/cam.3.3.8888>
25. Destaing O, Block MR, Planus E, Albiges-Rizo C. Invadosome regulation by adhesion signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2011;23:597-606. <https://doi.org/10.1016/j.cob.2011.04.002>
26. Villanueva-Duque A, Zúñiga-Eulogio MD, Dena-Beltrán J, Castañeda-Saucedo E, Calixto-Gálvez M, Mendoza-Catalán M, *et al*. Leptin induces partial epithelial-mesenchymal transition in a FAK-ERK dependent pathway in MCF10A mammary non-tumorigenic cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017;10:10334-42.
27. Wu MH, Chou YC, Chou WY, Hsu GC, Chu CH, Yu CP, *et al*. Circulating levels of leptin, adiposity and breast cancer risk. *Br J Cancer*. 2009;100:578-82. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604913>
28. Garofalo C, Koda M, Cascio S, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Golaszewska J, *et al*. Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer

- progression: Possible role of obesity-related stimuli. *Clin Cancer Res.* 2006;12:1447-53. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1913>
29. Deakin NO, Turner CE. Distinct roles for paxillin and Hic-5 in regulating breast cancer cell morphology, invasion, and metastasis. *Mol Biol Cell.* 2010;22:327-41. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-09-0790>
 30. Sheta R, Wang ZQ, Bachvarova M, Plante M, Gregoire J, Renaud MC, *et al.* Hic-5 regulates epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer cells in a TGF β 1-independent manner. *Oncotarget.* 2017;8:82506-30. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19714>
 31. Wu JR, Hu CT, You RI, Pan SM, Cheng CC, Lee MC, *et al.* Hydrogen peroxide inducible clone-5 mediates reactive oxygen species signaling for hepatocellular carcinoma progression. *Oncotarget.* 2015;6:32526-44. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5322>
 32. Frame MC, Patel H, Serrels B, Lietha D, Eck MJ. The FERM domain: Organizing the structure and function of FAK. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:802-14. <https://doi.org/10.1038/nrm2996>
 33. Owens LV, Xu L, Craven RJ, Dent GA, Weiner TM, Kornberg L, *et al.* Overexpression of the focal adhesion kinase (p125 FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res.* 1995;55:2752-6.
 34. Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P. Integrin-mediated signal transduction linked to RAS pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature.* 1994;372:786-91. <https://doi.org/10.1038/372786a0>
 35. Nishiya N, Tachibana K, Shibnuma M, Mashimo JI, Nose K. Hic-5-reduced cell spreading on fibronectin: Competitive effects between paxillin and hic-5 through interaction with focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol.* 2001;21:5332-45. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.16.5332-5345.2001>
 36. Lighthfoot HM, Lark A, Livasy CA, Moore DT, Cowan D, Dressler L, *et al.* Upregulation of focal adhesion kinase (FAK) expression in ductal carcinoma in situ (DCIS) is an early event in breast tumorigenesis. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;88:109-16. <https://doi.org/10.1007/s10549-004-1022-8>
 37. Chambers AF, Groom AC, Macdonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:563-72. <https://doi.org/10.1038/nrc865>
 38. Frame MC, Fincham VJ, Carragher NO, Wyke JA. v-Src's hold over actin and cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:233-45. <https://doi.org/10.1038/nrm779>
 39. Yeatman TJ. A renaissance for Src. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:470-80. <https://doi.org/10.1038/nrc1366>
 40. Verbeek BS, Vroom TM, Adriaansen-Slot SS, Ottenhoff-Kalf AE, Geertzema JG, Hennipman A, *et al.* c-Src protein expression is increased in human breast cancer. An immunohistochemical and biochemical analysis. *J Pathol.* 1996;180:383-8. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199612\)180:4<383::AID-PATH686>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199612)180:4<383::AID-PATH686>3.0.CO;2-N)
 41. Elsberger B, Fullerton R, Zino S, Jordan F, Mitchell TJ, Brunton VG, *et al.* Breast cancer patients' clinical outcome measures are associated with Src kinase family member expression. *Br J Cancer.* 2010;103:899-909. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605829>
 42. Kanomata N, Kurebayashi J, Kozuka Y, Sonoo H, Moriya T. Clinicopathological significance of Y416Src and Y527Src expression in breast cancer. *J Clin Pathol.* 2011;64:578-58. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2011-200042>
 43. Jiang L, Li Z, Rui L. Leptin stimulates both jak2-dependent and jak2-independent signaling pathways. *J Biol Chem.* 2008;283:28066-73. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805545200>
 44. Hanks SK, Ryzhova L, Shin NY, Brábek J. Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Front Biosci.* 2003;8:982-96.
 45. Serrels B, Serrels A, Brunton VG, Holt M, Mclean GW, Gray CH, *et al.* Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex. *Nat Cell Biol.* 2007;9:1046-56. <https://doi.org/10.1038/ncb1626>
 46. Tehrani S, Tomasevic N, Weed S, Sakowicz R, Cooper JA. Src phosphorylation of cortactin enhances actin assembly. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:11933-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701077104>
 47. Yamaguchi H, Lorenz M, Kempiak S, Sarmiento C, Coniglio S, Symons M, *et al.* Molecular mechanisms of invadopodium formation: The role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *J Cell Biol.* 2005;168:441-52. <https://doi.org/10.1083/jcb.200407076>

Artículo original

Incidencia de los problemas relacionados con los medicamentos antirretrovirales para el tratamiento de la infección por HIV en pacientes hospitalizados en el Hospital Santa Clara de Bogotá

Carlos Andrés Badillo¹, Lizeth Katherine Barrera¹, Gerson Arias², Gabriel Fernando Tribiño^{1,3}, Óscar Andrés Gamboa³, Julio César García^{1,3}, Ana María Granada⁴

¹ Grupo de Investigación en Evidencia Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Chía, Colombia

² Servicio de Infectología y Vigilancia Epidemiológica, Fundación Abood Shaio, Bogotá, D.C., Colombia

³ Posgrado de Farmacología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Chía, Colombia

⁴ Grupo de VIH-TB, Hospital Santa Clara, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El tratamiento antirretroviral de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) se ha relacionado con diversos problemas de los medicamentos que causan o pueden causar la aparición de resultados negativos. En este contexto, es importante determinar su incidencia, caracterizarlos y clasificarlos para diseñar estrategias que minimicen su impacto.

Objetivo. Estimar la incidencia global y de cada uno de los problemas relacionados con los medicamentos antirretrovirales utilizados en el tratamiento del HIV en una cohorte de pacientes hospitalizados en una institución de tercer nivel de Bogotá.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio descriptivo y retrospectivo de cohorte en pacientes de 18 años o más de edad con diagnóstico de infección por el HIV y en tratamiento antirretroviral, hospitalizados entre el 1° enero de 2015 y el 31 de diciembre de 2016 en el Hospital Santa Clara de Bogotá.

Resultados. La incidencia global de los problemas relacionados con los medicamentos antirretrovirales fue de 0,90 (IC_{95%} 0,85-0,93). La incidencia de las interacciones medicamentosas fue de 0,85 (IC_{95%} 0,80-0,90), la de las reacciones adversas de 0,28 (IC_{95%} 0,22-0,35) y la del error de prescripción de 0,12 (IC_{95%} 0,08-0,17).

Conclusión. Los problemas relacionados con los medicamentos deben estudiarse, diagnosticarse, prevenirse y tratarse para que el personal de salud pueda anticiparse a su aparición, disminuir su incidencia, implementar planes de manejo del riesgo y optimizar el cumplimiento del tratamiento antirretroviral.

Palabras clave: VIH; terapia antirretroviral altamente activa; farmacovigilancia; efectos colaterales y reacciones adversas relacionadas con medicamentos; interacciones medicamentosas; errores de medicación.

Incidencia de antirretroviral drug-related problems in the treatment of HIV among hospitalized patients in the Hospital Santa Clara, Bogotá

Introduction: The antiretroviral therapy for the treatment of the human immunodeficiency virus (HIV) is a therapeutic strategy linked to drug-related problems that cause or can cause the appearance of negative results associated with the medication. It is important, therefore, to identify their incidence, characterize them, and classify them to design strategies to minimize their impact.

Objective: To estimate the overall incidence and the incidence of each one of the antiretroviral drugs-related problems in the treatment of the HIV infection in a cohort of hospitalized patients in Bogotá, Colombia.

Materials and methods: We conducted a descriptive, retrospective cohort study in patients aged 18 years or more diagnosed with HIV infection and under antiretroviral treatment hospitalized between January 1st, 2015, and December 31st, 2016, in the *Hospital Santa Clara*, Bogotá.

Results: The overall incidence of antiretroviral drug-related problems was 0.90 (95% CI: 0.85-0.93). The incidence of drug-drug interactions was 0.85 (95% CI: 0.80-0.90), 0.28 (95% CI: 0.22-0.35) for adverse reactions, and 0.12 (CI 95%: 0.08-0.17) for prescription errors.

Conclusion: Drug-related problems should be studied, diagnosed, prevented, and treated. Their knowledge can enable health care professionals to anticipate their emergence, reduce their incidence, implement risk management plans, and optimize adherence to antiretroviral treatment.

Keywords: HIV; highly active antiretroviral therapy; pharmacovigilance; drug-related side effects and adverse reactions; drug interactions; medication errors.

Recibido: 05/04/18
Aceptado: 13/03/19
Publicado: 01/04/19

Citación:

Badillo CA, Barrera LK, Arias G, Tribiño GF, Gamboa OA, García JC, *et al.* Incidencia de los problemas relacionados con los medicamentos antirretrovirales para el tratamiento de la infección por HIV en pacientes hospitalizados en el Hospital Santa Clara de Bogotá. *Biomédica*. 2019;39:561-75. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4345>

Correspondencia:

Lizeth Katherine Barrera, Calle 127 B Bis N° 20-66, apartamento 411, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (300) 280 2026
liz.bclavijo@gmail.com

Contribución de los autores:

Carlos Andrés Badillo y Lizeth Katherine Barrera: concepción y diseño del proyecto, recolección, análisis e interpretación de los datos y redacción del manuscrito.

Gerson Arias: asesoría temática en el área de infectología, concepción y diseño del proyecto, análisis e interpretación de los datos

Gabriel Fernando Tribiño: asesoría temática en el área de farmacología clínica, concepción y diseño del proyecto, análisis e interpretación de los datos
Óscar Andrés Gamboa: asesor metodológico, análisis estadístico e interpretación de los datos

Julio César García: asesoría temática en el área de farmacología clínica, análisis e interpretación de los datos, y redacción del manuscrito

Ana María Granada: asesoría temática en el área de infectología, facilitación de herramientas logísticas para la recolección de datos y supervisión del trabajo de campo en el Hospital Santa Clara

Financiación:

El estudio fue financiado por los autores.

Conflicto de intereses:

Los autores manifiestan no tener ningún conflicto de intereses real o potencial.

Desde su surgimiento en la década de los años 80, la epidemia originada por el virus de la inmunodeficiencia humana (*Human Immunodeficiency Virus*, HIV) ha sido una de la más graves de los tiempos modernos y uno de los mayores retos de la salud pública a nivel mundial, debido a la facilidad de su transmisión entre los seres humanos, la complejidad del tratamiento antirretroviral y la habilidad del virus para generar mecanismos de resistencia al tratamiento (1).

Según los datos epidemiológicos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2017, 36,9 millones de personas estaban infectados por el HIV, de las cuales el 59 % se encontraba bajo tratamiento antirretroviral (2). En ese mismo año, hubo 1,8 millones de casos nuevos y 940.000 muertes asociadas con la infección por el HIV (3).

El tratamiento antirretroviral es una estrategia cuyos objetivos principales son reducir la morbilidad asociada con la infección por HIV, lograr y mantener la supresión de la viremia hasta valores indetectables, mejorar la calidad de vida de los pacientes, prolongar su supervivencia y disminuir el riesgo de transmisión del virus (4,5).

Hay cerca de 25 medicamentos para el tratamiento antirretroviral aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos (4,5). Sin embargo, la gran mayoría de estos medicamentos tienen una ventana terapéutica estrecha, con un amplio espectro de reacciones adversas, lo que, sumado a las frecuentes interacciones farmacológicas de los antirretrovirales con otros fármacos y el número de errores de medicación, implica múltiples problemas relacionados con estos medicamentos en la práctica clínica diaria. Las reacciones adversas indeseables relacionados con el tratamiento antirretroviral pueden conducir a la aparición de resultados negativos, como el cumplimiento deficiente del tratamiento, la resistencia a los antirretrovirales y el incremento de los costos por recaídas y fallas terapéuticas (6).

Los resultados negativos pueden ser producto de los problemas relacionados con los medicamentos, las reacciones adversas, los errores de medicación y las interacciones medicamentosas (6). Los problemas relacionados con los medicamentos competen a la farmacovigilancia, cuyo objetivo es mejorar la atención del paciente fomentando el uso seguro y racional de los medicamentos (7), por lo que esta constituye una herramienta indispensable para la prevención de los riesgos asociados con el uso de medicamentos y la disminución de su impacto negativo en la salud humana mediante planes de manejo de los riesgos y reducción de los altos costos en salud que dichos problemas generan.

El tratamiento antirretroviral ha permitido que la expectativa de vida de los pacientes con infección por HIV aumente, con el resultado de que las comorbilidades asociadas con el envejecimiento, como la diabetes mellitus, la hipertensión arterial sistémica o las dislipidemias se incrementen, así como aquellas propias de la infección por HIV, como las neoplasias y las infecciones oportunistas (8). Los pacientes que reciben el tratamiento son de especial interés desde el punto de vista farmacológico dado el uso de múltiples medicamentos y sus efectos potenciales en la seguridad y la efectividad clínicas, por lo que se les considera pacientes en alto riesgo de desarrollar problemas relacionados con los medicamentos (9).

La gestión del riesgo asociado con dichos problemas en el tratamiento antirretroviral requiere determinar la incidencia total y las de cada uno de los problemas por grupo poblacional, si es factible. En este estudio, se

hizo una revisión retrospectiva de una cohorte de pacientes con infección por HIV bajo tratamiento antirretroviral, hospitalizados en el Hospital Santa Clara de Bogotá durante el 2015 y el 2016. Este es un hospital de tercer nivel que coordina un programa de referencia en el país para pacientes con infección por HIV. Los resultados del estudio brindan herramientas para ofrecer mejor seguridad y efectividad en el tratamiento de la infección por HIV, disminuyendo las fallas terapéuticas, los reingresos hospitalarios y la necesidad de los tratamientos para combatir las complicaciones.

Materiales y métodos

Se hizo un estudio descriptivo y retrospectivo de cohorte con pacientes de 18 años de edad o más con diagnóstico confirmado de infección por HIV y bajo tratamiento antirretroviral, hospitalizados por cualquier causa entre el 1° enero de 2015 y el 31 de diciembre de 2016 en el Hospital Santa Clara de Bogotá.

Este es un hospital público de tercer nivel de atención adscrito a la Secretaría de Salud de Bogotá, que tiene convenios de docencia con universidades para la práctica médica. La zona geográfica de influencia del hospital incluye todo el Distrito Capital por ser centro de referencia en neumología, cirugía cardiovascular y hemodinámica, salud mental, toxicología, y cuidado crítico pediátrico y en adultos. Cuenta con profesionales de la salud especializados en la atención de pacientes con infección por HIV en el servicio de urgencias, en el de consulta externa y durante la hospitalización (10).

Los datos se recolectaron y se organizaron en una base de datos creada por los investigadores en Epidata, versión 2.0.10.26, que incluyó las variables analizadas.

El estudio estimó la incidencia total y de cada uno de los problemas relacionados con los medicamentos antirretrovirales (reacciones adversas, errores de medicación, interacciones medicamentosas) utilizados en el tratamiento de la infección por HIV.

Además, las reacciones adversas detectadas se clasificaron según el sistema orgánico comprometido y la seriedad que revestían; también, se analizó la causalidad y se detallaron los fármacos implicados; se establecieron los errores de prescripción según los criterios de la *American Society of Health-System Pharmacists* (ASHP). Se caracterizaron las interacciones detectadas en términos de los fármacos implicados, el mecanismo de producción y la seriedad potencial de la interacción con el programa Lexicomp™ (Wolters Kluwer Clinical Drug Information, OH, USA). Por último, se estimó de manera exploratoria la incidencia de los problemas relacionados con los medicamentos por grupos de edad, por sexo y por comorbilidades.

Para el cálculo del tamaño de muestra, se incluyeron los pacientes que cumplieran con los criterios de selección a partir del 1° de enero de 2015. A medida que se fueron incluyendo los pacientes, se estimaron las incidencias con sus intervalos de confianza. Se suspendió el reclutamiento cuando se alcanzó una precisión de $\pm 5\%$ en la incidencia estimada, lo que se logró con 200 pacientes. El periodo de estudio se cerró el 31 de diciembre de 2016 con 204 pacientes.

Reacciones adversas de los medicamentos

Para establecer las reacciones adversas, se utilizaron las *Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents*,

Department of Health and Human Services (11) de los *National Institutes of Health* (NIH) de los Estados Unidos, y se agruparon según el sistema orgánico comprometido (reacciones adversas gastrointestinales, cutáneas y neurológicas, entre otras), de tal manera que su detección fuera más fácil para el personal de salud y, luego, se clasificaron según el grupo farmacológico antirretroviral implicado (inhibidores de la transcriptasa inversa nucleosidos, no nucleosidos y nucleótidos, inhibidores de la proteasa, inhibidores de la integrasa, inhibidores de fusión y antagonistas del correceptor CCR5).

Además, se evaluó la relación de causalidad de las reacciones adversas utilizando el algoritmo de Naranjo, *et al.*, con el cual se determina si una reacción es causada por el uso de un medicamento y no es el resultado de otros factores, mediante una serie de preguntas basadas en los criterios de Bradford Hill para la búsqueda de relaciones causales (12).

La ventaja más importante de este algoritmo frente a otros algoritmos o métodos de evaluación de la causalidad es su menor propensión a las variaciones subjetivas, comparado con el sistema de la OMS y el *Uppsala Monitoring Centre* (UMC) basado en el criterio de expertos. Asimismo, es ampliamente aceptado y utilizado en todo el mundo y consume menos tiempo que otros algoritmos (12-14).

Errores de prescripción

Los errores de prescripción se evaluaron con base en la historia clínica, ya que en ella se encontraba registrada la información sobre todos los medicamentos incluidos en el tratamiento. Las prescripciones halladas se compararon con las recomendaciones para el uso de los fármacos antirretrovirales publicadas en la “Guía de práctica clínica basada en la evidencia científica para la atención de la infección por HIV/sida en adolescentes (con 13 años de edad o más) y adultos” del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia, publicada en el 2014 (15).

Interacciones medicamentosas

Para el análisis de las interacciones fármaco-fármaco (antirretrovirales y fármacos de uso concomitante), se emplearon los datos prescriptivos extraídos de las historias clínicas y el programa Lexicomp™, sistema de análisis capaz de evaluar posibles interacciones entre los medicamentos y clasificarlas según la gravedad con bases de datos comprobados (cuadro 1).

Dicho programa provee información clara y precisa relacionada con los medicamentos (dosis, administración, precauciones y advertencias), y con el componente clínico (guías de manejo e interacciones medicamentosas). Además, esta base de datos se actualiza diariamente, ofreciendo así información científica adecuada y aumentando la sensibilidad en la búsqueda de potenciales interacciones medicamentosas. Se ha empleado en distintos estudios en los que se evaluaron las potenciales interacciones medicamentosas.

El uso de Lexicomp™ exige comprar una licencia que, para este estudio, se obtuvo mediante la base de datos electrónica de la biblioteca Octavio Arizmendi Posada de la Universidad de La Sabana.

Cuadro 1. Clasificación de riesgo de la interacción según el programa Lexicomp™

Clasificación de riesgo de la interacción	Comentario
X: evitar la combinación	La evidencia demuestra que los agentes específicos pueden interactuar con un impacto clínico demostrado. El riesgo asociado del uso concomitante de estos agentes usualmente sobrepasa los beneficios. Se considera contraindicación.
D: contemplar la modificación del tratamiento	La evidencia demuestra que los agentes específicos pueden interactuar con un impacto clínico demostrado. Se debe evaluar individualmente para determinar si los beneficios superan los riesgos. Se debe supervisar el tratamiento, cambiar la dosis o usar agentes alternativos.
C: supervisar el tratamiento	La evidencia demuestra que los agentes específicos pueden interactuar con un impacto clínico demostrado. Los beneficios del uso concomitante de los fármacos usualmente superan los riesgos. Un plan de supervisión apropiado debe implementarse para determinar potenciales efectos secundarios.
B: no se requiere acción	Los datos demuestran que los agentes específicos pueden interactuar, sin embargo, son pocos en cuanto a su impacto clínico.
A: interacción no conocida	La evidencia no ha demostrado interacciones farmacocinéticas o farmacodinámicas entre los agentes implicados.

Análisis de datos

Se hicieron análisis descriptivos usando medidas de tendencia central (media, mediana), ubicación (percentiles) y dispersión (desviación estándar y rangos) para las variables cuantitativas.

En la descripción de las variables cualitativas se usaron frecuencias absolutas y relativas. Se calculó la incidencia, con un intervalo de confianza del 95 %, de los problemas relacionados con los medicamentos: número de eventos (primer evento) observado frente al total de la población en riesgo durante el periodo de observación, así como la densidad de la incidencia de las reacciones adversas, con un intervalo de confianza del 95 %, calculándola con respecto al total de personas-día; también, se estableció la incidencia según el tipo de problema relacionado con los medicamentos.

Asimismo, dado que un paciente puede presentar más de uno de dichos problemas, se estimó el promedio de cada uno de ellos por persona, con su intervalo de confianza del 95 %, así como el total de eventos observados con respecto a la población en riesgo durante el periodo de observación.

Por otra parte, se acogieron los siguientes criterios de seriedad de las reacciones adversas (7,16): serias, los que implicaban muerte, amenaza para la vida, prolongación de la hospitalización, incapacidad o discapacidad permanente o significativa, y no serias, aquellos que no cumplieran con los criterios de seriedad.

Por último, se estableció la relación de causalidad de las reacciones adversas (12).

Consideraciones éticas

El estudio se ajustó a los contenidos éticos de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, así como a los de la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, en la cual este tipo de estudio se clasifica como “investigación sin riesgo”.

Se hizo una revisión documental de las historias clínicas protegiendo la confidencialidad, pues no se identificó a los sujetos (en la base de datos no se registraron nombres ni números de documento), y se tomaron medidas para suprimir los datos de identidad de los sujetos. No se hicieron intervenciones clínicas durante el estudio y, por lo tanto, no hubo exposición de los pacientes a factores de riesgo.

El estudio estuvo a cargo de personal clínica y éticamente idóneo. Los investigadores principales asumieron la responsabilidad completa por el trabajo y declararon no tener ninguna clase de conflictos de intereses. Para el manejo de los datos se tuvo en cuenta el artículo 6 de la Ley Estatutaria 1581 de 2012.

Resultados

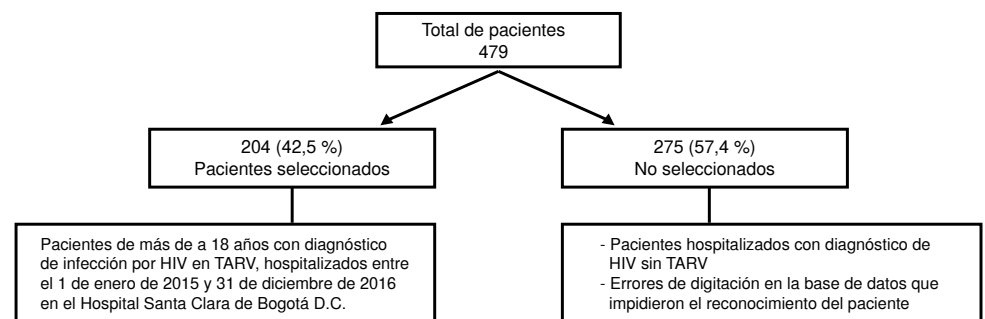
Características poblacionales

En la base de datos se incluyeron 479 pacientes hospitalizados con diagnóstico confirmado de infección por HIV en el período comprendido entre el 1° de enero de 2015 y el 31 de diciembre de 2016, de los cuales 204 cumplían con los criterios de selección (figura 1). La mayoría de ellos eran de sexo masculino ($n=157$, 77 %), con una edad promedio de 40 años \pm 11 (rango de 18 a 84 años), y la relación hombre a mujer fue de 3,3 a 1 (cuadro 2).

Según la clasificación de los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) de los Estados Unidos para el 2014, el 70,5 % ($n=144$) de los pacientes se encontraba en el estadio C3 de la enfermedad, con un promedio de recuento de linfocitos T CD4 (LTCD4) de 121 células/ml.

Se determinaron los diferentes tratamientos antirretrovirales usados en los pacientes estudiados (cuadro 3), y la distribución por grupos de antirretrovirales indicó que el esquema basado en inhibidores de la transcriptasa inversa nucleósidos-nucleótidos más no nucleósidos fue el más empleado (47 % de los pacientes), seguido del esquema basado en inhibidores de la proteasa más inhibidores de la transcriptasa inversa nucleósidos-nucleótidos (38 % de los pacientes). Los antirretrovirales más empleados en cada esquema de tratamiento fueron lamivudina, zidovudina, fumarato de disoproxilo de tenofovir-emtricitabina, efavirenz, lopinavir-ritonavir y atazanavir-ritonavir. No se registraron esquemas de tratamiento con inhibidores del correceptor CCXR-5 ni con fármacos inhibidores de la fusión.

También, se estableció que 59,3 % de los pacientes presentaba alguna comorbilidad de tipo infeccioso, 10,2 % tenía una comorbilidad psiquiátrica y 8,8%, una enfermedad neurológica. Además, se evidenció que 32 % de la población evaluada presentaba antecedentes de consumo de sustancias psicoactivas.



TARV: tratamiento antirretroviral

Figura 1. Criterios de selección de los pacientes incluidos en el estudio

Cuadro 2. Características demográficas y clínicas de los pacientes

Características demográficas	Población (n=204)
Edad (años)	
Media	40 ± 11
Rango	18-84
Sexo	n (%)
Masculino	157 (77)
Femenino	47 (23)
Estrato socioeconómico*	
1	14 (7)
2	4 (2)
Sin información	186 (91)
Nivel educativo	
Ninguno	2 (1)
Primaria	10 (5)
Secundaria	21 (10)
Técnico	2 (1)
Universitario	1 (0,5)
Sin información	168 (82,5)

* El estrato socioeconómico en Colombia se clasifica del 1 a 6, en donde 1 es el más bajo y 6 el más alto

Características demográficas	Población (n=204)
Recuento de linfocitos T CD4	
Media	121 células/ml
Rango	0-793 células/ml
Clasificación de la infección por HIV según clasificación del CDC, 2014	n (%)
A1	2 (1)
A2	2 (1)
A3	8 (4)
B1	0 (0)
B2	3 (1,5)
B3	4 (2)
C1	1 (0,5)
C2	4 (2)
C3	144 (70,5)
Sin información	36 (17,5)
Consumo de sustancias psicoactivas	
Sí	65 (32)
No	121 (59)
Sin información	18 (9)
Esquema de tratamiento antirretroviral	
ITR nucleósido-nucleótido más inhibidor de la integrasa	20 (10)
ITR nucleósido-nucleótido más ITR no nucleósido	97 (47)
IP más ITR nucleósido-nucleótido	78 (38)
Otros esquemas	9 (5)
Comorbilidades	
Enfermedad infecciosa	121 (59)
Enfermedad psiquiátrica	21 (10)
Enfermedad neurológica	18 (9)
Enfermedad hematológica	12 (6)
Otras	32 (16)
Función renal (TFG según Cockcroft Gault)	
<15 ml/minuto/1,73 m ²	3 (1,5)
16-29 ml/minuto/1,73 m ²	3 (1,5)
30-59 ml/minuto/1,73 m ²	21 (10,3)
60-89 ml/minuto/1,73 m ²	39 (19,1)
>90 ml/minuto/1,73 m ²	60 (29,4)
Sin información	78 (38,2)
Presencia de disfunción hepática	
Sí	9 (4,4)
No	195 (95,6)

ITR: inhibidor de la transcriptasa inversa ; IP: inhibidor de proteasa; TFG: tasa de filtración glomerular; CDC: Centers for Disease Control and Prevention

Cuadro 3. Tratamientos antirretrovirales usados en los pacientes estudiados

Grupo terapéutico	Fármaco antirretroviral
ITR nucleósido	Abacavir
	Zidovudina
	Lamivudina
	Didanosina
ITR no nucleósido	Efavirenz
	Nevirapina
	Rilpivirina
ITR nucleótido	Tenofovir
Inhibidores de la proteasa	Lopinavir-ritonavir
	Atazanavir-ritonavir
	Darunavir-ritonavir
	Fosamprenavir-ritonavir
Inhibidores de la integrasa	Raltegravir
	Dolutegravir

ITR: inhibidor de la transcriptasa inversa

Incidencia de los problemas relacionados con los medicamentos

La incidencia total de estos problemas (reacciones adversas, errores de medicación e interacciones medicamentosas) fue de 0,90 (IC_{95%} 0,85-0,93). Al evaluar los datos según el tipo de problema específico, se evidenció una incidencia de 0,85 (IC_{95%} 0,80-0,90) de la interacción medicamentosa, de 0,28 (IC_{95%} 0,22-0,35) de las reacciones adversas, y una de 0,12 (IC_{95%} 0,08-0,17) de los errores de prescripción. Asimismo, la densidad de la incidencia de las reacciones adversas fue de 9 por 100 personas-día de hospitalización.

De manera exploratoria, se estableció que la incidencia de los problemas relacionados con los medicamentos según el sexo fue de 0,91 (IC_{95%} 0,86-0,95) en hombres y de 0,85 (IC_{95%} 0,71-0,93) en mujeres, en tanto que por grupo etario fue de 0,95 (IC_{95%} 0,90-0,98) para los adultos entre los 20 y los 39 años, de 0,84 (IC_{95%} 0,74-0,91) para la población entre los 40 y los 64 años, y de 0,83 (IC_{95%} 0,35-0,99) para la población mayor de 65 años.

La incidencia por subgrupo de comorbilidades fue de 0,97 (IC_{95%} 0,92-0,99) para infecciones, 0,91 (IC_{95%} 0,61-0,99) para enfermedades cardiorrespiratorias y de 0,76 (IC_{95%} 0,60-0,88) para condiciones neuropsiquiátricas.

Reacciones adversas de los medicamentos

Se documentaron 73 reacciones adversas, con un promedio de 0,35 episodios por persona (IC_{95%} 0,26-0,43); el sistema gastrointestinal fue el más afectado (58 %; n=42), seguido del hematológico (11 %; n=8), el neurológico (n=5) y el cardiovascular (n=5), ambos con el 7 %. Al discriminar las principales reacciones adversas que comprometían el sistema gastrointestinal, se estableció que el 45 % del total correspondió a náuseas, 28,5 % a diarrea y 19 % a vómito. Por otro lado, las principales reacciones adversas en el sistema hematológico fueron anemia, en el 75 %, y neutropenia, en el 25 % de los casos. La cefalea (60 %), el vértigo (20 %) y el insomnio (20 %) fueron las más frecuentes en el sistema neurológico. La taquicardia fue la reacción adversa más detectada en el sistema cardiovascular (80 % de los casos).

El grupo de medicamentos más frecuentemente implicado en las reacciones adversas fue el de los inhibidores de la transcriptasa inversa nucleósidos, en el 56 % de los casos, seguido de los inhibidores de la proteasa, en el 23 %,

seguidos por los inhibidores de la transcriptasa inversa nucleótidos, en el 12 %, los inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos, en el 7 %, y los inhibidores de la integrasa en el 2 %. Asimismo, se determinaron los fármacos antirretrovirales más frecuentemente implicados en las reacciones adversas (cuadro 4).

Al evaluar la causalidad de las reacciones adversas con el algoritmo de Naranjo, *et al.*, se encontró que del total (n=73), el 93,1 % tuvo una asociación causal posible, 4,11 %, una probable, y 2,74 %, una definitiva. Además, 52 (71,2 %) de los 73 determinados se clasificaron como no serios y 21 (28,8 %) como serias.

Errores de prescripción

Se documentaron 30 errores de dosificación, con un promedio de 0,14 errores por persona (IC_{95%} 0,08-0,20). No se documentaron errores por selección incorrecta del medicamento prescrito, forma farmacéutica o vía de administración. De los errores evaluados, los relacionados con los inhibidores de la transcriptasa inversa nucleósidos-nucleótidos fueron los más frecuentes (n=24), especialmente la lamivudina y el fumarato de disoproxilo de tenofovir, seguido por los relacionados con los inhibidores de la proteasa (n=5) y con inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (n=1). La mayoría de los errores de prescripción se debieron a no haber ajustado la dosis según la función renal (cuadro 5), siendo la lamivudina el principal medicamento implicado (53,3 % de los casos), seguida del fumarato de disoproxilo de tenofovir-emtricitabina (36,6 % de los casos).

Interacciones medicamentosas

Se evaluaron 714 interacciones medicamentosas, con un promedio de 3,4 (IC_{95%} 3,12-3,86) interacciones por paciente. El 85,7 % de los pacientes presentó, al menos, una interacción y el 73,5 % presentó dos o más interacciones medicamentosas. Cabe mencionar que 9 pacientes (4,4 %) presentaron 10 interacciones.

Cuadro 4. Fármacos implicados en los efectos secundarios a medicamentos

Antirretroviral	Efectos secundarios asociados (n=73) n (%)
Zidovudina-lamivudina	23 (31,5)
Tenofovir-emtricitabina	18 (24,6)
Lopinavir-ritonavir	13 (17,8)
Abacavir-lamivudina	11 (15)
Atazanavir- itonavir	4 (5,4)
Efavirenz	4 (5,4)

Cuadro 5. Ejemplos de errores de dosificación

Medicamento	Ajuste	Error
Lamivudina	150 mg al día	300 mg/día en falla renal con TFG de 34 ml/minuto/1,73 m ²
Lamivudina	150 mg al día	300 mg cada 8 horas con TFG de 47 ml/minuto/1,73 m ²
Lamivudina	150 mg/día y luego 100 mg/día	300 mg/día con TFG de 21 ml/minuto/1,73 m ²
Tenofovir	No formular	Se formuló en lesión renal aguda
Tenofovir	300 mg cada 48 h	300 mg cada día con TFG de 41 ml/minuto/1,73 m ²
Tenofovir	300 mg cada 72 h	300 mg c/día con TFG de 21 ml/minuto/1,73 m ²
Emtricitabina	200 mg cada 48 h	200 mg/día
Nevirapina	200 mg cada 12 h	200 mg/día
Didanosina	125 mg/día	400 mg/día

TFG: tasa de filtración glomerular

Los grupos farmacológicos implicados en las interacciones farmacológicas fueron los inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos ($n=296$, 41,4 %), los inhibidores de la proteasa ($n=265$, 37,1 %), los inhibidores de la transcriptasa inversa nucleósidos-nucleótidos ($n=134$, 18,7 %) y los inhibidores de la integrasa ($n=19$, 2,6 %).

El efavirenz fue el inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleósido con mayor número de interacciones (37,8 % del total), seguido por la combinación de lopinavir-ritonavir y de atazanavir-ritonavir con 25 y 9 %, respectivamente (figura 2). A pesar de que la zidovudina, el fumarato de disoproxilo de tenofovir y la lamivudina se utilizaron frecuentemente en el tratamiento antirretroviral en la población de estudio, su porcentaje de interacciones fue bajo: 6,5, 6,3 y 5 %, respectivamente.

Los principales fármacos con los cuales interactuaron los inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos, fueron el trimetoprim-sulfametoxazol (22,2 %), el fluconazol (9,6 %) y la trazodona (9,2 %). Por otro lado, las interacciones más frecuentes observadas con los inhibidores de la proteasa se presentaron con trimetoprim-sulfametoxazol (16,6 %), omeprazol (12 %), fluconazol (10 %) y claritromicina (6,4 %). Las principales interacciones de la zidovudina se dieron con claritromicina (27,6 %), fluconazol (25,5 %) y dipirona (21,2 %). El 100 % de las interacciones de la lamivudina fueron con el trimetoprim-sulfametoxazol, en tanto que el 40 % de las interacciones del fumarato de disoproxilo de tenofovir fueron con aciclovir y, en menor porcentaje, con dipirona (31,1 %).

Según la clasificación mecánica de las interacciones, el 50,5 % fue de tipo farmacodinámico y el 49,5 %, de tipo farmacocinético.

Según la herramienta Lexicomp™, el 47,7 % ($n=341$) de las 714 interacciones se categorizó como de categoría C (necesidad de supervisar el tratamiento), seguidas de las de categoría D (contemplar la modificación del tratamiento) con 35 % ($n=250$), de categoría X (evitar la combinación) con 10,6 % ($n=76$) y de categoría B (sin necesidad de intervención) con un 6,5 % ($n=47$).

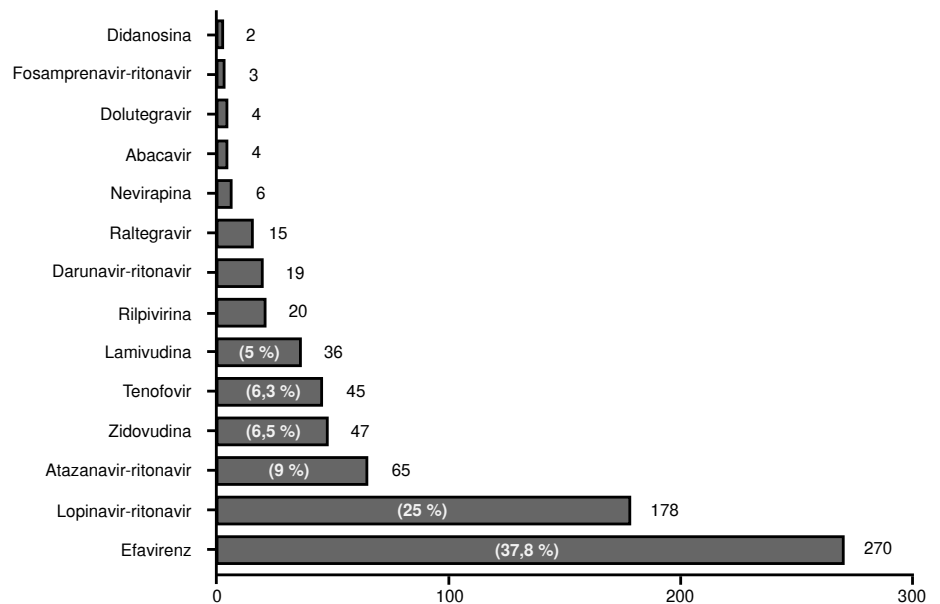


Figura 2. Fármacos implicados en las interacciones medicamentosas (número de interacciones)

Al analizar las interacciones categorizadas como X, se encontró que se debían principalmente al uso de lopinavir-ritonavir con claritromicina (riesgo de prolongación del intervalo QT) en 17 % de los casos, seguido de la combinación de zidovudina con dipirona (potenciación del efecto tóxico mielosupresor de ambos medicamentos con incremento en el riesgo de desarrollar agranulocitosis y pancitopenia) y de la combinación de lopinavir-ritonavir con trazodona (riesgo de prolongación del intervalo QT), ambas combinaciones en un 13 % de los casos. La interacción entre lopinavir-ritonavir y metronidazol correspondió al 12 % seguida de la de lopinavir-ritonavir con ciprofloxacina con el 10,5 %, ambas con riesgo de prolongar el intervalo QT.

Al analizar las interacciones de tipo D, se evidenció que las más frecuentes se debieron a las combinaciones de lopinavir-ritonavir con trimetoprim-sulfametoxazol (n=30, 12 %), lopinavir-ritonavir con fluconazol (n=19, 7,6 %) y atazanavir-ritonavir con omeprazol (n=15, 6 %).

Discusión

Actualmente existen pocos estudios en el país y en Latinoamérica en que se haya evaluado la incidencia de los problemas relacionados con los medicamentos, lo que indicaría la falta de interés en torno a su impacto en la atención hospitalaria. Los resultados del presente estudio evidenciaron que el 90 % de los pacientes presentaron dichos problemas, lo cual indica el alto riesgo de la población hospitalizada que está bajo tratamiento antirretroviral de presentar resultados negativos asociados con este y la importancia de generar mecanismos que gestionen el riesgo en aras de su seguridad.

Si bien la incidencia de los problemas relacionados con los medicamentos fue similar en los grupos de edad evaluados, es importante tener precaución y hacer hincapié en los pacientes adultos mayores, ya que usualmente toman múltiples fármacos, lo que suele incrementar el riesgo de presentar tales problemas, por ejemplo, reacciones adversas e interacciones medicamentosas, así como el aumento en las hospitalizaciones y el poco cumplimiento del tratamiento (17).

Llamó la atención la mayor incidencia de los problemas relacionados con los medicamentos en el análisis del subgrupo de pacientes con infecciones concomitantes, lo que responde, en gran parte, a que estas fueron la comorbilidad más frecuente, aunque también se asociaría con una mayor probabilidad de interacciones entre los antirretrovirales y los fármacos contra las infecciones, por ejemplo, claritromicina, rifampicina y fluconazol, entre otros. En este sentido, es necesario proveer antimicrobianos de menor interacción con el tratamiento antirretroviral, por ejemplo, azitromicina o rifamicina, entre otros.

Según los resultados, el 28 % de los pacientes evaluados había presentado alguna reacción adversa, porcentaje que se encuentra en el rango de los valores reportados en la literatura, los cuales oscilan entre el 4 y el 85 % (18-20); esta variabilidad se atribuye a la heterogeneidad de las poblaciones y los tratamientos evaluados en los estudios, como la raza, el periodo de seguimiento, la hospitalización y los esquemas antirretrovirales empleados. Esto resulta de especial interés al considerar que las reacciones adversas son una reacción nociva y no intencionada a un fármaco (21,22), y que algunos son prevenibles, por lo que es pertinente implementar un sistema activo de farmacovigilancia, así como programas de educación médica para garantizar la seguridad de los pacientes.

Más de la mitad de las reacciones adversas afectaron el sistema gastrointestinal, y las náuseas, la diarrea y el vómito fueron las más frecuentes. Otros sistemas afectados, aunque en menor proporción, fueron el sistema hematológico y el neurológico. La densidad de la incidencia de las reacciones adversas en el estudio respalda la necesidad de hacer un seguimiento activo, constante y periódico a la población hospitalizada que recibe tratamiento antirretroviral para detectar tempranamente posibles reacciones adversas.

En otros estudios se han reportado datos similares a los encontrados en este. Es el caso del estudio de cohorte prospectivo de Bezabhe, *et al.*, en Etiopía, en el cual se evaluaron 211 pacientes y se registró una densidad de la incidencia de reacciones adversas de 14,8 por 100 personas-mes y el 54,5 % de pacientes con reacciones adversas gastrointestinales, y las náuseas y el vómito fueron las más frecuentes, seguidas por el 53,5 % de reacciones adversas neuropsiquiátricas (19).

Por otra parte, en un estudio analítico observacional publicado en el 2007 que se llevó a cabo en una cohorte histórica en un hospital de Lima, se reportó una densidad de incidencia de 9,1 por 10 personas-año de seguimiento; el sistema gastrointestinal estuvo comprometido en 28,5 % del total de las reacciones adversas detectadas, seguido por el sistema hematológico en el 23,4 % (18,19). El esquema de zidovudina-lamivudina fue el más frecuentemente asociado con las reacciones adversas, seguido por el de fumarato de disoproxilo de tenofovir-emtricitabina y lopinavir-ritonavir. El impacto de estos hallazgos en la práctica clínica exigiría una mayor vigilancia y mejor seguimiento de los pacientes, con el fin de mejorar el cumplimiento del tratamiento y su seguridad.

En los estudios dedicados a determinar errores de medicación se ha determinado que ocurren con mayor frecuencia en el momento de prescribir el tratamiento y se relacionan con la dosis, la frecuencia, las posibles interacciones con medicamentos y con alimentos, los esquemas incompletos y con el hecho de no ajustar la dosis en condiciones especiales como, por ejemplo, la falla renal.

Al analizar los errores de dosificación, se evidenció que el 12 % de los pacientes presentaba este tipo de problema, la mayoría por no ajustar la dosis teniendo en cuenta la disfunción renal, principalmente de lamivudina y fumarato de disoproxilo de tenofovir. Es posible que dicha incidencia se haya subestimado, ya que la historia clínica de la gran mayoría de los pacientes no registraba datos sobre la función renal. Ello repercute en un mayor riesgo de toxicidad para los pacientes debido al incremento del tiempo de vida media plasmática de los medicamentos condicionado por la disminución de la tasa de filtración glomerular.

Por otra parte, si bien se encontraron pacientes con disfunción hepática (lo cual incide en el ajuste de la dosis y, consecuentemente, puede constituir un error de prescripción), no fue posible caracterizar el grado de disfunción hepática para determinar si se requería el ajuste de la dosis porque no todos los datos se encontraban en las historias clínicas revisadas.

Los errores de medicación son prevalentes en los pacientes hospitalizados con diagnóstico de infección por HIV (23). En un estudio retrospectivo de Rastegar, *et al.*, en el cual se evaluaron los errores de medicación en una cohorte de 209 pacientes con diagnóstico de infección por

HIV, el error más frecuente fue el relacionado con la cantidad o la frecuencia de las dosis (16,3 % de los pacientes), seguido por el de administrar un antirretroviral con otro medicamento contraindicado (24).

Por otro lado, en un estudio publicado en *Annals of Pharmacotherapy* (25) en el 2008 se documentó que había habido al menos un error de medicación en el 72 % de los pacientes evaluados y que el 56 % de estos errores tenía el potencial de causar deterioro clínico.

Si bien en el presente estudio no se documentaron tantos errores como en el de 2008, los datos ameritan un llamado de alerta frente a la necesidad de evaluar de manera periódica y minuciosa las formulaciones de los pacientes. Se ha documentado suficientemente que los problemas relacionados con los medicamentos conllevan consecuencias clínicas importantes en este grupo específico de pacientes, como la aparición de resistencia viral, la toxicidad farmacológica y el deficiente control sintomático, lo que se traduce en el aumento de los costos para el sistema de salud, la prolongación de la hospitalización e, inclusive, el aumento en la mortalidad (7,17,26).

En cuanto a las interacciones farmacológicas, los resultados del presente estudio evidenciaron una incidencia de problemas relacionados con los medicamentos del 85 %, lo cual refleja la complejidad del tratamiento antirretroviral. Incluso, se documentaron casos de pacientes que presentaron hasta diez interacciones, lo que representa un incremento en el riesgo de seguridad y la eficacia de los medicamentos implicados. En este sentido, resulta explicable que los inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos y los de la proteasa sean los de mayor potencial de interacción, pues tienen la facultad de inducir e inhibir distintas enzimas del sistema microsómico P450, por ejemplo, los citocromos CYP3A4, CYP2C9, y CYP2C19, entre otros (11).

En la caracterización de las interacciones medicamentosas se registró un porcentaje no despreciable de interacciones de tipo X (10,6 %), las cuales pueden tener resultados clínicos adversos graves y, por lo tanto, pueden requerir un cambio en el tratamiento, por ejemplo, para evitar la interacción entre zidovudina y dipirone podría optarse por otro tipo de analgésico para prevenir el riesgo de agranulocitosis. Además, en las interacciones entre lopinavir-ritonavir y antibióticos y antidepresivos es de vital importancia monitorizar periódicamente el intervalo QT en caso de no poder cambiar el tratamiento.

En el presente estudio se encontraron interacciones medicamentosas con gran potencial de riesgo de resultados negativos, lo cual coincide con lo reportado en el estudio de Machado, *et al.*, en Colombia, quienes documentaron 49 interacciones entre los fármacos antirretrovirales y los medicamentos administrados concomitantemente con riesgos potenciales, siendo los inhibidores de la proteasa los implicados en 40 % de estas asociaciones. La interacción más frecuente se dio entre estos inhibidores y las estatinas (49 %), y la de estos y los antidepresivos (10,2 %) (27).

Los hallazgos de este estudio resaltan la importancia de contar con el conocimiento necesario para detectar los principales problemas relacionados con medicamentos, disminuir su incidencia, optimizar el cumplimiento del tratamiento antirretroviral entre los pacientes y, probablemente, su efectividad al disminuir las interacciones medicamentosas y la aparición de reacciones adversas y, además, disminuir los costos directos derivados de la atención en salud para enfrentar tales problemas, así como las complicaciones generadas por el incumplimiento del tratamiento antirretroviral.

Las limitaciones del estudio incluyen su naturaleza retrospectiva, pues no se contó con los elementos necesarios para establecer con certeza la relación de causalidad de las reacciones adversas; además, solo se evaluó un error de medicación (en la prescripción) y no se evaluó el impacto clínico de las interacciones medicamentosas. Sin embargo, el estudio constituye un punto de partida para futuros análisis orientados a la farmacovigilancia del tratamiento antirretroviral de la infección por el HIV, así como para el diseño de estrategias institucionales encaminadas a mejorar la seguridad y disminuir los riesgos derivados del uso de los medicamentos antirretrovirales mediante recomendaciones prescriptivas y de seguimiento, y de programas de educación para los profesionales de la salud.

El estudio aportó datos sobre la incidencia de los problemas relacionados con los medicamentos en pacientes hospitalizados con diagnóstico de infección por HIV y bajo tratamiento antirretroviral. Tales problemas son frecuentes en este tipo de pacientes y, por lo tanto, deben estudiarse, diagnosticarse, prevenirse y tratarse en el marco de planes de manejo del riesgo que maximicen los beneficios y minimicen los riesgos de los fármacos. Los inhibidores de la transcriptasa inversa nucleósidos fueron los fármacos más implicados en las reacciones adversas, y el sistema gastrointestinal fue el más afectado. La mayoría de los errores de prescripción se debieron a que no se ajustó la dosis según la función renal de los pacientes. La gran cantidad de interacciones medicamentosas demuestra la complejidad del tratamiento antirretroviral y su potencial de causar resultados negativos en los pacientes. El conocimiento sobre los principales problemas relacionados con los medicamentos en pacientes bajo tratamiento antirretroviral permite disminuir su incidencia, optimizar el cumplimiento del tratamiento y mejorar su efectividad.

Asimismo, el estudio contribuye y refuerza la farmacovigilancia del tratamiento antirretroviral, por lo que se recomienda contar con un especialista en farmacología clínica en la atención de este grupo de pacientes.

Agradecimientos

A Elizabeth Forero, por facilitar las herramientas logísticas necesarias para la recolección de datos.

Referencias

1. Vella S, Schwartländer B, Sow SP, Eholie SP, Murphy RL. The history of antiretroviral therapy and of its implementation in resource-limited areas of the world. *AIDS*. 2012;26:1231-41. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32835521a3>
2. World Health Organization. Data and statistics. Geneva: WHO; 2017. Fecha de consulta: 2 de septiembre de 2018. Disponible en: <https://www.who.int/healthinfo/statistics/en/>
3. World Health Organization. Summary of the global HIV Epidemic 2017. Fecha de consulta: 12 de noviembre de 2018. Disponible en: <https://www.hiv.gov/federal-response/pepfar-global-aids/global-hiv-aids-overview>
4. Pau AK, George JM. Antiretroviral therapy: Current drugs. *Infect Dis Clin North Am*. 2014;28:371-402. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2014.06.001>
5. Tsibris AM, Hirsch MS. Tratamiento antirretroviral de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. En: Bennett, Dolin y Blaser editores. *Enfermedades infecciosas. Principios y práctica*. 2016; p. 1704-24.
6. Comité de Consenso de la Universidad de Granada. Tercer consenso de Granada sobre problemas relacionados con medicamentos y resultados negativos asociados a la medicación. *Ars Pharm*. 2007;48:5-17.
7. Red-PARF. Buenas prácticas de farmacovigilancia para las Américas. Washington: Red Panamericana de Armonización de la Reglamentación Farmacéutica, Red PARF; 2010. p. 78.

8. Serrano-López De Las Hazas JI. Interacciones farmacológicas de los nuevos antirretrovirales. *Farm Hosp*. 2011;35:36-43. <http://doi.org/10.1016/j.farma.2010.01.018>
9. Li EH, Foisy MM. Antiretroviral and medication errors in hospitalized HIV-positive patients. *Ann Pharmacother*. 2014;48:998-1010. <http://doi.org/10.1177/1060028014534195>
10. Méndez-Arévalo HA. Compromisos del Convenio 1282 de 2015. Fecha de consulta: 20 de octubre de 2018. Disponible en: [http://www.saludcapital.gov.co/BibliotecaPSFFasp/Convenios de Especialización/Hospital Santa Clara/Convenio 1282-2015/Propuesta de Fortalecimiento CV 1282-2015 31082015.pdf](http://www.saludcapital.gov.co/BibliotecaPSFFasp/Convenios%20de%20Especializaci3n/Hospital%20Santa%20Clara/Convenio%201282-2015/Propuesta%20de%20Fortalecimiento%20CV%201282-2015%2031082015.pdf)
11. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Washington, D.C.: Department of Health and Human Services; 2015.
12. Doherty MJ. Algorithms for assessing the probability of an adverse drug reaction. *Respir Med CME*. 2009;2:63-7. <https://doi.org/10.1016/j.rmedc.2009.01.004>
13. Behera SK, Das S, Xavier AS, Velupula S, Sandhiya S. Comparison of different methods for causality assessment of adverse drug reactions. *Int J Clin Pharm*. 2018;40:903-10. <https://doi.org/10.1007/s11096-018-0694-9>
14. Belhekar MN, Taur SR, Munshi RP. A study of agreement between the Naranjo algorithm and WHO-UMC criteria for causality assessment of adverse drug reactions. *Indian J Pharmacol*. 2014;46:117-20. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.125192>
15. Ministerio de Salud y Protección Social. Guía de práctica clínica basada en la evidencia científica para la atención de la infección por VIH/Sida en adolescentes (con 13 años de edad o más) y adultos. Bogotá, D.C.; Minprotección; 2014.
16. Federal Drug Administration. What is a serious adverse event?; 2016. Fecha de consulta: 12 de noviembre de 2018. Disponible en: <https://www.fda.gov/safety/medwatch/howtoreport/ucm053087.htm>
17. Holtzman C, Armon C, Tedaldi E, Chmiel JS, Buchacz K, Wood K, *et al*. Polypharmacy and risk of antiretroviral drug interactions among the aging HIV-infected population. *J Gen Intern Med*. 2013;28:1302-10. <https://doi.org/10.1007/s11606-013-2449-6>
18. Astuvilca J, Arce-Villavicencio Y, Sotelo R, Quispe J, Guillén R, Peralta L, *et al*. Incidencia y factores asociados con las reacciones adversas del tratamiento antirretroviral inicial en pacientes con VIH. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2007;24:218-24.
19. Bezabhe WM, Bereznicki LR, Chalmers L, Gee P, Kassie DM, Bimirew MA, *et al*. Adverse drug reactions and clinical outcomes in patients initiated on antiretroviral therapy: A prospective cohort study from Ethiopia. *Drug Saf*. 2015;38:629-39. <https://doi.org/10.1007/s40264-015-0295-7>
20. Eluwa GI, Badru T, Akpoigbe KJ. Adverse drug reactions to antiretroviral therapy (ARVs): Incidence, type and risk factors in Nigeria. *BMC Clin Pharmacol*. 2012;12:1-25. <https://doi.org/10.1186/1472-6904-12-7>
21. World Health Organization. International drug monitoring: The role of national centres. *Tech Rep Ser*. 1972. Fecha de consulta: 12 de noviembre de 2018. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/40968>
22. Edwards IR, Aronson JK. Adverse drug reactions: Definitions, diagnosis, and management. *Lancet*. 2000;356:1255-9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02799-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02799-9)
23. Mok S, Minson Q. Drug-related problems in hospitalized patients with HIV infection. *Am J Heal Pharm*. 2008;65:55-9. <https://doi.org/10.2146/ajhp070011>
24. Rastegar DA, Knight AM, Monolakis JS. Antiretroviral medication errors among hospitalized patients with HIV infection. *Clin Infect Dis*. 2006;43:933-8. <https://doi.org/10.1086/507538>
25. Pastakia SD, Corbett AH, Raasch RH, Napravnik S, Correll TA. Frequency of HIV-related medication errors and associated risk factors in hospitalized patients. *Annals of Pharmacotherapy*. 2008;42:491-497. <https://doi.org/10.1345/aph.1K547>
26. Rehan HS, Chopra D, Kakkar AK. Physician's guide to pharmacovigilance: Terminology and causality assessment. *Eur J Intern Med*. 2009;20:3-8. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2008.04.019>
27. Machado J, Morales C, Hoyos V. Frecuencia de potenciales interacciones medicamentosas entre antirretrovirales y otros grupos farmacológicos en pacientes colombianos. *Rev Investig Andin*. 2014;16:910-20.

Original article

Survey on hypoglycemia among insulin-treated patients with diabetes: The Colombian International Operations Hypoglycemia Assessment Tool population

Ana M. Gómez¹, Luis G. Chica², Álvaro F. Burbano³, Esdras M. Vásquez⁴, Jorge A. Escobar⁵, Paola M. Arias⁵, Dora I. Molina^{6,7}

¹ Departamento de Endocrinología, Hospital Universitario San Ignacio, Bogotá, D.C., Colombia

² Centro de Excelencia para el Manejo de la Diabetes (CEMDI), Bogotá, D.C., Colombia

³ Especialización en Medicina Familiar, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Departamento de Endocrinología, Clínica Integral de Diabetes, Medellín, Colombia

⁵ CMRQ, Novo Nordisk Colombia S.A.S., Bogotá, D.C., Colombia

⁶ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia

⁷ IPS Médicos Internistas de Caldas, Manizales, Colombia

Received: 28/05/18

Accepted: 13/03/19

Published: 08/05/19

Citation:

Gómez AM, Chica LG, Burbano ÁF, Vásquez EM, Escobar JA, Arias PM, *et al.* Survey on hypoglycemia among insulin-treated patients with diabetes: The Colombian International Operations Hypoglycemia Assessment Tool population. *Biomédica*. 2019;39:576-86.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.4365>

Corresponding author:

Ana María Gómez, Unidad de Endocrinología, Hospital Universitario San Ignacio, Carrera 7 N° 40-62, piso 6, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (57) (310) 488 4626; fax: (571) 703 7032
amgomez5@gmail.com

Author contributions:

Jorge A. Escobar and Paola M. Arias contributed to the study conception and design.
All authors contributed to the data analysis and interpretation, and the writing of the study in Colombia.

Funding:

This study was funded by Novo Nordisk. Novo Nordisk contributed to the study conception and design, investigation site selection, data analysis, and interpretation. It had writer input into the report and the decision to submit the article for publication.

Conflicts of interest:

Ana M. Gómez has acted as a speaker for Novo Nordisk, Eli Lilly, MSD, Novartis, Astra Zeneca, Medtronic, and Abbot; she has received funding for research from Novartis and has been part of an advisory board for Abbot, Novo Nordisk, and MSD.
Luis G. Chica has acted as a speaker for Novo Nordisk, MSD, Medtronic, and Boehringer Ingelheim; he has received funding for research from Novo Nordisk and has been part of an advisory board for MSD, Novo Nordisk, and Janssen.
Álvaro F. Burbano has acted as speaker for Novo Nordisk, Astra Zeneca, Pfizer, Amgen, and Abbott; he has been part of an advisory board for Novo Nordisk and Janssen.
Esdras M. Vásquez has been part of an advisory board for Novo Nordisk and has received funding from Novo Nordisk, Sanofi, MSD, Eli Lilly, and Boehringer Ingelheim for continuous medical education.
Jorge A. Escobar and Paola M. Arias are employees of Novo Nordisk Colombia S.A.S.
Dora I. Molina has no conflict of interests.

Introduction: The non-interventional International Operations Hypoglycemia Assessment Tool (IO-HAT) study assessed the incidence of hypoglycemia in patients with insulin-treated diabetes across nine countries, including a cohort of patients in Colombia.

Materials and methods: Hypoglycemia incidence among patients with insulin-treated diabetes was assessed across 26 sites in Colombia. Hypoglycaemic events (any, nocturnal or severe) were reported in self-assessment questionnaires (SAQ) and patient diaries based on capillary blood glucose measurement or symptoms. Retrospective events (severe events 6 months before baseline and any event 4 weeks before baseline) were recorded in SAQ, Part 1, and prospective events (4 weeks from baseline) were recorded in SAQ, Part 2, and patient diaries. Differences in hypoglycemia incidence reported in the retrospective and prospective periods were assessed using two-sided tests.

Results: Of the 664 patients assessed, 213 had type 1 diabetes (T₁D) and 451 had type 2 diabetes (T₂D). Nearly all patients experienced at least one hypoglycaemic event in the prospective period (97.1% T₁D; 93.3% T₂D). Rates of hypoglycemia (events per person-year, PPY) were higher prospectively than retrospectively for any hypoglycemia (T₁D: 121.6 vs. 83.2, p<0.001; T₂D: 28.1 vs. 24.6, p=0.127) and severe hypoglycemia (T₁D: 15.3 vs. 9.2, p=0.605; T₂D: 9.5 vs. 3.5 p=0.040).

Conclusion: These results, the first from a patient-reported dataset on hypoglycemia in insulin-treated patients with diabetes in Colombia, show that patients reported higher rates of any hypoglycemia during the prospective period.

Clinical trial registration number: NCT02306681

Keywords: Hypoglycemia; diabetes mellitus; insulin infusion systems; Colombia.

Encuesta sobre hipoglucemia en pacientes con diabetes tratados con insulina: la población colombiana del *International Operations Hypoglycemia Assessment Tool*

Introducción. En el estudio no intervencionista *International Operations Hypoglycemia Assessment Tool* (IO-HAT), se evaluó la incidencia de hipoglucemia en pacientes diabéticos tratados con insulina en nueve países, incluido Colombia.

Materiales y métodos. La incidencia de hipoglucemia entre pacientes diabéticos tratados con insulina se evaluó en 26 centros médicos en Colombia. Los episodios de hipoglucemia determinados con base en la medición de la glucemia capilar o en los síntomas se reportaron en el cuestionario de autoevaluación (*Self-Assessment Questionnaire*, SAQ) y en el diario del paciente. Los episodios retrospectivos (episodios graves y cualquiera ocurrido 6 meses y 4 semanas antes del inicio del estudio, respectivamente) se registraron en el SAQ, parte 1, y los eventos prospectivos (4 semanas desde el inicio), en el SAQ, parte 2, y en el diario del paciente. Las diferencias en la incidencia de la hipoglucemia entre los períodos retrospectivo y prospectivo se evaluaron mediante una prueba de dos colas.

Resultados. De los 664 pacientes evaluados, 213 tenían diabetes de tipo 1 y 451 tenían diabetes de tipo 2. Casi todos los pacientes experimentaron al menos un episodio de hipoglucemia en el período prospectivo (97,1 %, diabetes de tipo 1, y 93,3 %, diabetes de tipo 2). Los índices de hipoglucemia (episodios año-persona) fueron mayores prospectivamente que retrospectivamente para cualquier tipo de hipoglucemia (diabetes de tipo 1: 121,6 Vs. 83,2; p<0,001; la diabetes de tipo 2: 28,1 Vs. 24,6; p=0,127) y para la hipoglucemia grave (diabetes de tipo 1: 15,3 Vs. 9,2; p=0,605; diabetes de tipo 2: 9,5 Vs. 3,5; p=0,040).

Conclusión. Estos resultados, que constituyen el primer conjunto de datos sobre hipoglucemia informados por pacientes diabéticos colombianos tratados con insulina, evidenciaron tasas

más altas para ambos tipos de hipoglucemia durante el período prospectivo.

Número de registro del ensayo clínico: NCT02306681

Palabras clave: hipoglucemia; diabetes mellitus; sistemas de infusión de insulina; Colombia.

In 2010, the overall prevalence of diabetes in Colombia was reported to be 4-8% depending on the age range of the population studied (1). As with many countries around the world, this prevalence is increasing and more recently, the International Diabetes Federation (IDF) estimated there were over 3 million adults with diabetes in Colombia in 2015 with a national prevalence of 9.6% among adults aged 20-79 years and an annual average diabetes-related cost per person of USD\$ 772.9 (2). It is estimated that the number of people with diabetes in Latin America will increase by 148% between 2000 and 2030 (1).

The key goal in the management of diabetes is to maintain normal blood glucose levels. Insulin therapy is used in the treatment of type 1 diabetes (T_1D), and less commonly in the treatment of type 2 diabetes (T_2D). Hypoglycemia is a frequent side effect of insulin therapy and is a major limiting factor in achieving good glycaemic control (3). This condition impacts the patient's quality of life (4) and can result in increased morbidity (3) and mortality (5). Besides, its treatment represents a significant burden on the healthcare system (6).

Data on hypoglycemia rates in real-world practice, particularly in developing countries, are limited. Randomized clinical trials (RCT) often exclude patients with comorbidities or frequent episodes of hypoglycemia, which means that hypoglycemia rates reported from these RCTs are not representative of those in everyday clinical practice (7).

The global Hypoglycemia Assessment Tool (HAT) study, which was designed to determine the incidence of hypoglycemia in a global insulin-treated patient population, demonstrated that the real-world incidence of hypoglycemia is high compared with rates reported from randomized clinical trials. The study also showed there are regional differences in hypoglycemia incidence, with the highest rates being observed among patients with T_1D in Latin America (8).

The Global Attitude of Patients and Physicians 2 (GAPP2) survey, which evaluated data on self-treated hypoglycemia in patients with T_2D in seven countries (9), reported that self-treated hypoglycemia in Argentina was relatively common in patients using basal insulin analogs—at least one event in the previous 30 days was reported by 31% of patients with diabetes (9). In the Brazilian cohort of the HAT study, 91.7% of patients with T_1D and 61.8% of patients with T_2D reported at least one hypoglycaemic event during the 4-week prospective observation period (10).

The International Operations (IO) HAT (IO-HAT) study builds on the information collected from the global HAT study and was designed to assess the incidence of hypoglycemia in patients with T_1D or T_2D treated with insulin (premix, short-acting, long-acting or sensor-augmented pump [SAP]) in Bangladesh, Colombia, Egypt, Indonesia, Philippines, Singapore, South Africa, Turkey, and the United Arab Emirates. The current analysis evaluates data from the Colombian cohort of insulin-treated patients with diabetes enrolled in the IO-HAT study.

Materials and methods

This was an international, multicentre non-interventional, 6-month retrospective and 4-week prospective study of hypoglycaemic events conducted across 26 sites in Colombia using self-assessment questionnaires

(SAQ) and patient diaries. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (11) and the Guidelines for Good Pharmacoepidemiology Practices (12) and it was approved by country-specific regulatory and ethics agencies as applicable.

Study population

Eligible patients were enrolled consecutively during a routinely scheduled clinical consultation with their healthcare provider. Patients were eligible for the study if they were ≥ 18 years of age at baseline, had T₁D/T₂D treated with insulin for >12 months and had provided informed consent. Patients were excluded from the study if they were non-ambulatory, illiterate or otherwise unable to complete the written survey.

Study endpoints

The primary endpoint of the study was to determine the percentage of patients who experience at least one hypoglycaemic episode during the 4-week prospective observational period among the insulin-treated patients with T₁D or T₂D.

Secondary endpoints included the incidence of hypoglycemic events, the relationship between patient demography, diabetes treatment, and the incidence of hypoglycemic episodes. The use of health system resources (number of hospital admission days, additional clinic appointments, and telephone contacts as a result of hypoglycaemic episodes) was assessed. The impact on patient behaviors as a result of hypoglycemia was assessed by the number of consultations with a doctor or nurse, increased calorie intake, avoidance of physical exercise, reduced or skipped insulin doses, increase in the frequency of blood glucose monitoring as a result of fear of hypoglycemia (continuous on scale of 0-10 where 0 is not afraid at all and 10 is absolutely terrified) or hypoglycaemic episodes, and any sick leave, sick days or short days as a result of hypoglycaemic episodes.

Assessments

The assessment was by a two-part SAQ consisting of a retrospective cross-sectional evaluation (Part 1) and a prospective observational evaluation (Part 2). Patient diaries were also provided to assist recall and to record hypoglycemic events, the effect of hypoglycemia on productivity, and healthcare utilization and productivity over the 4 weeks following study entry. The SAQs used for IO-HAT were similar to those used in the global HAT study with modifications to collect additional data on variables such as comorbidities, type of diabetes treatment used, loss of productivity, and quality of life. Paired responses to the Part 1 and Part 2 SAQs were used to estimate any differences in reporting of hypoglycemia between the retrospective and prospective periods.

Hypoglycemia classification

Severe hypoglycemia was defined as a hypoglycaemic event requiring third party assistance, which is consistent with the American Diabetes Association (ADA) definition (13).

Non-severe hypoglycemia was defined as an episode managed by the patient alone.

Any hypoglycemic event was defined as the sum of severe and non-severe hypoglycemia.

Nocturnal hypoglycemia was defined as hypoglycemia occurring between midnight and 06:00 h.

A combined measure of any hypoglycemia (based on the sum of all hypoglycaemic events) was derived from both the patient diary and SAQ entries.

Hypoglycemia awareness

Hypoglycemia awareness (as defined by Pedersen (14) and as per protocol definition) was evaluated using the responses to the question: “How often do you have symptoms when you have a low blood sugar measurement?” and where the response “always” or “usually” denoted ‘normal’ hypoglycemia awareness, “occasionally” denoted ‘impaired’ awareness, and “never” denoted ‘severely impaired’ awareness.

Statistical analysis

All statistical tests were two-sided and regarded as exploratory. Statistical significance was set at $p < 0.05$ and no adjustments were made for multiple comparisons. The percentage of patients experiencing at least one hypoglycaemic event during the observation period was calculated together with the 95% confidence interval (CI) for this percentage. Binomial distribution was assumed. Data are presented as mean (SD) unless otherwise stated.

Ethical considerations

The study protocol and assessments were conducted according to the Declaration of Helsinki and the International Conference on Harmonisation Good Clinical Practice Guidelines. The protocol was approved by independent ethics committees or institutional review boards before the start of the study. Signed informed consent was obtained from each patient before any study-related activities. All study materials were translated into Spanish and the data obtained were translated back into English for analysis.

Results

Patient characteristics

In the Colombian cohort, 664 patients completed the SAQ, Part 1, and were included in the full analysis set; 657 patients completed SAQ, Part 2, and were included in the completers analysis set; 653 patients completed patient diaries. Of the 664 patients completing the SAQ, Part 1, 213 had T₁D and 451 had T₂D. Patient characteristics are shown in table 1. Overall, 35.3% of patients were male. Patients with T₂D were older than those with T₁D (mean age, 63.2 years vs. 36.0 years, respectively). The duration of diabetes was longer in patients with T₁D than T₂D (17.2 years vs. 14.4 years). At baseline, patients with T₁D had better levels of glycemic control than patients with T₂D (HbA_{1c} 7.7% in T₁D and 8.4% in T₂D).

Hypoglycemia

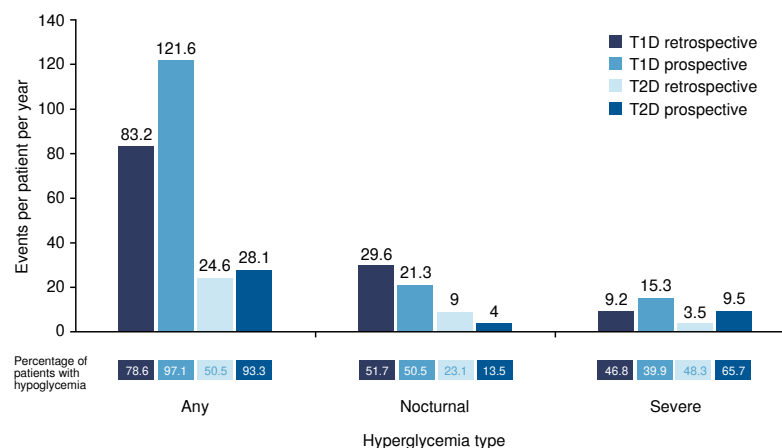
Nearly all patients experienced at least one hypoglycaemic event in the 4-week prospective observation period (97.1% of patients with T₁D and 93.3% of those with T₂D). The proportion of patients reporting a hypoglycaemic event in the prospective and retrospective periods is shown in figure 1. Hypoglycaemic rates (estimated number of events per patient-year [PPY]) of any and severe hypoglycemia were higher in the prospective period than in the retrospective period (figure 1).

Table 1. Characteristics of the patient population

Number of patients who completed part 2 of SAQ, n (%)	211 (99.1)	446 (98.9)
Sex: male/female, %	32.9/65.7	37.7/61.4
Age, years	36.0 (13.6)	63.2 (10.9)
BMI (kg/m ²)	24.7 (3.8)	28.4 (4.9)
Duration of diabetes, years	17.2 (10.1)	14.4 (8.7)
Duration of insulin use, years	16.1 (10.1)	6.8 (5.9)
HbA1c, %*	7.7 (1.4)	8.4 (1.8)
FBG, mg/dl	154.8 (64.8)	136.8 (50.4)
PPG, mg/dl	153.0 (77.4)	180.0 (72.0)
Previous medical illnesses, n (%*)		
Neuropathy	43 (20.2)	194 (43.0)
Retinopathy	47 (22.1)	181 (40.1)
Peripheral vascular disease	11 (5.2)	97 (21.5)
Nephropathy	41 (19.2)	131 (29.0)
Myocardial infarction	5 (2.3)	58 (12.9)
Angina	5 (2.3)	44 (9.8)
None}	122 (57.3)	124 (27.5)
Method of diabetes treatment, n (%)		
Short-acting insulin	97 (45.5)	15 (3.3)
Long-acting insulin	8 (3.8)	173 (38.4)
Pre-mix	0	4 (0.9)
Both short and long acting	105 (49.3)	250 (55.4)
Both short acting and pre-mix	0	5 (1.1)
Both long acting and pre-mix	1 (0.5)	3 (0.7)
Short and long acting and pre-mix	0	0
Missing	2 (0.9)	1 (0.2)
Use of insulin pump, n (%)		
Yes	97 (45.5)	17 (3.8)
No	112 (52.6)	434 (96.2)
Other	4 (1.9)	0 (0)
Checks blood sugar levels, n (%)		
Yes	207 (97.2)	434 (96.2)
No	4 (1.9)	12 (2.7)
Not sure	1 (0.5)	4 (0.9)

BMI: body mass index; FBG: fasting blood glucose; n: total number of subjects participating; PPG: postprandial glucose; SAQ: self-assessment questionnaire; SD: standard deviation; T1D: type 1 diabetes; T2D: type 2 diabetes
Data expressed as mean (SD) unless otherwise stated.

* Percentages based on number of patients with evaluable data



T₁D: type 1 diabetes; T₂D: type 2 diabetes

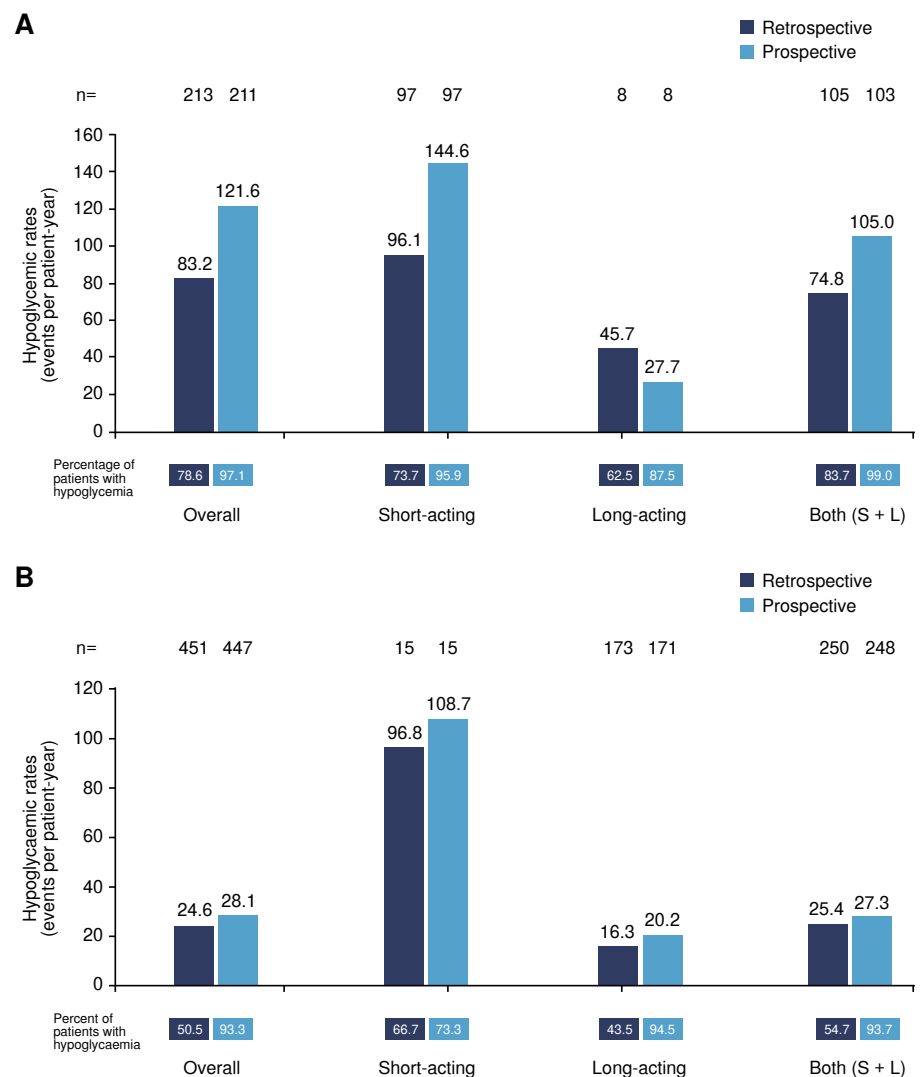
* Retrospective data based on a 6-month period and prospective data based on a 4-week period

Figure 1. Self-reported hypoglycemia rates

The estimated incidence rate ratio (RR) for any hypoglycemia in the prospective and retrospective periods was 1.46 ($p < 0.001$) for T₁D and 1.14 ($p = 0.127$) for T₂D. The proportion of patients reporting nocturnal hypoglycemia was higher retrospectively than prospectively in patients with T₁D (51.7% vs. 50.5%) and T₂D (23.1% vs. 13.5%). Nocturnal hypoglycemia rates were higher retrospectively in patients with T₁D (29.6 events PPY vs. 21.3 events PPY, RR=0.72; $p = 0.036$) and T₂D (9.0 events PPY vs. 4.0 events PPY, RR=0.43; $p < 0.001$). The proportion of patients who defined hypoglycemia by using both blood glucose measurement and symptoms was 49.3% in T₁D and 30.6% in T₂D.

Hypoglycemia incidence by insulin regimen

The incidence rates for any hypoglycemia by insulin regimen are shown in figure 2A and B.



S+L: short-acting and long-acting insulin; T₁D: type 1 diabetes; T₂D: type 2 diabetes
 * Data based on a 4-week period for both retrospective and prospective analyses

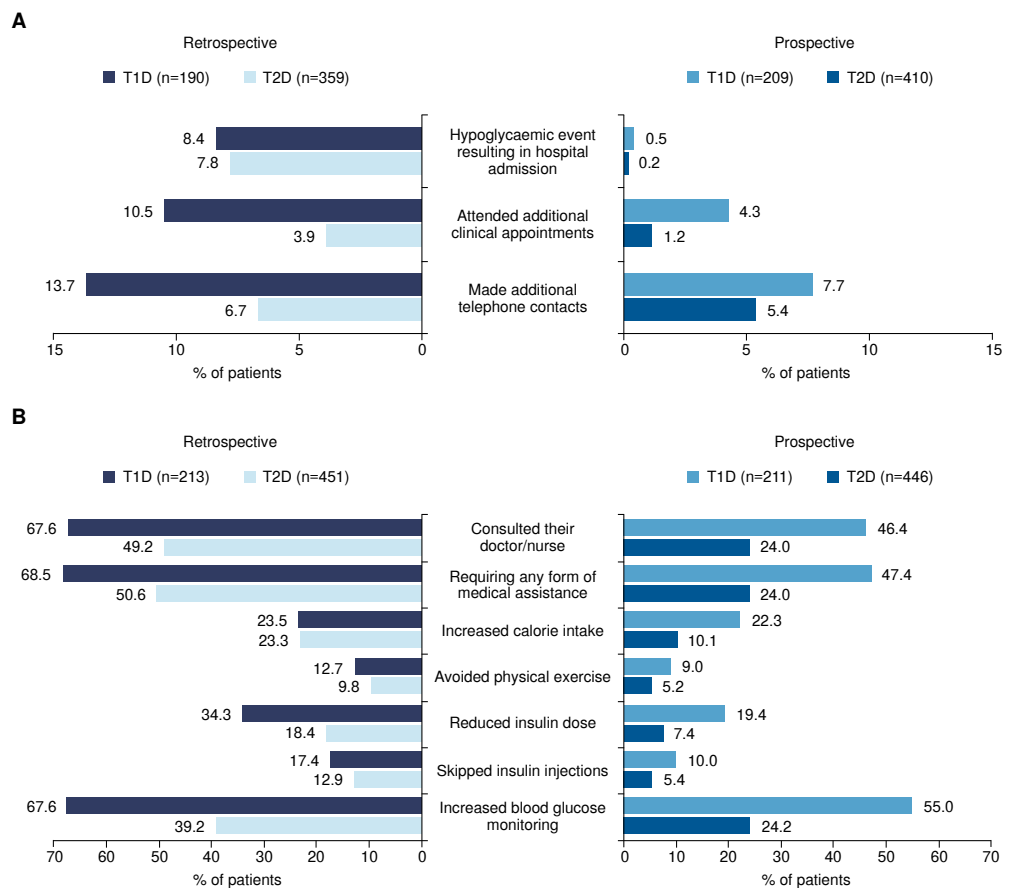
Figure 2. Estimated rate of (A) any hypoglycaemic event in T₁D and (B), any hypoglycaemic event in T₂D by insulin regimen

Healthcare utilization

Healthcare utilization as a result of hypoglycemia in the 6-month retrospective and 4-week prospective period is shown in figure 3A. Healthcare utilization was higher in the retrospective period than in the prospective period both in patients with T₁D and T₂D. In the prospective period, healthcare utilization (admission to hospital, additional clinic appointments, and telephone contact as a result of hypoglycemic episodes) was higher in patients with T₁D than T₂D.

Patient knowledge and behaviors

More patients with T₁D than T₂D indicated they had knowledge of hypoglycemia before reading the definition in the Part 1, SAQ (97.5% vs. 78.7%, respectively). The proportion of patients who measured blood sugar to determine hypoglycemia but provided values that were inconsistent with standard definitions (≤ 3.9 mmol/L or ≤ 70 mg/dL) was higher in patients with T₂D (12.9%) than those with T₁D (4.9%). Patients with T₁D had more hypoglycemia awareness than patients with T₂D. Normal awareness was reported in 60.1% (T₁D) vs. 32.4% (T₂D) of patients, impaired awareness was reported by 37.6% (T₁D) vs. 50.8% (T₂D) and severely impaired awareness by 2.3% (T₁D) vs. 12.0% (T₂D).



T₁D: type 1 diabetes; T₂D: type 2 diabetes

* Retrospective data based on a 6-month period and prospective data based on a 4-week period. Bars represent the proportion of patients who answered 'yes'.

Figure 3. (A) Healthcare utilization as a result of hypoglycemia. **(B)** Patient actions resulting from hypoglycemia in the retrospective and prospective periods

Patient actions as a result of hypoglycemia are shown in figure 3B. Patients with T₁D were more likely than those with T₂D to increase their blood glucose monitoring following a hypoglycaemic episode. With respect to fear of hypoglycemia, there were no notable differences between patients with T₁D [mean (SD) score, 6.9 (2.98)] and T₂D [mean (SD) score, 6.2 (3.28)].

Discussion

The prevalence of diabetes in Colombia is approximately 9.6% and this is estimated to rise to 12.9% by 2040 (2). Diabetes is the fifth leading cause of mortality in the country and the disease is also associated with high morbidity (15). Incidence of hypoglycemia is high in the Latin America region; the GAPP2 survey estimated that 31% of patients with diabetes in Argentina experienced at least one hypoglycaemic event in the previous 30 days (9), whilst the Brazilian cohort of the HAT study reported 91.7% of patients with T₁D and 61.8% of patients with T₂D had experienced at least one hypoglycaemic event during the 4-week prospective observation period of the study (10).

In the current study, patients reported higher rates of overall and severe hypoglycemia during the prospective period. The difference in rates between the two periods may be a result of recall bias as patient diaries were provided to assist recall and record hypoglycaemic events during the prospective period whilst the retrospective data were based on the SAQ. In contrast, patients reported higher nocturnal rates of hypoglycemia in the retrospective period. It is possible that the definition of nocturnal hypoglycemia (between midnight and 06:00 h) may have been adhered to more strictly during the prospective period than the retrospective period. Patients may also have reported more episodes of nocturnal hypoglycemia retrospectively owing to recall bias and the belief that these events occur more frequently than they do. Furthermore, nocturnal hypoglycemia may be underreported as the patient diaries may be more difficult to complete at night than during the day. Overall, the results of our study suggest that the incidence of hypoglycemia may be underreported.

The incidence of hypoglycemia (all, nocturnal, and severe) in Colombian patients was high compared with the IO-HAT overall results (Emral, *et al.*, in progress). It should be noted that Colombia is the only country which specifically categorized patients with T₁D or T₂D using insulin pumps. The high incidence of hypoglycemia in this cohort may be primarily driven by the use of insulin pumps with integrated continuous glucose monitoring, as patients are able to see their glucose readings constantly and, therefore, notice and report more hypoglycemia. Besides, as readings from pumps are not 100% accurate, the possibility of falsely low value (even though the patient is euglycemic) cannot be ruled out (16).

Colombia has one of the highest prevalence of adults with diabetes in South and Central America (17). Poor glycaemic control, defined as HbA_{1c} >7%, is a strong predictor of complications that result in increased resource usage within the region. One study assessing the quality of diabetic care in Colombia reported that only 42.9% of patients had HbA_{1c} levels ≤7%, whilst 21.1% of patients had HbA_{1c} >9% (18). Mean HbA_{1c} levels in the current study were >7% at baseline indicating poor glycaemic control. No association between HbA_{1c} and hypoglycemia was identified in the current study, which suggests that hypoglycemia is common at all levels of glycaemic control.

Hypoglycemia influences treatment compliance, which can result in an increase in complications due to lack of disease control as a result of modifying the insulin dose in response to hypoglycemia. In a 7-year study evaluating consistency in using diabetic medications in a Mexican American population, inconsistent use of medication was associated with an increased risk in kidney problems and death (19).

Patient actions as a result of hypoglycemia lead to an increase in the use of healthcare resources and the health economic burden (6). In particular, severe hypoglycaemic events often result in emergency/ambulance calls and hospital treatment, thereby incurring in substantial healthcare costs (20). The proportion of patients seeking medical advice or requiring hospitalization as a result of hypoglycemia was lower during the prospective period of the IO-HAT Colombian study, which may be explained by increased patient knowledge as a result of having participated in the study.

Our results suggest that increasing patient knowledge of hypoglycemia may reduce its impact on the healthcare system and enable patients to meet their individual treatment goals more effectively. Furthermore, the results of this study highlight the need for patient education regarding hypoglycemia and for actively promoting hypoglycaemic control in clinical practice.

As with any observational study, there are strengths and limitations to IO-HAT. Limitations include the short follow-up period of the study and the possibility of bias since hypoglycemia is self-reported by the patient based on patient recall of information, which may be less accurate for the retrospective period. However, this is also a strength of the study, as self-reporting captures information such as missed blood glucose tests or unawareness of the threshold at which blood glucose concentrations represent a hypoglycaemic event. In addition, the observational nature of the study means that the results reflect real-life practice.

Insulin is the mainstay of diabetes treatment, however, hypoglycemia remains a major obstacle in achieving good glycaemic control and fear of hypoglycemia can limit treatment intensification as a result of the patient's unwillingness to take medication. New technologies, in particular the new generation longer-acting basal insulins have been shown to have significantly more predictable glucose-lowering effects and may help to lower the risk of hypoglycemia without compromising efficacy (21).

In conclusion, these results are the first patient-reported dataset on hypoglycemia in Colombia. Patients reported higher rates of hypoglycemia (any and severe) during the prospective period. This could be a result of recall bias during the retrospective study period or of increased patient knowledge on hypoglycemia due to their participation in the study. The results of our study are in line with the overall data from the IO-HAT study and indicate that hypoglycemia is underreported and, therefore, underestimated.

Acknowledgements

The authors acknowledge medical writing and submission support provided by Dr. Angela Majid and Richard McDonald of Watermeadow Medical, an Ashfield company part of UDG Healthcare plc funded by Novo Nordisk.

References

1. Aschner P. Epidemiología de la diabetes en Colombia. *Avances en Diabetología*. 2010;26:95-100. [https://doi.org/10.1016/S1134-3230\(10\)62005-4](https://doi.org/10.1016/S1134-3230(10)62005-4)
2. Federation ID. IDF Diabetes Atlas. 7th edition. 2016. Accessed on: April 1, 2016. Available at: <http://www.diabetesatlas.org>
3. Barnett AH, Craddock S, Fisher M, Hall G, Hughes E, Middleton A. Key considerations around the risks and consequences of hypoglycemia in people with type 2 diabetes. *Int J Clin Pract*. 2010;64:1121-9. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2009.02332.x>
4. Davis RE, Morrissey M, Peters JR, Wittrup-Jensen K, Kennedy-Martin T, Currie CJ. Impact of hypoglycemia on quality of life and productivity in type 1 and type 2 diabetes. *Curr Med Res Opin*. 2005;21:1477-83. <https://doi.org/10.1185/030079905x61929>
5. Bonds DE, Miller ME, Bergenstal RM, Buse JB, Byington RP, Cutler JA, *et al*. The association between symptomatic, severe hypoglycemia and mortality in type 2 diabetes: Retrospective epidemiological analysis of the ACCORD study. *BMJ*. 2010;340:b4909. <https://doi.org/10.1136/bmj.b4909>
6. Brod M, Wolden M, Christensen T, Bushnell DM. Understanding the economic burden of nonsevere nocturnal hypoglycemic events: Impact on work productivity, disease management, and resource utilization. *Value Health*. 2013;16:1140-9. <https://doi.org/10.1016/j.jval.2013.09.002>
7. Elliott L, Fidler C, Ditchfield A, Stissing T. Hypoglycemia event rates: A comparison between real-world data and randomized controlled trial populations in insulin-treated diabetes. *Diabetes Ther*. 2016;7:45-60. <https://doi.org/10.1007/s13300-016-0157-z>
8. Khunti K, Alsifri S, Aronson R, Cigrovski Berkovic M, Enters-Weijnen C, Forsen T, *et al*. Rates and predictors of hypoglycemia in 27 585 people from 24 countries with insulin-treated type 1 and type 2 diabetes: The global HAT study. *Diabetes Obes Metab*. 2016;18:907-15. <https://doi.org/10.1111/dom.12689>
9. Brod M, Galstyan G, Unnikrishnan AG, Harman-Boehm I, Prusty V, Lavalle F, *et al*. Self-treated hypoglycemia in type 2 diabetes mellitus: Results from the second wave of an international cross-sectional survey. *Diabetes Ther*. 2016;7:279-93. <https://doi.org/10.1007/s13300-016-0164-0>
10. Lamounier RN, Geloneze B, Oliveira Leite S, Montenegro Jr. R, Zajdenverg L, Fernandes M, *et al*. Hypoglycemia incidence and awareness among insulin-treated patients with diabetes: The HAT study in Brazil. *Diabetol Metab Syndr*. 2018;10:83. <https://doi.org/10.1186/s13098-018-0379-5>
11. World Medical Association. Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2013;310:2191-4. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>
12. International Society for Pharmacoepidemiology. Guidelines for good pharmacoepidemiology practices (GPP). *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2008;17:200-8. <https://doi.org/10.1002/pds.1471>
13. American Diabetes Association. Defining and reporting hypoglycemia in diabetes: A report from the American Diabetes Association Workgroup on Hypoglycemia. *Diabetes Care*. 2005;28:1245-9.
14. Pedersen-Bjergaard U, Pramming S, Thorsteinsson B. Recall of severe hypoglycaemia and self-estimated state of awareness in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2003;19:232-40. <https://doi.org/10.1002/dmrr.377>
15. Vargas-Uricoechea H, Casas-Figueroa LA. An epidemiologic analysis of diabetes in Colombia. *Ann Glob Health*. 2015;81:742-53. <https://doi.org/10.1016/j.aogh.2015.11.001>
16. Gómez AM, Marín-Sánchez A, Muñoz OM, Colón-Peña CA. Numerical and clinical precision of continuous glucose monitoring in Colombian patients treated with insulin infusion pump with automated suspension in hypoglycemia. *Endocrinol Nutr*. 2015;62:485-92. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2015.06.012>
17. Aschner P, Aguilar-Salinas C, Aguirre L, Franco L, Gagliardino JJ, de Lapertosa SG, *et al*. Diabetes in South and Central America: An update. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;103:238-43. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.11.010>
18. Machado-Alba JE, Moncada-Escobar JC, Gaviria H. Quality and effectiveness of diabetes care for a group of patients in Colombia. *Rev Panam Salud Pública*. 2009;26:529-35.

19. Kuo YF, Raji MA, Markides KS, Ray LA, Espino DV, Goodwin JS. Inconsistent use of diabetes medications, diabetes complications, and mortality in older mexican americans over a 7-year period: Data from the Hispanic established population for the epidemiologic study of the elderly. *Diabetes Care*. 2003;26:3054-60. <https://doi.org/10.2337/diacare.26.11.3054>
20. Heller SR, Frier BM, Hersløv ML, Gundgaard J, Gough SC. Severe hypoglycaemia in adults with insulin-treated diabetes: Impact on healthcare resources. *Diabetic Med*. 2016;33:471-7. <https://doi.org/10.1111/dme.12844>
21. Heise T, Hermanski L, Nosek L, Feldman A, Rasmussen S, Haahr H. Insulin degludec: Four times lower pharmacodynamic variability than insulin glargine under steady-state conditions in type 1 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2012;14:859-64. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2012.01627.x>

Comunicación breve

Síntomas subagudos y crónicos de la fiebre de chikungunya en un grupo de personas adultas en Ibagué, Colombia

Juan Sebastián Sánchez, Ana María Cañón, Jadith Cristina Lombo

Programa de Enfermería, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia

Introducción. La fiebre de chikungunya en Colombia ocasiona una alerta en salud pública que se extiende en el tiempo, dadas las características subagudas y crónicas de la enfermedad.

Objetivo. Describir los síntomas subagudos y crónicos en personas mayores de 18 años con fiebre de chikungunya en Ibagué, Colombia.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio descriptivo con muestreo en bola de nieve de 368 adultos de todas las comunas de Ibagué que presentaban síntomas de la fiebre de chikungunya de más de 12 días de duración.

Resultados. Las articulaciones que presentaban dolor en la fase subaguda y crónica de la enfermedad fueron las de manos (84,2 %), rodillas (72,8 %) y tobillos (69,3 %); además de las articulaciones, la planta de los pies fue el sitio en que más frecuentemente se presentó dolor (48,8 %). El dolor articular en manos ($p=0,017$) y tobillos ($p=0,001$) y el dolor en la planta de los pies ($p=0,002$) fueron significativos en las mujeres. La fatiga o el cansancio generalizado se presentaron en el 58,9 % de las personas y se prolongó por más de un año en el 2,4 % de ellas.

Conclusiones. Los síntomas de la fase subaguda y crónica de la fiebre de chikungunya coincidieron con los descritos en la literatura médica, su duración se extendió hasta por un año o más en algunos de los casos y su intensidad disminuyó con el tiempo. Los síntomas referidos fueron más comunes en las mujeres que en los hombres.

Palabras clave: *Aedes*; fiebre de chikungunya/epidemiología; signos y síntomas; artralgia; Colombia.

Subacute and chronic symptoms of chikungunya fever in a group of adults in Colombia

Introduction: In Colombia, chikungunya fever creates a warning in public health that extends over time given the subacute and chronic characteristics of the disease.

Objective: To describe subacute and chronic symptoms in adult people who suffered chikungunya fever in the city of Ibagué, Colombia.

Materials and methods: We conducted a descriptive study with snowball sampling in 368 adults from all the communes of Ibagué, Colombia, who had symptoms of chikungunya fever spanning for more than 12 days.

Results: The joints that showed the greatest pain in the subacute and chronic phase of the disease were the hands with 84.2%, knees with 72.8%, and ankles with 69.3%. The soles of the feet were the non-articular areas with greater frequency of pain (48.8%). Joint pain in the hands ($p=0.017$) and ankles ($p=0.001$) and pain in the soles of the feet ($p=0.002$) were significant in women. General fatigue occurred in 58.9% of the subjects and in 2.4% of the population, it lasted for more than a year.

Conclusions: The symptoms of the subacute and chronic phase of chikungunya fever were the same reported in the literature, they lasted up to a year or more, and decreased in intensity over time. The referred symptoms were more common in women than in men.

Keywords: *Aedes*; chikungunya fever/epidemiology; signs and symptoms; arthralgia; Colombia.

La fiebre de chikungunya es una enfermedad viral que se transmite al ser humano por los zancudos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. El virus chikungunya es un virus ARN del género *Alfavirus*, familia *Togaviridae*, que históricamente ha generado brotes de grandes proporciones en África, Asia y Europa, por lo que desde el 2010 se consideró que podía producir una epidemia emergente (1).

Entre el 2014 y el 2016, el Instituto Nacional de Salud de Colombia reportó un total de 484.684 personas con fiebre de chikungunya, de las cuales 479.817 fueron confirmadas por clínica y 4.867 por laboratorio (2,3). Desde la semana epidemiológica 01 del 2015 a la 26 del 2016, se reportaron

Recibido: 10/02/18
Aceptado: 19/02/19
Publicado: 19/02/19

Citación:

Sánchez JS, Cañón AM, Lombo JC. Síntomas subagudos y crónicos de la fiebre de chikungunya en un grupo de personas adultas en Ibagué, Colombia. *Biomédica*. 2019;39:587-94. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4350>

Correspondencia:

Jadith Cristina Lombo, Programa de Enfermería, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Tolima, Barrio Santa Helena Parte Alta, Ibagué, Colombia
Teléfono: (578) 277 1212
jlomboc@ut.edu.co

Contribución de los autores:

Todos los autores participaron en las diferentes etapas del estudio.

Financiación:

El desarrollo de este estudio contó con el apoyo económico de la Universidad del Tolima.

Conflicto de intereses:

Los autores manifiestan no tener ningún conflicto de intereses.

en Ibagué 12.317 personas con fiebre de chikungunya, de las cuales 12.223 fueron confirmadas por clínica y 94 por laboratorio (4,5).

La fiebre de chikungunya se caracteriza por la aparición súbita de fiebre, generalmente acompañada de dolores articulares. Otros signos y síntomas frecuentes son los dolores musculares y de cabeza, las náuseas, el cansancio y las erupciones cutáneas. Los dolores articulares suelen ser muy debilitantes, pero generalmente desaparecen en pocos días. A menudo las personas infectadas con el virus solo presentan sintomatología leve sin mayores complicaciones; entre el 3 y el 28 % de los casos son asintomáticos, pero contribuyen a la propagación de la enfermedad.

En los pacientes sintomáticos, la enfermedad atraviesa por tres fases: aguda, subaguda y crónica. La fase aguda dura entre 3 y 12 días y se caracteriza por presentar un pico febril de más de 39 °C, es de comienzo súbito y produce artralgias intensas; pueden presentarse cefaleas, mialgias, fatiga, náuseas, vómito y conjuntivitis. Los síntomas relacionados con el sistema osteomuscular son simétricos en manos y pies, y se acompañan de inflamación. Con la disminución de la fiebre, a los dos o tres días, se observa exantema máculo-papular en tronco y extremidades. La fase subaguda tiene una duración de 12 a 90 días y se caracteriza por la continuidad de los síntomas; en algunos pacientes hay exacerbación del dolor articular, tenosinovitis de muñecas y tobillos y fatiga. La fase crónica se caracteriza por síntomas que han persistido durante más de tres meses y pueden prolongarse hasta por un año o más. Esta fase es más frecuente en los grupos de riesgo, como quienes están en los extremos de la edad, y aquellos que sufren enfermedades de base (6-7).

En diversos estudios en los países africanos, en India y en Asia (8-9), el curso clínico de la fase aguda de la fiebre de chikungunya ha sido bien establecido y, después de terminada esta fase, en las fases subaguda y crónica, la evolución de la enfermedad se caracteriza por artralgia y artritis reumatoide persistentes, respectivamente. En dichos estudios, se plantea la necesidad de caracterizar más ampliamente los síntomas posteriores a la fase aguda, pues se ha encontrado que los pacientes mejoran en forma adecuada con los analgésicos habituales, posiblemente porque el neurotropismo del virus del chikungunya hace que el dolor sea, no solo nociceptivo, sino también neuropático.

Dado que los síndromes de dolor neuropático requieren un tratamiento específico, sería necesario caracterizarlos mejor, incluida la detección de las características neuropáticas mediante medios clínicos fáciles de usar, pues ello podría contribuir a mejorar significativamente los resultados del tratamiento. En este contexto, en el presente estudio se planteó describir los síntomas subagudos y crónicos en personas mayores de 18 años con fiebre de chikungunya en Ibagué.

Materiales y métodos

Se hizo un estudio descriptivo observacional en una población de 4.646 personas con diagnóstico clínico de fiebre de chikungunya atendidas en instituciones de salud públicas y privadas de Ibagué durante la semana epidemiológica 17 del 2015. Se calculó una muestra de 355 a 391 sujetos en Epidat con el intervalo de confianza (IC) de 95 % establecido para encuestas transversales en poblaciones finitas.

Después de aplicar los criterios de inclusión, se logró recolectar la información de 368 pacientes seleccionados mediante un muestreo en bola de nieve por conveniencia; en ninguna de las bases de datos se había discriminado el diagnóstico según fase subaguda y crónica, ya que las personas suelen consultar a los servicios de salud durante la fase aguda de la enfermedad, y no en las fases subaguda y crónica.

Los criterios de inclusión del estudio fueron: haber presentado síntomas relacionados con la fiebre de chikungunya durante 12 días o más, estar en la fase subaguda o en la crónica; haber presentado durante la fase aguda tres de los cuatro signos y síntomas característicos de la fiebre de chikungunya descritos en la literatura médica (fiebre mayor o igual a 39 °C, dolor articular muy intenso, inflamación en manos o pies y exantema maculopapular en tronco o extremidades) y, por último, tener 18 años de edad o más.

Teniendo en cuenta que Ibagué es un lugar endémico para dengue y zika, cuyas sintomatologías son similares a la de la fiebre de chikungunya, se establecieron los siguientes criterios de exclusión: haber presentado dolor retroocular o abdominal (síntomas característicos del dengue) o conjuntivitis (síntoma característico del zika).

La información se recolectó mediante una entrevista semiestructurada y ajustada después de la prueba piloto. Se incluyeron los datos sociodemográficos, los síntomas manifestados en las fases de la enfermedad, y el dolor evaluado mediante la escala análoga de dolor (10) con base en los criterios de la *International Association for the Study of Pain* (IASP) y de múltiples estudios que han reportado el dolor neuropático en la fiebre de chikungunya (8,11-12).

Consideraciones éticas

Se tuvieron en cuenta los principios de la Declaración de Helsinki y la Resolución 8430 de 1993 expedida por el Ministerio de Salud de Colombia, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Cada paciente dio su consentimiento por escrito para participar en el estudio y los investigadores garantizaron la confidencialidad de los datos con el anonimato de la identificación según las normas del *habeas data*.

Resultados

El 29,9 % de la muestra correspondía a hombres y el 70,1 % a mujeres; la edad media fue de 39,7 años con un rango de 18 a 80 años. El dolor articular se presentó en el 100 % de los casos, la fiebre de 39 °C o más, en el 98,1 %, el exantema máculo-papular, en el 88,6 %, y la inflamación de manos y pies, en el 85,3 % de la población estudiada. El dolor más prevalente fue el articular en las manos (84 %), seguido por el dolor en rodillas (72,8 %) y tobillos (69,3 %) (cuadro 1). El 44 % de los pacientes también manifestaron experimentar dolor en la planta de los pies, y 18,2 % en los músculos de los brazos y en la cabeza (cuadro 1).

Los dolores se presentaron en las dos fases, aunque más en la fase subaguda que en la crónica, observándose una tendencia lineal descendente (cuadro 2). Los dolores articulares del tronco superior (manos, codos, hombros) fueron predominantes en la fase subaguda y, los del tronco inferior, las rodillas, los tobillos y otras articulaciones, en la fase crónica ($p > 0,05$) (cuadro 1). El dolor de cabeza y los dolores musculares predominaron en la fase aguda, con una

diferencia significativa ($p < 0,05$) frente a la crónica, aunque sin diferencias según su ubicación en los músculos del tronco inferior o superior.

El dolor neuropático punzante predominó más en las articulaciones, especialmente las de los hombros (73,7 %). El dolor descrito como una sensación de hormigueo fue el segundo en frecuencia en la mayoría de las articulaciones, principalmente las de las manos (21,9 %). La percepción del dolor articular medido con la escala análoga numérica fluctuó entre 7 y 8, con excepción del dolor en la cadera, presente en 35,5 % de las personas, con una puntuación entre 5 y 6. Las articulaciones con mayor calificación del dolor (9 a 10) fueron las rodillas y los tobillos (cuadro 2).

En los sitios anatómicos no articulares, el dolor localizado fue el más común, con el porcentaje más alto (78,5 %) para el dolor plantar, en tanto que el más bajo (55,2 %) se presentó en los músculos de los brazos. La población manifestó haber experimentado dolor muscular continuo en el 73,9 % de los sitios anatómicos estudiados.

El dolor neuropático punzante fue el más frecuente: en la cabeza, se presentó en el 77,6 % de los casos y, en las plantas de los pies, en el 63,2 % de las personas. El dolor neuropático quemante fue el segundo más frecuente en todos los sitios, siendo el muscular en otro sitio el más percibido

Cuadro 1. Distribución de la población según la duración del dolor en cada sitio anatómico

Dolor		Fases					Total	χ^2
		Subaguda		Crónica				
		>12 días <3 meses	≥ 3 meses <6 meses	≥ 6 meses <9 meses	≥ 9 meses <12 meses	≥ 12 meses		
Articular en manos	n	165	89	29	17	10	310	0,1356
	%	44,8	24,2	7,9	4,6	2,7	84,2	
Articular en codos	n	61	29	10	6	6	112	0,0036
	%	16,6	7,9	2,7	1,6	1,6	30,4	
Articular en hombros	n	65	30	8	5	6	114	0,1031
	%	17,7	8,2	2,2	1,4	1,6	31	
Articular en cadera	n	65	17	5	5	2	94	0,0001
	%	17,7	4,6	1,4	1,4	0,5	25,5	
Articular en rodillas	n	131	75	31	17	14	268	0,645
	%	35,6	20,4	8,4	4,6	3,8	72,8	
Articular en tobillos	n	122	72	36	13	12	255	0,394
	%	33,2	19,6	9,8	3,5	3,3	69,3	
Otras articulaciones	n	15	11	1	6	0	33	0,5931
	%	4,1	3	0,3	1,6	0	9	
Cabeza	n	47	14	6	0	0	67	0,0005
	%	12,8	3,8	1,6	0	0	18,2	
Muscular en brazos	n	41	14	7	3	2	67	0,0523
	%	11,1	3,8	1,9	0,8	0,5	18,2	
Muscular en espalda	n	27	6	4	2	0	39	0,0126
	%	7,3	1,6	1,1	0,5	0	10,6	
Muscular en muslos	n	43	10	4	3	1	61	0,0008
	%	11,7	2,7	1,1	0,8	0,3	16,6	
Muscular en piernas	n	39	17	6	3	0	65	0,09
	%	10,6	4,6	1,6	0,8	0	17,7	
Muscular en otro	n	17	2	2	2	0	23	0,0198
	%	4,6	0,5	0,5	0,5	0	6,3	
Planta de los pies	n	90	28	24	13	8	163	0,1313
	%	24,5	7,6	6,5	3,5	2,2	44,3	
Fatiga o cansancio generalizado	n	132	46	17	9	9	216	0,0000
	%	35,9	12,5	4,6	2,4	2,4	58,6	

Cuadro 2. Caracterización del dolor en articulaciones y otros sitios anatómicos

Dolor	Caracterización del dolor																	
	Localización			Curso			Neuropático				Intensidad del dolor de 1 a 10					Total		
	Localizado	Difuso	Total	Continuo	Discontinuo	Total	Hormigueo	Punzante	Quemante	Otro	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10			
Articular en manos	n 256	54	310	148	162	310	68	191	26	25	310	16	46	90	112	46	310	
	% 82,6	17,4	100	47,7	52,3	100	21,9	61,6	8,4	8,1	100	5,2	14,8	29	36,1	14,8	100	
Articular en codos	n 95	17	112	58	54	112	18	76	9	9	112	8	13	36	43	12	112	
	% 84,8	15,2	100	51,8	48,2	100	16,1	67,9	8	8	100	7,1	11,6	32,1	38,4	10,7	100	
Articular en hombros	n 85	29	114	67	47	114	9	84	8	13	114	6	18	40	39	11	114	
	% 74,6	25,4	100	58,8	41,2	100	7,9	73,7	7	11,4	100	5,3	15,8	35,1	34,2	9,6	100	
Articular en cadera	n 54	40	94	52	42	94	11	64	8	11	94	3	11	31	34	15	94	
	% 57,4	42,6	100	55,3	44,7	100	11,7	68,1	8,5	11,7	100	3,2	11,7	33	36,2	16	100	
Articular en rodillas	n 228	40	268	123	145	268	22	195	24	27	268	9	29	74	106	50	268	
	% 85,1	14,9	100	45,9	54,1	100	8,2	72,8	9	10,1	100	3,4	10,8	27,6	39,6	18,7	100	
Articular en tobillos	n 217	38	255	119	136	255	27	186	18	24	255	7	29	77	97	45	255	
	% 85,1	14,9	100	46,7	53,3	100	10,6	72,9	7,1	9,4	100	2,7	11,4	30,2	38	17,6	100	
Cabeza	n 39	28	67	20	47	67	5	52	6	4	67	3	10	20	22	12	67	
	% 58,2	41,8	100	29,9	70,1	100	7,5	77,6	9	6	100	4,5	14,9	29,9	32,8	17,9	100	
Muscular en brazos	n 37	30	67	40	27	67	9	35	15	8	67	2	14	25	19	7	67	
	% 55,2	44,8	100	59,7	40,3	100	13,4	52,2	22,4	11,9	100	3	20,9	37,3	28,4	10,4	100	
Muscular en espalda	n 22	17	39	25	14	39	2	21	13	3	39	0	8	13	13	5	39	
	% 56,4	43,6	100	64,1	35,9	100	5,1	53,8	33,3	7,7	100	0	20,5	33,3	33,3	12,8	100	
Muscular en muslos	n 33	28	61	37	24	61	4	31	14	12	61	2	11	23	20	5	61	
	% 54,1	45,9	100	60,7	39,3	100	6,6	50,8	23	19,7	100	3,3	18	37,7	32,8	8,2	100	
Muscular en piernas	n 38	27	65	41	24	65	7	32	13	13	65	1	12	27	19	6	65	
	% 58,5	41,5	100	63,1	36,9	100	10,8	49,2	20	20	100	1,5	18,5	41,5	29,2	9,2	100	
Muscular en otro sitio	n 13	10	23	17	6	23	1	9	11	2	23	1	6	8	7	1	23	
	% 56,5	43,5	100	73,9	26,1	100	4,3	39,1	47,8	8,7	100	4,3	26,1	34,8	30,4	4,3	100	
Planta de los pies	n 128	35	163	90	73	163	18	103	28	14	163	6	26	42	62	27	163	
	% 78,5	21,5	100	55,2	44,8	100	11	63,2	17,2	8,6	100	3,7	16	25,8	38	16,6	100	

(47,8 % de los participantes). Por último, el 67,2 % de los participantes puntuó entre 5 y 8 la intensidad del dolor en todos los sitios anatómicos. El porcentaje más alto se presentó para el dolor en los músculos de las piernas, en el 41,5 % de los casos, con una puntuación de 5 a 6 en la mayoría de ellos, seguido por el de la planta de los pies, en un 38 % de las personas, con una puntuación de 7 a 8 (cuadro 2).

El 58,7 % de las personas manifestó experimentar cansancio generalizado por más de 12 días, sobre todo durante la fase subaguda, con un 35,9 %. El dolor articular en manos (p: 0,017), tobillos (p: 0,001) y planta de los pies (p: 0,002), fue significativamente mayor en mujeres que en hombres, pero no hubo diferencias estadísticamente significativas en el dolor muscular según el sexo (cuadro 3).

Discusión

Los principales hallazgos del presente análisis coinciden con los de diversos estudios (14-19): en la muestra hubo un mayor porcentaje de mujeres, aunque en la metodología empleada en este se utilizó un muestreo no probabilístico en bola de nieve; asimismo, los pacientes manifestaron haber experimentado los tres síntomas principales descritos para la fiebre de chikungunya (artralgia, mialgia y astenia) (20).

Por otra parte, las articulaciones más frecuentemente afectadas por el dolor fueron las de las manos (84,2 %), las rodillas (72,8 %) y los tobillos

Cuadro 3. Prevalencia del dolor según tipo, sitio anatómico y sexo de los pacientes

Sitio anatómico	Sexo				Total		χ^2
	Femenino (n=258)		Masculino (n=110)		(n=368)		
	n	Prevalencia	n	%	n	%	p
Cabeza	50	19,4	17	15,5	67	18,2	0,372
Hombro	78	30,2	36	32,7	114	31	0,636
Codo	78	30,2	34	30,9	112	30,4	0,897
Mano	225	87,2	85	77,3	310	84,2	0,017
Cadera	68	26,4	26	23,6	94	25,5	0,584
Rodilla	191	74	77	70	268	72,8	0,426
Tobillo	192	74,4	63	57,3	255	69,3	0,001
Otras articulaciones	26	10,1	7	6,4	33	9	0,254
Espalda	29	11,2	9	8,2	38	10,3	0,377
Músculos del brazo	47	18,2	20	18,2	67	18,2	0,994
Músculos de las piernas	48	18,6	15	13,6	63	17,1	0,247
Muslos	42	16,3	19	17,3	61	16,6	0,814
Otros músculos	16	6,2	7	6,4	23	6,3	0,953
Planta de los pies	127	49,2	35	31,8	162	44	0,002

(69,3 %), lo que coincide con lo reportado en un estudio en el Caribe colombiano (18); después de los sitios anatómicos ya mencionados, la planta de los pies fue el sitio más afectado por el dolor (44 %).

La cronicidad de los síntomas de la fiebre de chikungunya se debe a la conjunción de la reacción autoinmunitaria frente a antígenos virales persistentes y a la presencia crónica del virus (o de sus productos) en las células diana, con la consecuente acumulación local de mediadores inflamatorios; por ejemplo, en macacos experimentalmente infectados por el virus del chikungunya se ha observado la presencia de antígenos virales y de ARN viral en órganos linfoides y tejido sinovial meses después de la fase aguda de la infección (21); pero, aunque se pueden presentar síntomas atribuibles a la fiebre de chikungunya por más de tres meses, la proporción de personas afectadas disminuye con el tiempo (16,18-20), lo que corrobora los resultados del presente estudio, en el cual se pudo constatar que el número de personas con dolor en todos los sitios anatómicos bajo estudio disminuyó con cada trimestre evaluado.

El porcentaje de las personas con dolor discontinuo fue similar al de aquellas con dolor continuo, lo que concuerda con los hallazgos de un estudio en Risaralda (16), en el cual se reportaron síntomas de rigidez matutina en el 60,5 % de los pacientes mayores de 40 años y en el 45,4 % de los menores de 40 años.

Si bien la intensidad del dolor es un aspecto que no depende solamente de la nocicepción, sino también de factores psicológicos y culturales (22), la descrita por los pacientes en este estudio y en el ya mencionado fue similar (16), con una mediana de 6 en la misma escala.

Se encontró que el dolor en manos, tobillos y plantas de los pies, significativamente mayor en las mujeres, se asoció con la frecuencia de poliartralgia crónica después de la fiebre de chikungunya y la presencia de rigidez matinal, también significativamente mayor en mujeres según el estudio en Risaralda (16).

La principal limitación metodológica de este estudio fue no haber determinado como criterio de exclusión los antecedentes de dolor articular o de otro tipo de dolor en los pacientes antes de presentar la fiebre de chikungunya.

Agradecimientos

Al Grupo de Investigación en Cuidado de la Salud de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Tolima. A todos aquellos que contribuyeron con la recolección de información en las diferentes comunas de Ibagué.

Referencias

- Rivera-Ávila RC. Fiebre Chikungunya en México: caso confirmado y apuntes para la respuesta epidemiológica. *Salud Pública Mex.* 2014;56:402-4.
- Instituto Nacional de Salud. Boletín epidemiológico semanal. Semana 52 del 2015. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2015. Fecha de consulta: 27 de abril de 2017. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2015%20Boletin%20epidemiologico%20Semana%2052.pdf>
- Instituto Nacional de Salud. Boletín epidemiológico semanal: semana 52 del 2016. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2016. Fecha de consulta: 27 de abril de 2017. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2016%20Bolet%20C3%ADn%20epidemiol%20C3%B3gico%20semana%2052%20-.pdf>
- Instituto Nacional de Salud. Chikungunya a semana 52 del 2015. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2015. Fecha de consulta: 27 de abril de 2017. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/Noticias/Chikungunya/Resumen%20Chikungu%20C3%B1a%20SEMANA%2052%202015.pdf>
- Instituto Nacional de Salud. Chikungunya a semana 26 del 2016. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2016. Fecha de consulta: 27 de abril de 2017. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/Noticias/Chikungunya/Resumen%20Chikungu%20C3%B1a%20SEMANA%2026%202016.pdf>
- Frías JA. Actualización de aspectos clínicos epidemiológicos de la fiebre Chikungunya 2014. *Rev Sanid Milit Mex.* 2014;68:313-7.
- Organización Panamericana de la Salud-OPS, Centers for Disease Control and Prevention, CDC. Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus Chikungunya en las Américas. Washington, D.C.: OPS; 2011. Fecha de consulta: 29 de junio de 2015. Disponible en: <http://www.binasss.sa.cr/Chikungunya/cdc.pdf>
- de Andrade DC, Jean S, Clavelou P, Dallel R, Bouhassira D. Chronic pain associated with the Chikungunya fever: Long lasting burden of an acute illness. *BMC Infect Dis.* 2010;10:31. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-31>
- Foissac M, Javelle E, Ray S, Guérin B, Simon F. Post-chikungunya rheumatoid arthritis, Saint Martin. *Emerg Infect Dis.* 2015;21:530-2. <https://doi.org/10.3201/eid2103.141397>
- Pardo C, Muñoz T, Chamorro C. Monitorización del dolor: recomendaciones del grupo de trabajo de analgesia y sedación de la SEMICYUC. *Med Intensiva.* 2006;30:379-85.
- Gérardin P, Couderc T, Bintner M, Tournebize P, Renouil M, Lémant J, *et al.* Chikungunya virus-associated encephalitis: A cohort study on La Réunion Island, 2005-2009. *Neurology.* 2016;86:94-102. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002234>
- Wielanek AC, Monredon JD, Amrani ME, Roger JC, Serveaux JP. Guillain-Barré syndrome complicating a chikungunya virus infection. *Neurology.* 2007;69:2105-7. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000277267.07220.88>
- Bouhassira D1, Lantéri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain.* 2008;136:380-7. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.08.013>
- Ochoa-Tapia E, Hernández-Hernández A, Gordillo-Martínez M, Palacios-Stempreiss A. Evaluación clínica y de laboratorio en pacientes sospechosos o confirmados de fiebre de chikungunya. *Atención Familiar.* 2017;24:51-5. <https://doi.org/10.1016/j.af.2017.04.002>
- Méndez N, Baeza-Herrera L, Ojeda-Baranda R, Huchim-Lara O, Gómez-Carro S. Perfil clínico epidemiológico de la infección por chikungunya en casos hospitalarios atendidos en 2015 en Mérida, México. *Rev Panam Salud Pública.* 2017;41:e91.
- Rodríguez-Morales A, Gil-Restrepo A, Ramírez-Jaramillo V, Montoya-Arias C, Acevedo-Mendoza W, Bedoya-Arias J, *et al.* Post-chikungunya chronic inflammatory rheumatism: Results from a retrospective follow-up study of 283 adult and child cases in La Virginia, Risaralda, Colombia. *F1000Res.* 2016;5:360. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8235.2>
- Bouquillard É, Combe B. A report of 21 cases of rheumatoid arthritis following chikungunya fever. A mean follow-up of two years. *Joint Bone Spine.* 2009;76:654-7. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2009.08.005>

18. Jaller-Raad J, Sánchez-Rincones W, Santrich-Martínez A, Sierra-Hernández A, Fonseca-Estrada Y, Parody A, *et al.* Caracterización clínica de sujetos infectados con virus chikungunya en una población del Caribe colombiano. *Rev Col Reumatol.* 2016;23:170-6. <https://doi.org/10.1016/j.rcreu.2016.06.001>
19. Jerez-Solís I, Thompson-Barberena V. Comportamiento clínico de los casos chikungunya confirmados por serología en todas las fases de la enfermedad en el área urbana del municipio de Juigalpa en el periodo enero a junio 2015 Managua: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua; 2015. Fecha de consulta: 17 de julio de 2017. Disponible en: <http://repositorio.unan.edu.ni/1350/1/18357.pdf>
20. Moro M, Grilli E, Corvetta A, Silvi G, Angelini R, Mascella F, *et al.* Long-term Chikungunya infection clinical manifestations after an outbreak in Italy: A prognostic cohort study. *J Infect.* 2012;65:165-72. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.04.005>
21. Mejía C, López-Vélez R. Alfavirus tropicales artritogénicos. *Reumatol Clin.* 2018;14:97-105. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2017.01.006>
22. Maganto VV, Mingote-Adán JC, López-Espino M. Dolor. Madrid: Ediciones Díaz de Santos; 2015. p. 70.

Comunicación breve

Análisis de la variabilidad genética de una muestra de la población de Bogotá: hacia la constitución de un mapa de haplotipos

Juan David Caicedo¹, Alejandro Cáceres², Carlos E. Arboleda-Bustos¹, María Fernanda Mahecha¹, Jenny Ortega¹, Gonzalo Arboleda¹, Humberto Arboleda¹

¹ Grupo de Neurociencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

² Instituto de Salud Global de Barcelona, Barcelona, España

Introducción. Los proyectos del mapa de haplotipos (HapMap) y de los 1.000 genomas han sido fundamentales para la comprensión del componente genético de las enfermedades comunes y los fenotipos normales. Sin embargo, la variabilidad genética colombiana incluida en estos proyectos no es representativa del país.

Objetivo. Contribuir al conocimiento de la variabilidad genética de la población colombiana a partir del estudio genómico de una muestra de individuos de Bogotá.

Materiales y métodos. Se genotificaron 2'372.784 marcadores genéticos de 32 individuos nacidos en Bogotá y de padres originarios de la misma ciudad utilizando la plataforma Illumina™. Los niveles de variabilidad genética se determinaron y se compararon con los datos disponibles de otras poblaciones del proyecto de los 1.000 genomas.

Resultados. Los individuos analizados presentaron una variabilidad genética semejante a la de poblaciones con las que comparten ancestros. No obstante, a pesar de la poca diferenciación genética detectada en la población de Bogotá y en la de Medellín, el análisis de los componentes principales sugiere una composición genética diferente en las dos poblaciones.

Conclusiones. El análisis genómico de la muestra de Bogotá permitió detectar similitudes y diferencias con otras poblaciones americanas. El aumento de tamaño de la muestra bogotana y la inclusión de muestras de otras regiones del país permitirán una mejor comprensión de la variabilidad genética en Colombia, lo cual es fundamental para los estudios de salud humana, y la prevención y el tratamiento de enfermedades comunes en el país.

Palabras clave: proyecto mapa de haplotipos; proyecto 1.000 genomas; variabilidad genética; Colombia.

Genetic variability analysis in a population from Bogotá: Towards a haplotype map

Introduction: The HapMap and the 1000 Genomes projects have been important for understanding the genetic component of common diseases and normal phenotypes. However, the Colombian genetic variability included in these projects is not fully representative of our country.

Objective: To contribute to the knowledge of the Colombian genetic variability through the genomic study of a sample of individuals from Bogotá.

Materials and methods: A total of 2,372,784 genetic markers were genotyped in 32 individuals born in Bogotá whose parents are from the same region, using the Illumina™ platform. The genetic variability levels were determined and compared with the data available from other populations of the 1000 Genomes Project.

Results: The genetic variability detected in the individuals from Bogotá was similar to those with shared ancestry. However, despite the low levels of genetic differentiation between Bogotá and Medellín, populations the principal component analysis suggested a different genetic composition in them.

Conclusions: Our genomic analysis of a Bogotá sample allowed us to detect similarities and differences with other American populations. The increase of the Bogotá sample and the inclusion of samples from other regions of the country will improve our understanding of the genetic variability in Colombia, essential for studies of human health and the prevention and treatment of common diseases in our country.

Keywords: HapMap Project; The 1000 Genome Project; genetic variability; Colombia.

Durante los últimos años, las técnicas de secuenciación masiva del ADN han permitido el análisis de millones de variantes genéticas en diferentes poblaciones humanas (1). Esta aproximación ha conducido a un aumento exponencial en la identificación de las causas genéticas de enfermedades raras y comunes, lo cual permitirá proyectar estos hallazgos al desarrollo de políticas de prevención y diagnóstico en un futuro muy próximo (2-4).

Recibido: 16/10/18
Aceptado: 22/02/19
Publicado: 22/02/19

Citación:

Caicedo JD, Cáceres A, Arboleda-Bustos CE, Mahecha MF, Ortega J, Arboleda G, *et al.* Análisis de la variabilidad genética de una muestra de la población de Bogotá: hacia la constitución de un mapa de haplotipos. *Biomédica*. 2019;39:595-600. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4753>

Correspondencia:

Humberto Arboleda, Grupo de Neurociencias, Universidad Nacional de Colombia, Calle 53 N° 36A-67 a 36A-47, edificio 426, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 316 5000, extensiones 11608 y 11609
harboledag@unal.edu.co

Contribución de los autores:

Humberto Arboleda y Alejandro Cáceres: coordinación general del proyecto
Gonzalo Arboleda y Humberto Arboleda: selección de muestras
Jenny Ortega y María Fernanda Mahecha: selección de muestras, manejo de muestras biológicas y envío a secuenciación
Juan David Caicedo y Alejandro Cáceres: análisis bioinformático
Carlos E. Arboleda-Bustos: participación en todas las etapas del estudio
Todos los autores participaron en la formulación del proyecto, en la discusión y análisis de resultados, y en la escritura del manuscrito.

Financiación:

Este trabajo fue financiado por la División de Investigación, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, código Hermes 35614.

Conflicto de intereses:

No hay conflicto de intereses.

Los proyectos como el HapMap (5-7) y el de los 1.000 genomas (8,9) han servido de base para el diseño y el desarrollo de estudios de asociación entre millones de variantes genómicas y muchas enfermedades y fenotipos complejos. Dichos proyectos se han enfocado en la determinación de los patrones comunes de la variación genética del genoma humano por medio de la caracterización de la variabilidad genética, sus frecuencias y correlaciones en diferentes poblaciones humanas alrededor del mundo (7).

Sin embargo, a pesar de que la información existente en el proyecto de los 1.000 genomas incluye una muestra proveniente de individuos de Medellín (9), una región de Colombia que se caracteriza por una alta proporción de ascendencia caucásica (10), dicha variabilidad genética no es representativa de la población colombiana, cuya mayoría es mestiza y con un componente ancestral que proviene de poblaciones locales, europeas y africanas (11,12).

Por lo tanto, para tener una visión real de la variabilidad genética colombiana es necesario desplegar esfuerzos para hacer un registro más amplio e incluyente de los diferentes grupos y etnias de nuestro país. Este conocimiento permitirá el desarrollo de una medicina específica ajustada a las características genéticas de los colombianos.

En el presente estudio se analizó la variabilidad genética de una muestra de individuos mestizos de la población de Bogotá (13,14) y se comparó con los datos disponibles de diferentes poblaciones de los 1.000 genomas. Los hallazgos del estudio contribuyen al conocimiento de la variabilidad genética colombiana.

Materiales y métodos

Selección de individuos

Se entrevistaron 32 individuos de ambos sexos y se elaboró su árbol familiar. Se estableció que todos ellos y sus padres habían nacido en Bogotá. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado para participar en el estudio y autorizar la recolección de muestras de sangre periférica.

Genotipificación

El ADN genómico de cada individuo se extrajo de las muestras de sangre periférica con el estuche de purificación DNA Quick-gDNA MiniPrep™. Posteriormente, se genotipificaron 2'372.784 marcadores en cada individuo, empleando el Infinium Omni 2.5-8™, versión 1.3, Bead Chip de la plataforma Illumina™ (15).

Análisis de datos

Los archivos con las extensiones .map y .ped del formato PLINK (16), se obtuvieron tras el proceso de genotipificación y se convirtieron a formatos .bed, .bin y .fam para hacer los análisis posteriores empleando los siguientes paquetes de Bioconductor™ (17): el paquete snpStats se empleó para hacer el control de calidad seleccionando los polimorfismos de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNP) con valores de *call rate* mayores de 0,8 y una frecuencia del alelo menor (*Minor Allele Frequency*, MAF) mayor de 0,01 (18-20). Este paquete también se empleó para determinar la posible desviación del equilibrio de Hardy-Weimberg de las variantes presentes en la población de estudio (21).

El análisis de los componentes principales se hizo con el paquete SNPRelate independientemente para la población bogotana de estudio y, posteriormente, se incluyeron los datos obtenidos del proyecto de los 1.000 genomas (9) en 14 poblaciones ubicadas en cuatro continentes de la siguiente forma: 1) América (AMR), incluidas las poblaciones de Puerto Rico (PUR), México (MXL) y colombianos de Medellín (CLM); 2) África (AFR), la cual incluye las poblaciones de americanos de ancestro africano (ASW), yorubas en Ibadan, Nigeria (YRI), y luhya en Webuye, Kenia (LWK); 3) Europa (EUR), incluidas las poblaciones de Finlandia (FIN), los americanos con ancestros del norte y el oeste de Europa (CEU), británicos en Inglaterra y Escocia (GBR), población ibérica en España (IBS) y toscana en Italia (TSI), y 4) Asia (AS), incluidas las poblaciones de chinos Han en Beijing (CHB), chinos Han del sur (CHS) y japoneses en Tokio (JPT).

El índice de fijación (parámetro estadístico F_{st}) se empleó para determinar el grado de diferenciación genética entre la población bogotana y el resto de las poblaciones analizadas.

Resultados

Se analizaron 32 individuos nacidos en Bogotá cuyos padres también habían nacido en la ciudad. En el análisis de los componentes principales de la población de estudio (figura 1), se observó que tres de los individuos presentaban una distancia genética más grande de la esperada con respecto al resto de la muestra debido, probablemente, a que sus generaciones anteriores tenían una ascendencia diferente a la bogotana y por ello se excluyeron de los análisis posteriores.

Los datos genómicos de 14 de las 26 poblaciones disponibles en el proyecto de los 1.000 genomas se emplearon con el propósito de compararlos con los datos de la población de estudio. En la figura 2 se observa que los individuos analizados tendieron a agruparse por continentes (AFR: africanos; AMR: americanos; EUR: europeos y AS: asiáticos).

No obstante, a pesar de que la población AMR se encuentra más cercana a la población EUR en comparación con las otras poblaciones, cabe destacar que la AMR presenta dos líneas genéticas claramente distinguibles: una línea más cercana a la población AS (amerindios), representada por la población mexicana (MXL), y la segunda, más cercana a la población AFR (afrodescendientes), representada por la población puertorriqueña (PUR).

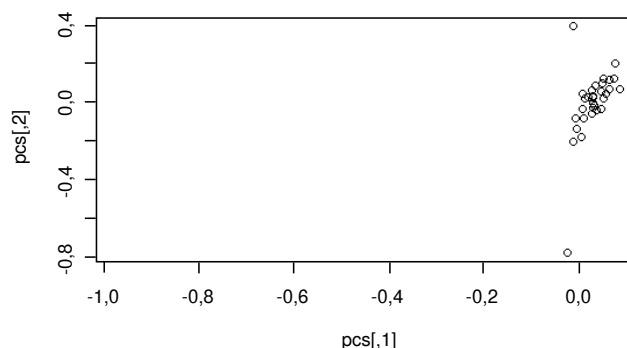
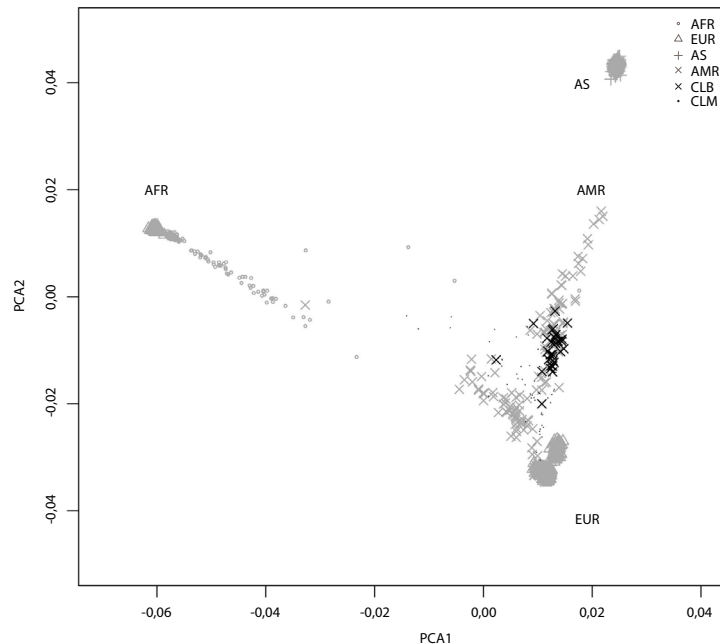


Figura 1. Análisis de componentes principales en más de dos millones de polimorfismos de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNP) en 32 individuos de la población de Bogotá. La figura muestra las dos primeras componentes del análisis de componentes principales en la muestra estudiada después del análisis de control de calidad. Tres individuos tenían diferencias genéticas grandes con respecto a la muestra.



AFR: africanos; EUR: europeos; AS: asiáticos; AMR: americanos; CLB: colombianos de Bogotá; CLM: colombianos de Medellín

Figura 2. Análisis de componentes principales de los individuos de la población de Bogotá y las 14 poblaciones de los diferentes continentes analizados. El gráfico ilustra las dos primeras componentes del análisis de componentes principales de los datos de la muestra y las de las poblaciones tomadas del proyecto de los 1.000 genomas.

Como era de esperarse, este análisis reveló que la variabilidad genética presente en la población bogotana de estudio (CLB) se ubicó dentro de la observada en la población AMR y fue muy similar a la de la población CLM. Sin embargo, esta última presenta una dispersión entre las dos líneas de la población AMR, en tanto que la población CLB se agrupó más homogéneamente dentro de la línea amerindia de la población AMR.

El grado de diferenciación genética entre la población CLB y las diferentes poblaciones analizadas se determinó mediante el parámetro estadístico F_{st} (cuadro 1), el cual indicó que los niveles más bajos de diferenciación genética se dieron con las poblaciones CLM y MXL ($F_{st} = 0,003$), en tanto que los más altos se detectaron con la población africana yoruba (YRI) ($F_{st} = 0,062$). Por último, se detectaron diferencias en la variación de la heterocigosidad dentro de las poblaciones (figura 3). Por ejemplo, se observó una gran variación dentro de las poblaciones ASW, MEX y CLM, en tanto que otras poblaciones, como las YRI, LWK, CEU y JPT, presentan un índice notablemente bajo de variación genética. La población CLB presentó una variación genética intermedia.

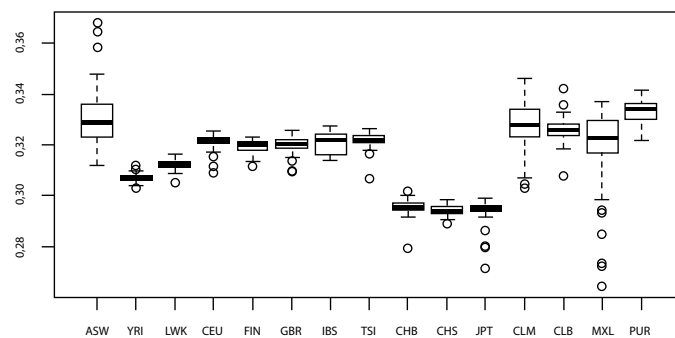
Discusión

Este estudio de la variabilidad genética de 32 individuos de la población de Bogotá (CLB), reveló mayores similitudes genómicas con la población AMR que con las poblaciones AFR, EUR o AS (figura 2). A pesar de lo reducido de la muestra, fue suficiente para revelar posibles diferencias con poblaciones cercanas, especialmente con la población colombiana de Antioquia (CLM). Por ejemplo, a pesar de que la diferenciación genética entre las poblaciones CLB y CLM resultó baja (cuadro 1), los resultados obtenidos a partir de los análisis de componentes principales (figura 2) indicaron una composición genética diferente en estas dos poblaciones.

Cuadro 1. Estimaciones de diferenciación genética (F_{st}) entre la población bogotana (CLB) y el resto de las poblaciones analizadas

Comparación con la población bogotana (CLB)	F_{st}
ASW	0,041
YRI	0,062
LWK	0,055
CEU	0,012
FIN	0,012
GBR	0,012
IBS	0,013
TSI	0,012
CHB	0,029
CHS	0,030
JPT	0,031
CLM	0,003
MXL	0,003
PUR	0,008

ASW: población de americanos de ancestro africano; YRI: población de yorubas en Ibadan, Nigeria; LWK: población de luhya en Webuye, Kenia; CEU: población de americanos con ancestros del norte y el oeste de Europa; FIN: población de Finlandia; GBR: población de británicos en Inglaterra y Escocia; IBS: población ibérica en España; TSI: población toscana en Italia; CHB: población de chinos Han en Beijing; CHS: población de chinos Han del sur; JPT: población de japoneses en Tokio; CLM: población de Medellín; MXL: población de México; PUR: población de Puerto Rico



ASW: población de americanos de ancestro africano; YRI: población de yorubas en Ibadan, Nigeria; LWK: población de luhya en Webuye, Kenia; CEU: población de americanos con ancestros del norte y el oeste de Europa; FIN: población de Finlandia; GBR: población de británicos en Inglaterra y Escocia; IBS: población ibérica en España; TSI: población toscana en Italia; CHB: población de chinos Han en Beijing; CHS: población de chinos Han del sur; JPT: población de japoneses en Tokio; CLM: población de Medellín; CLB: población de Bogotá; MXL: población de México; PUR: población de Puerto Rico

Figura 3. Estimación de la heterocigosidad dentro de cada población analizada. El gráfico muestra la distribución de la heterocigosidad de cada población en cada caja con la mediana y el rango entre cuartiles.

Estos hallazgos sugieren la presencia de posibles particularidades genéticas en cada población y, por lo tanto, la muestra de la población CLM de la base de datos de los 1.000 genomas no puede tomarse como representativa del país sino como una de sus subpoblaciones. Los futuros análisis con un mayor número de individuos de la población de Bogotá, así como de otras poblaciones del territorio colombiano, serán fundamentales para tener una mejor comprensión de la variabilidad genética de la población del país.

Por último, se pudo confirmar que los estudios de variabilidad genómica a partir de microarreglos (*microarrays*) son viables e informativos para caracterizar la genética de las poblaciones diversas y mestizas como las de Colombia. Los archivos obtenidos en este estudio estarán disponibles en la página web del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia (www.genetica.unal.edu.co). El presente análisis piloto ofrece una base para desarrollar este tipo de estudios en el país.

Agradecimientos

Los autores agradecen a todos los participantes en el estudio, así como el apoyo financiero de la Universidad Nacional de Colombia.

Referencias

1. Park ST, Kim J. Trends in next-generation sequencing and a new era for whole genome sequencing. *Int Neurol J.* 2016;20(Suppl.2):S76-83. <https://doi.org/10.5213/inj.1632742.371>
2. Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman JA. Unlocking Mendelian disease using exome sequencing. *Genome Biol.* 2011;12:228. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-9-228>
3. Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis E. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell.* 2013;155:27-38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.006>
4. Gonzaga-Jáuregui C, Lupski JR, Gibbs RA. Human genome sequencing in health and disease. *Annu Rev Med.* 2012;63:35-61. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-051010-162644>
5. The International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature.* 2003;426:789-96. <https://doi.org/10.1038/nature02168>
6. The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature.* 2005;437:1229-320. <https://doi.org/10.1038/nature04226>
7. The International HapMap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature.* 2007;449:851-62. <https://doi.org/10.1038/nature06258>
8. 1,000 Genome Project Consortium. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature.* 2012;491:56-65. <https://doi.org/10.1038/nature11632>
9. 1,000 Genome Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;526:68-74. <https://doi.org/10.1038/nature15393>
10. Rishishwar L, Conley AB, Wigington CH, Wang L, Valderrama-Aguirre A, King Jordan I. Ancestry, admixture and fitness in Colombian genomes. *Sci Rep.* 2015;5:12376. <https://doi.org/10.1038/srep12376>
11. Guhl E. Bosquejo de una geografía tropical. Bogotá, D.C.: Colcultura; 1975. p. 39-92.
12. Sandoval C, de la Hoz A, Yunis E. Estructura genética de la población colombiana. *Revista de la Facultad de Medicina.* 1993;41:3-14.
13. Secretaría Distrital de Planeación de Bogotá. Caracterización de la población indígena que reside en el Distrito Capital según Censo de Población 2005. Bogotá: Secretaría Distrital de Planeación; 2007.
14. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Estadísticas por demografía y población. Bogotá: Departamento Administrativo Nacional de Estadística; 2010.
15. Illumina, Inc. Infinium Omni2.5-8 Kit. Fecha de consulta: 17 de agosto de 2018. Disponible en: <https://www.illumina.com/products/by-type/microarray-kits/infinium-omni25-8.html>
16. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, *et al.* PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet.* 2007;81:559-75. <https://doi.org/10.1086/519795>
17. Bioconductor. Bioconductor. Open Source Software for Bioinformatics. (2018). Fecha de consulta: 17 de agosto de 2018. Disponible en: <https://www.bioconductor.org/>
18. Bioconductor. Stats SnpMatrix and XSnpmatrix classes and methods. (s/f). Fecha de consulta: 17 de agosto de 2018. Disponible en: <http://bioconductor.org/packages/snpStats/>
19. Anderson CA. Data quality control. In: Zeggini E, Morris A, editors. *Analysis of complex disease association studies.* San Diego: Academic Press; 2011. p. 95-108. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375142-3.10007-0>
20. Linck EB, Battey CJ. Minor allele frequency thresholds strongly affect population structure inference with genomic datasets. *Mol Ecol Resour.* 2019. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12995>
21. Holsinger KE. Hardy-Weinberg Law. In: Brenner S, Miller JH, editors. *Encyclopedia of genetics.* New York: Academic Press; 2001. p. 912-4. <https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.0585>

Comunicación breve

Estudio de las variantes alélicas *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* en muestras de población mestiza peruana

Ángel Tito Alvarado¹, Ana María Muñoz¹, Berta Loja¹, Jessica Michiko Miyasato², Jorge Antonio García³, Roberto Andrés Cerro⁴, Luis Abel Quiñones⁴, Nelson Miguel Varela⁴

¹ Departamento de Biología y Química, Facultad de Ingeniería, Universidad San Ignacio de Loyola (USIL), Lima, Perú

² Clínica Médica Master Medic ERS, Lima, Perú

³ Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional San Luis Gonzaga, Ica, Perú

⁴ Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética, Departamento de Oncología Básico-Clínico, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile

Introducción. El citocromo CYP2C9 metaboliza, aproximadamente, el 15 % de los fármacos prescritos. Su gen presenta alelos cuyas frecuencias difieren entre grupos étnicos y poblaciones. Los alelos *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* dan cuenta de una enzima con actividad disminuida cuya frecuencia no ha sido determinada en la población mestiza peruana.

Objetivo. Caracterizar la frecuencia de las variantes *2 (rs1799853) y *3 (rs1057910) del gen *CYP2C9* en muestras de población mestiza peruana provenientes de Lima, Tacna y Junín.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio descriptivo, observacional y prospectivo, con muestreo no probabilístico, por conveniencia e incidental. Se incluyeron 218 sujetos según los criterios de inclusión y exclusión; todos los participantes otorgaron su consentimiento informado. El ADN genómico se obtuvo mediante hisopado de mucosa oral, y la detección de los genotipos para los alelos *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* se hizo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, utilizando sondas TaqMan™.

Resultados. Las variantes de *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* están presentes en la población mestiza peruana con frecuencias de 0,046 y 0,062, respectivamente. El análisis de las frecuencias genotípicas observadas permitió predecir que la frecuencia de fenotipos metabolismo intermedio sería del 15,13 % (*CYP2C9*1/*2*: 5,96 %; *CYP2C9*1/*3*: 9,17 %), y la de fenotipos de metabolismo lento, del 3,22 % (*CYP2C9*2/*2*: 1,38 %; *CYP2C9*3/*3*: 1,38 %; *CYP2C9*2/*3*: 0,46 %).

Conclusiones. Se lograron determinar las frecuencias genotípicas y alélicas para las variantes *2 y *3 del gen *CYP2C9* en una muestra no probabilística de población mestiza peruana. Las frecuencias obtenidas (0,046 y 0,062, respectivamente) están entre las esperadas para una población mestiza sudamericana con ascendencia amerindia, europea, africana y asiática.

Palabras clave: citocromo P-450 CYP2C9; genotipo; farmacogenética; Perú.

Study of the allelic variants *CYP2C9*2* and *CYP2C9*3* in samples of the Peruvian mestizo population

Introduction: CYP2C9 metabolizes approximately 15% of the prescribed drugs. Its gene has alleles whose frequencies differ between ethnic groups and populations. The alleles *CYP2C9*2* and *CYP2C9*3* account for an enzyme with decreased activity and their frequencies have not been determined in the Peruvian mestizo population.

Objective: To characterize the frequencies of the allelic variants *2 (rs1799853) and *3 (rs1057910) of *CYP2C9* gene in the Peruvian mestizo population from Lima, Tacna y Junín.

Materials and methods: We conducted an observational, prospective cross-sectional study with non-probabilistic, by convenience, and incidental sampling. We included 218 subjects according to the inclusion and exclusion criteria, all of whom had signed the informed consent. We obtained the genomic DNA from oral mucosa swab. For the detection of the *CYP2C9*2* and *CYP2C9*3* genotypes, we used real-time-polymerase chain reaction with TaqMan® probes.

Results: The genotyping revealed that *CYP2C9*2* and *CYP2C9*3* variants have low frequencies (0.046 and 0.062, respectively). The frequency of intermediate metabolizers was 15.13% (*CYP2C9*1/*2*: 5.96%; *CYP2C9*1/*3*: 9.17%) and that of slow metabolizers was 3.22% (*CYP2C9*2/*2*: 1.38%; *CYP2C9*3/*3*: 1.38%; *CYP2C9*2/*3*: 0.46%).

Conclusions: It was possible to determine the genotypic and allelic frequencies for the variants *2 and *3 of the *CYP2C9* gene in a non-probabilistic sample of the Peruvian mestizo population. The frequencies obtained (0.046 and 0.062, respectively) corresponded to those expected for a South American mestizo population with Amerindian, European, African and Asian ancestry.

Keywords: Cytochrome P-450 CYP2C9; genotype; pharmacogenetics; Perú.

Recibido: 13/08/18

Aceptado: 12/03/19

Publicado: 13/03/19

Citación:

Alvarado Ángel T, Muñoz AM, Loja B, Miyasato JM, García JA, Cerro RA, *et al.* Estudio de las variantes alélicas *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3* en muestras de una población mestiza peruana. *Biomédica*. 2019;39:601-10. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4636>

Correspondencia:

Nelson Miguel Varela, Departamento de Oncología Básico-Clínico, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Carlos Schachtebeck 299, Quinta Normal, Santiago, Chile
Teléfono: (562) 2977 0743
nvarela@med.uchile.cl

Contribución de los autores:

Ángel Tito Alvarado, Ana María Muñoz, Berta Loja, Jessica Michiko Miyasato y Jorge Antonio García: toma de muestras y extracción del ADN genómico
Roberto Andrés Cerro y Nelson Miguel Varela: determinación de los genotipos estudiados, adquisición, análisis e interpretación de los datos
Todos los autores participaron en la concepción y diseño de la investigación y en la escritura del manuscrito.

Financiación:

Este trabajo fue financiado parcialmente con fondos propios de la Asociación Peruana de Inmunogenómica y Medicina Personalizada, y con aportes del Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética de la Universidad de Chile.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

En la práctica clínica se sabe que los fármacos son eficaces en 25 a 60 % de los pacientes, es decir que la cantidad de quienes presentan falla terapéutica es considerable (1). Este fenómeno responde a múltiples factores, entre los cuales la farmacocinética clínica y la genética explican del 25 al 95 % de los casos, en los que, frente a una misma dosis, se registran concentraciones plasmáticas por debajo de la concentración mínima efectiva (CME) o por encima de la concentración máxima efectiva (CME), asociadas con una menor eficacia de los fármacos o con efectos adversos de diversa consideración. Esta situación se hace especialmente relevante en fármacos de estrecho margen terapéutico (1-3).

En este contexto, la medicina personalizada, consistente en adaptar el tratamiento farmacológico de determinadas enfermedades a la dosis correcta en el momento adecuado con base en las características de cada paciente, su sexo, etnia (o mestizaje), estilo de vida y perfil genético-molecular, así como al nivel del fármaco en el estado estacionario, minimiza los efectos secundarios y optimiza la eficacia farmacológica (2,3).

Los genes que codifican aquellas enzimas que metabolizan la mayoría de los fármacos presentan polimorfismos genéticos, incluidos la ausencia completa del gen, los de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphism*, SNP) y las duplicaciones génicas, cuyos efectos van desde la ausencia en la expresión de la enzima hasta la reducción, alteración o incremento de su actividad.

El gen *CYP2C9*, situado en el brazo largo del cromosoma 10 en la región 24 (10q24) (4), presenta alelos cuyas frecuencias difieren entre los grupos étnicos y dependen de la ubicación geográfica de una determinada población (5). La enzima *CYP2C9* (miembro del sistema oxidasa de función mixta, citocromo P450: EC 1.14.13.48) metaboliza, aproximadamente, el 15 % de los fármacos (1) y el gen que la codifica presenta más de 60 variantes genéticas (6) del tipo SNP (5), algunas de las cuales forman parte de las seis variantes alélicas de importancia clínica.

El alelo *CYP2C9*1* da cuenta de un metabolismo normal (7), con una actividad enzimática del 100 % (8,9). Los alelos implicados en la disminución del metabolismo son el *CYP2C9*2* y el *CYP2C9*3*, cuyas frecuencias difieren entre grupos étnicos (9,10), siendo más altas en los caucásicos que en los africanos y asiáticos (5).

La variante alélica *CYP2C9*2* (rs1799853: g.3608C>T, c.430C>T, exón 3; cambio en la proteína de Arg144Cys) se asocia con una menor interacción de la enzima con su cofactor, reduciendo la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) de 12 % (2,4,8) a 50 % con respecto a la enzima de actividad normal codificada por el alelo *CYP2C9*1* (11).

El alelo *CYP2C9*3* (rs1057910: exón 7, g.42614A>C, c.1075A>C; cambio en la proteína de Ile359Leu) tiene una actividad del 5 % debido a una variación en el sitio de unión al sustrato (3), lo que genera un aumento de la constante de Michaelis-Menten (K_m) y una reducción en la $V_{m\acute{a}x}$ (11).

Cuando un individuo porta dos alelos de función reducida, sean estos *CYP2C9*2*2*, *CYP2C9*3*3* o *CYP2C9*2*3*, se configura un genotipo predictor de metabolismo lento (4,9). Los genotipos implicados en el metabolismo intermedio se generan cuando se presenta un alelo de función normal y otro de función reducida (*CYP2C9*1*2* ó *CYP2C9*1*3*) (4,9).

El gen *CYP2C9* está implicado en el metabolismo de medicamentos anticonvulsivos, anticoagulantes, antihipertensivos, antiinflamatorios no esteroideos e hipoglucemiantes, y se ha demostrado que la presencia de genotipos predictores de metabolismo lento en el gen *CYP2C9* se asocia con una mayor frecuencia de efectos secundarios de varios de estos fármacos.

La fenitoína, anticonvulsivo ampliamente utilizado en el tratamiento de la epilepsia, es metabolizada en más del 90 % por el *CYP2C9*, y la presencia de determinados genotipos del gen condiciona sus parámetros farmacocinéticos, aumentando o disminuyendo su metabolismo (7). En los caucásicos se ha reportado que los genotipos *CYP2C9*1*2*, *CYP2C9*1*3* (12,13) y *CYP2C9*2*2* son responsables de los efectos secundarios de la fenitoína (12-14); en los individuos indios, el *CYP2C9*3*3* (12,15), en japoneses, los genotipos *CYP2C9*1*3* y *CYP2C19*1*3* (12), y en los afroamericanos están implicados los genotipos *CYP2C9*6*6* y *CYP2C19*1*1* (12). Además, el *CYP2C9* metaboliza el clopidogrel (16,17), la S-warfarina (11), la fluvastatina (6), la glibenclamida, el losartán, el irbesartán, el ibuprofeno, el lornoxicam y el diclofenaco (18).

En estudios sobre el perfil genético de la población mestiza peruana se ha evidenciado que entre el 68,3 % (19) y el 76 % (20) es amerindio; entre el 26 (19) y el 29 % (21), europeo; entre el 2 (20) y el 3,2 % (19), africano, y el 2,5 % (19), asiático; esto último debido especialmente a las migraciones japonesa y china.

Al revisar la base de datos de PubMed-NCBI de estudios de variantes genéticas en enzimas implicadas en el metabolismo de los fármacos, se aprecia la ausencia de trabajos en la población peruana, situación que incluye el estudio del *CYP2C9*. Los estudios de asociación genotípica y fenotípica de ciertos alelos del *CYP2C9* han revelado la importancia de conocer y describir las frecuencias de los alelos del gen *CYP2C9*, dada su relevancia para el metabolismo de varios fármacos de estrecho rango terapéutico y de uso extendido en salud pública, como los anticonvulsivos, ampliamente utilizados en el Perú, en donde la prevalencia de la epilepsia en una población de 31'151.647 fluctúa entre el 0,6 (186.910 pacientes) y el 1,8 % (560.730 pacientes) (22).

En este contexto, en el presente estudio se propuso caracterizar las frecuencias de los alelos *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3*—los de mayores frecuencias alélicas globales del gen *CYP2C9*— (23) en muestras de población mestiza peruana y compararlas con los datos previamente reportados en otras poblaciones, españolas, africanas y asiáticas.

Materiales y métodos

Tipo y diseño del estudio

Se llevó a cabo un estudio descriptivo, observacional y prospectivo en el Laboratorio de Biología de la Universidad San Ignacio de Loyola de Lima, Perú. Las personas fueron convocadas e informadas sobre el estudio entre enero y diciembre de 2017.

Tipo de muestreo

Se hizo un muestreo no probabilístico, debido a que las muestras se recogieron en un proceso que no brindaba a todos los individuos de la población iguales oportunidades de ser seleccionados, y por conveniencia e incidental (casual), ya que las muestras se seleccionaron directamente de individuos voluntarios. La población representativa estuvo conformado por residentes de Lima, de la región andina (Junín) y de la costera (Tacna).

Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión fueron: ser mayor de 18 años, sin relación de parentesco con otros participantes, haber nacido en el Perú, estar radicado en Lima, Junín o Tacna, y ser considerado mestizo por un fenotipo visible, por su región de procedencia (andina o costa) y por tener apellido de ascendencia española, africana, japonesa o china.

En el examen clínico, a cargo de un médico cirujano, los participantes debían presentar un buen estado de salud, presión arterial sistólica de 110-139 mm Hg y diastólica de 60-89 mm Hg, circunferencia abdominal menor de 95 cm en hombres y de 82 cm en mujeres, no tener diagnóstico de diabetes ni haber estado en tratamiento farmacológico reciente (en los seis meses previos a la fecha de reclutamiento), y no presentar dependencia del alcohol ni de otras drogas de abuso, lo que se estableció mediante una entrevista.

Todos los voluntarios firmaron el consentimiento informado, para lo cual no debían presentar impedimentos físicos ni mentales.

Se excluyeron del estudio a todas las personas con, al menos, un apellido asociado a etnias distintas a las indicadas en los criterios de inclusión.

Obtención del ADN genómico

El ADN genómico se obtuvo mediante hisopado bucal de tejido epitelial plano estratificado no queratinizado. El interior de la mejilla se frotó cinco a seis veces con el hisopo para garantizar una cantidad adecuada de células descamativas. Posteriormente, el hisopo se sumergió durante 60 segundos en 300 µl de solución tampón de lisis y la mezcla resultante se refrigeró a 4 °C por un tiempo no superior a 18 horas.

El ADN genómico (ADNg) se extrajo utilizando el innuPRE DNA Master kit™ (Analytik Jena™), según el protocolo del fabricante, procedimiento realizado en el Laboratorio de Biología de la Universidad San Ignacio de Loyola. El ADN genómico se cuantificó por espectrofotometría utilizando el equipo Denovix (modelo DS-11, FX, Serie Spectrophotometer™, USA).

Se consideraron como muestras aptas para ser sometidas a análisis aquellas con razones de absorbancias de 260/280 nm y 260/230 nm iguales o superiores a 1,8. Las muestras se conservaron a -20 °C hasta su análisis.

Análisis genotípico

Los genotipos se determinaron mediante PCR en tiempo real (RT-PCR) y la identificación de las variantes alélicas, mediante sondas TaqMan para ensayos de genotipificación (Thermo Fischer Scientific Inc., número de catálogo: 4362691) capaces de discriminar los SNP identificados como rs1799853 y rs1057910 para *CYP2C9*2* y *CYP2C9*3*, respectivamente.

El alelo *CYP2C9*1* no se determinó directamente; todos los alelos que resultaron negativos para los SNP rs1799853 y rs1057910 se designaron como *CYP2C9*1*, lo cual es aceptable cuando las variaciones de secuencia correspondientes a alelos no se determinan, por lo que no es erróneo asumir que $No * X = *1$ (24).

En el protocolo estándar, la mezcla de reacción fue de 20 ng de ADN genómico, 5 µl de la 2X Genotyping Master Mix™ (N° de catálogo 4371355), 0,5 µl del 20X TaqMan SNP Genotyping Assay™ (con las

sondas e iniciadores correspondientes) (Thermo Fisher Scientific Inc.) y agua de grado biología molecular libre de nucleasas (HyPure HyClone™) en cantidad suficiente para 10 µl de volumen final de reacción. Para determinar el rs1799853, se utilizó el TaqMan SNP Genotyping Assay™, ID: C__25625805_10, que discrimina la transición NG_008385.1:g.8633C>T, en la secuencia contexto GATGGGGAAGAGGACATTGAGGAC[C/T] GTGTTCAAGAGGAAGCCCGCTGCCT; y para el rs1057910, se utilizó el ensayo ID: C__27104892_10, que discrimina la transversión NG_008385.1:g.47639A>C en la secuencia contexto TGTGGTGCACGAGGTCCAGAGATAC[C/A] TTGACCTTCTCCCACCAGCCTGCC.

Para la amplificación, se utilizó el equipo Stratagene Mx3000P™ (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania); el programa incluyó un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos y 50 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 92 °C, 90 segundos de alineamiento a 60 °C y 60 segundos de elongación a 72 °C.

Esta etapa del proceso experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se hicieron con el programa estadístico informático SPSS™ de IBM. Para determinar si la distribución de los genotipos estudiados seguía el modelo de Hardy-Weinberg, se utilizó la prueba de bondad de ajuste de ji al cuadrado, considerando dos grados de libertad y un valor de alfa menor de 0,05. Los valores de ji al cuadrado mayores de 5,99 en la comparación indicaban el rechazo de la hipótesis nula, por lo tanto, las frecuencias observadas difirieron significativamente de las esperadas (25).

Consideraciones éticas

Los sujetos firmaron el procedimiento de consentimiento informado de forma individual y aceptaron su participación voluntariamente después de escuchar las explicaciones sobre los objetivos, riesgos, importancia y aplicación del estudio.

El estudio se ajustó estrictamente a las normas éticas de la Declaración de Helsinki (26) y a la reglamentación nacional. Asimismo, fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad de San Martín de Porres mediante oficio N° 582-2017-CIEI-USMP-CCM.

Resultados

En el cuadro 1 se presentan las características antropométricas de los voluntarios seleccionados (218 peruanos mestizos: 158 hombres y 60 mujeres), señalando su procedencia geográfica. En el cuadro 2 se presentan las frecuencias genotípicas y alélicas observadas para las variantes *2 (rs1799853) y *3 (rs1057910) del gen *CYP2C9*. En el cuadro 3 se presentan por separado las frecuencias genotípicas y alélicas de las muestras de las poblaciones de Lima, Tacna y Junín.

La prueba de bondad de ajuste de ji al cuadrado para comprobar el equilibrio de Hardy-Weinberg de las frecuencias genotípicas en estudio, arrojó los siguientes valores: 3,197 y 4,624 para la muestra de población

proveniente de Lima; 4,228 y 0,021 para la de Tacna, y 11,480 y 0,048 para la de Junín. Considerando que los valores de ji al cuadrado mayores de 5,99 negaban la hipótesis nula, solo las frecuencias observadas para los genotipos del alelo *CYP2C9*2* en la muestra de Junín difirieron significativamente de las esperadas ($\chi^2=11,480$). En los demás casos, los valores de χ^2 obtenidos no permitieron rechazar la hipótesis nula, y se consideró que las muestras estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Se reporta la presencia de los genotipos en el gen *CYP2C9* que predicen un metabolismo extenso (*CYP2C9*1/*1*), uno intermedio (*CYP2C9*1/*2*, **1/*3*) o uno lento (*CYP2C9*2/*2*, **3/*3* y *2*3**) (cuadro 4).

Cuadro 1. Procedencia geográfica y características demográficas de la muestra de peruanos mestizos incluida en el estudio

Procedencia	n (%)
Lima	118 (54,12)
Junín	50 (22,94)
Tacna	50 (22,94)
Total	218 (100,00)
Características demográficas	
Sexo	
Mujeres	158 (72,48)
Hombres	60 (27,52)
Otras	
	Promedio \pm DE
Edad (años)	24,99 \pm 4,75
Peso (kg)	75,43 \pm 5,73
Talla (m)	1,67 \pm 0,09
IMC (kg/m ²)	27,16 \pm 3,30

DE: desviación estándar

Cuadro 2. Frecuencias génicas y genotípicas para los alelos *2 y *3 del gen *CYP2C9* en la muestra de población mestiza peruana estudiada

	Genotipo	n	%	Alelo	n	frecuencia
<i>CYP2C9*2</i> rs1799853	C/C (*1/*1)	201	92,20	T (*2)	20	0,046
	C/T (*1/*2)	14	6,42			
	T/T (*2/*2)	3	1,38	C	416	0,954
	Total	218	100,00			
<i>CYP2C9*3</i> rs1057910	A/A (*1/*1)	194	88,99	C (*3)	27	0,062
	A/C (*1/*3)	21	9,63			
	C/C (*3/*3)	3	1,38	A	409	0,938
	Total	218	100,00			

Cuadro 3. Frecuencias genotípicas y alélicas para las variantes *2 y *3 del gen *CYP2C9* en las tres poblaciones mestizas peruanas incluidas en el estudio

Genotipo	n (%)			Alelo	frecuencia		
	Lima	Tacna	Junín		Lima	Tacna	Junín
C/C (*1/*1)	109 (92,3)	45 (90,0)	47 (94,0)	T (*2)	0,042	0,060	0,040
C/T (*1/*2)	8 (6,8)	4 (8,0)	2 (4,0)				
T/T (*2/*2)	1 (0,9)	1 (2,0)	1 (2,0)				
Total	118 (100,0)	50 (100,0)	50 (100,0)				
A/A (*1/*1)	99 (83,9)	48 (96,0)	47 (94,0)	C (*3)	0,093	0,020	0,030
A/C (*1/*3)	16 (13,6)	2 (4,0)	3 (6,0)				
C/C (*3/*3)	3 (2,5)	0 (0,0)	0 (0,0)				
Total	118 (100,0)	50 (100,0)	50 (100,0)				

Cuadro 4. Predicción de la frecuencia de fenotipos metabólicos en la población mestiza peruana según las frecuencias genotípicas observadas para los alelos *2 y *3 del gen *CYP2C9*

Fenotipos metabólicos	Porcentaje esperado en la población mestiza peruana	Genotipo predictivo	Genotipos observados n (%)
Extensivos (ME)	81,65	*1/*1 ^a	178 (81,65)
Intermedios (MI)	15,13	*1/*2 ^b	13 (5,96)
		*1/*3 ^c	20 (9,17)
Lentos (ML)	3,22	*2/*2	3 (1,38)
		*3/*3	3 (1,38)
		*2/*3 ^d	1 (0,46)

^a sujetos que no portaban ninguno de los alelos en estudio (*2 y *3)

^b sujetos heterocigotos para *2 que no presentaban el alelo *3

^c sujetos heterocigotos para *3 que no presentaban el alelo *2

^d sujetos que resultaron ser heterocigotos para *2 y *3

Discusión

En diversos estudios a nivel internacional, se reportan importantes variaciones en las frecuencias de los alelos *CYP2C9**2 y *CYP2C9**3 en distintas poblaciones o etnias.

En el presente estudio se determinaron las frecuencias genotípicas y alélicas para estas variantes en una muestra de población mestiza del Perú, de las cuales no hay reportes previos. Las frecuencias observadas para el rs1799853 (*CYP2C9**2) y el rs1057910 (*CYP2C9**3) fueron de 0,046 y 0,062, respectivamente.

Al comparar estos resultados con otras poblaciones, se encontró que la frecuencia para el alelo *2 es similar a la reportada para la población de Bolivia (0,048) (27), pero es superada por la de las poblaciones chilena (28), brasileña (29) y, más ampliamente, por la de la española-caucásica (30).

Al analizar por separado la presencia de esta variante (*2) en las muestras de la población de Lima, Tacna y Junín, se observó una similitud entre las frecuencias obtenidas para Lima (0,042) y Junín (0,040), las cuales resultaron ser un 30 % menores a la observada en Tacna (0,060).

Por otro lado, la frecuencia del alelo *3 (0,062) es similar a las reportadas en poblaciones españolas (0,062 - 0,083) (30). Sin embargo, hubo una amplia diferencia entre las frecuencias del alelo *3 de la muestra de Lima (0,093) y las bajas frecuencias de las muestras de Tacna (0,020) y Junín (0,030).

Una posible hipótesis explicativa de estas diferencias es la deriva génica sufrida por estas variantes polimórficas en la población mestiza peruana, dada la frecuencia registrada para estos alelos en las etnias originarias (4), lo que podría haber favorecido la generación de distintos patrones de mestizaje (19-21).

Las frecuencias obtenidas para las variantes *2 y *3 en la muestra de población peruana superan las reportadas para poblaciones africanas, chinas y japonesas, y son inferiores a las obtenidas en poblaciones españolas o caucásicas, tal como lo señalaron Bravo-Villalta, *et al.* (27) al observar que la frecuencia del *CYP2C9**2 y *CYP2C9**3 es muy baja en los africanos (0,010 y 0,005, respectivamente).

Por su parte, Vicente, *et al.* (31), informan que en españoles (n=223) la frecuencia es mayor para ambos alelos (*2: 0,133; *3: 0,077). Estos resultados concuerdan con la revisión de Céspedes-Garro, *et al.* (4), quienes señalan que el alelo *CYP2C9**2 es el más frecuente en las poblaciones caucásicas

(0,140), poco frecuente en los nativos americanos (0,013), e incluso menor en los asiáticos del este (0,006) y en los africanos (0,005), en tanto que el alelo *CYP2C9*3* es más frecuente entre los asiáticos del sur (0,117).

En una reciente revisión realizada por Daly, *et al.* (23), se plantea que las variantes en cuestión son las de mayor frecuencia para el gen *CYP2C9*, con frecuencias globales de 0,0914 para el alelo *2 y de 0,0637 para el alelo *3. En la misma revisión se detallan las frecuencias en diferentes grupos poblacionales y se señala que los europeos (caucásicos) tienen las frecuencias más altas para el alelo *2 (0,1268) y, los habitantes del sur de Asia, para el alelo *3 (0,1131).

Los genotipos observados para los dos alelos estudiados en las muestras provenientes de Lima, Tacna y Junín guardan el equilibrio de Hardy-Weinberg, excepto por la distribución de los genotipos para el alelo *2 en la muestra de Junín, lo cual se explicaría por factores propios de la población, como la selección por conveniencia, las migraciones, o por las limitaciones propias de este estudio, es decir, el tamaño de la muestra de las poblaciones de Junín y Tacna (n=50) y el método de muestreo utilizado (no probabilístico).

Los dos alelos estudiados están involucrados en la predicción de fenotipos metabólicos intermedios y lentos, lo que es relevante en la práctica clínica asistencial. Cuando se establece que un paciente es portador de uno o ambos alelos (*2, *3 o ambos), se da cuenta de una mayor propensión a presentar efectos secundarios tras la administración de fármacos metabolizados por la enzima *CYP2C9*.

Al establecer la frecuencia de estos alelos en una determinada población, es posible sugerir recomendaciones o modificaciones de las guías clínicas o de los protocolos de tratamiento y hacer un mejor análisis e interpretación de los programas de farmacovigilancia (1). En este sentido, el presente estudio aspira a que los médicos especialistas y los farmacéutas en los hospitales consideren estas variables genéticas como base para promover la implementación de la medicina de precisión, así como a promover futuras investigaciones en el área de la farmacogenética en Perú.

El estudio constituye la primera determinación de las frecuencias genotípicas y alélicas para las variantes *2 y *3 del gen *CYP2C9* en la población mestiza peruana. Las frecuencias obtenidas (0,046 y 0,062, respectivamente) son las esperadas para una población mestiza suramericana con ascendencia amerindia, europea (esencialmente española), africana y asiática (especialmente por migración japonesa y china). Las frecuencias de estos alelos son similares a las reportadas en países latinoamericanos vecinos como Chile y Bolivia, y en el contexto global, son menores que las de la población europea (caucásica), pero superiores a las informadas para las etnias africanas y asiáticas.

Agradecimientos

A la Sociedad Latinoamericana de Farmacogenómica y Medicina Personalizada (SOLFAGEM), por su respaldo, y a los miembros de la Asociación Peruana de Inmunogenómica y Medicina Personalizada, por sus finos aportes académicos y su patrocinio.

Referencias

1. Miranda C, Roco A, Garay J, Squicciarini V, Tamayo E, Agúndez J, *et al.* Determinación del polimorfismo de *CYP2C9**2 y su relación con la farmacocinética de acenocumarol en voluntarios sanos. *Rev Chil Cardiol.* 2011;30:218-24. <https://doi.org/10.4067/S0718-85602011000300005>
2. Cotuá-Urzola J, Morales-Ortiz A, Delgado-Niño M, Muñoz-Jáuregui A, Quiñones-Sepúlveda L, Alvarado-Yarasca A, *et al.* Determinación del nivel de dosis del ácido valproico e influencia de los fármacos inductores y no inductores enzimáticos en pacientes voluntarios de la ciudad de Mérida, Venezuela. *Horiz Med.* 2017;17:29-33. <https://doi.org/10.24265/horizmed.2017.v17n3.05>
3. Ortiz L, Tabak R. Farmacogenómica en la práctica clínica. *Rev Med Clin Condes.* 2012;23:616-20. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(12\)70356-5](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(12)70356-5)
4. Céspedes-Garro C, Fricke-Galindo I, Naranjo M, Rodrigues-Soares F, Fariñas H, de Andrés F, *et al.* Worldwide interethnic variability and geographical distribution of *CYP2C9* genotypes and phenotypes. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2015;11:1893-905. <https://doi.org/10.1517/17425255.2015.1111871>
5. Saldaña-Cruz A, Sánchez-Corona J, Márquez-de Santiago D, García-Zapién A, Flores-Martínez S. Farmacogenética y metabolismo de fármacos antiepilépticos: implicación de variantes genéticas en citocromos P450. *Rev Neurol.* 2013;56:471-9.
6. Mukai Y, Narita M, Akiyama E, Ohashi K, Horiuchi Y, Kato Y, *et al.* Co-administration of fluvastatin and *CYP3A4* and *cyp2c8* inhibitors may increase the exposure to fluvastatin in carriers of *CYP2C9* genetic variants. *Biol Pharm Bull.* 2017;40:1078-85. <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00150>
7. Balestrini S, Sisodiya S. Pharmacogenomics in epilepsy. *Neurosci Lett.* 2018;667:27-39. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.01.014>
8. Quiñones L, Roco A, Cayún J, Escalante P, Miranda C, Varela N, *et al.* Farmacogenómica como herramienta fundamental para la medicina personalizada: aplicaciones en la práctica clínica. *Rev Med Chile.* 2017;145:483-500. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872017000400009>
9. Caudle K, Rettie A, Whirl-Carrillo M, Smith L, Mintzer S, Lee M, *et al.* Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for *CYP2C9* and *HLA-B* genotypes and phenytoin dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2014;96:542-8. <https://doi.org/10.1038/clpt.2014>
10. Grover S, Gourie-Devi M, Baghel R, Sharma S, Bala K, Gupta M, *et al.* Genetic profile of patients with epilepsy on first-line antiepileptic drugs and potential directions for personalized treatment. *Pharmacogenomics.* 2010;11:927-41. <https://doi.org/10.2217/pgs.10.62>
11. Claudio-Campos K, Labastida A, Ramos A, Gaedigk A, Renta-Torres J, Padilla D, *et al.* Warfarin anticoagulation therapy in Caribbean Hispanics of Puerto Rico: A candidate gene association study. *Front Pharmacol.* 2017;8:1-17. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00347>
12. Fricke-Galindo I, Jung-Cook H, Llerena A, López-López M. Farmacogenética de reacciones adversas a fármacos antiepilépticos. *Rev Neurol.* 2018;33:165-76. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2015.03.005>
13. Depondt C, Godard P, Espel RS, Da Cruz AL, Lienard P, Pandolfo M. A candidate gene study of antiepileptic drug tolerability and efficacy identifies an association of *CYP2C9* variants with phenytoin toxicity. *Eur J Neurol.* 2011;18:1159-64. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2011.03361.x>
14. Dorado P, López-Torres E, Peñas-Lledó EM, Martínez-Antón J, Llerena A. Neurological toxicity after phenytoin infusion in a pediatric patient with epilepsy: Influence of *CYP2C9*, *CYP2C19* and *ABCB1* genetic polymorphisms. *Pharmacogenomics J.* 2013;13:359-61. <https://doi.org/10.1038/tpj.2012.19>
15. Babu K, Ramesh V, Samidorai A, Charles C. Cytochrome P450 2C9 gene polymorphism in phenytoin induced gingival enlargement: A case report. *J Pharm Bioallied Sci.* 2013;5:237-9. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.116828>
16. Park JJ, Park KW, Kang J, Jeon KH, Kang SH, Ahn HS, *et al.* Genetic determinants of clopidogrel responsiveness in Koreans treated with drug-eluting stents. *Int J Cardiol.* 2013;163:79-86. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.09.075>
17. García-Lagunar M, Consuegra-Sánchez L, Conesa- Zamora P, Ruiz-Cosano J, Soría-Arcos F, García de Guadiana L, *et al.* Genotyping of six clopidogrel-metabolizing enzyme polymorphisms has a minor role in the assessment of platelet reactivity in patients with acute coronary syndrome. *Anatol J Cardiol.* 2017;17:303-12. <https://doi.org/10.14744/AnatolJCardiol.2016.7390>

18. Wang Y, Yi XD, Lu BL. Influence of *CYP2C9* and *COX-2* genetic polymorphisms on clinical efficacy of non-steroidal anti-inflammatory drugs in treatment of ankylosing spondylitis. *Med Sci Monit.* 2017;23:1775-82. <https://doi.org/10.12659/MSM.900271>
19. Homburger J, Moreno-Estrada A, Gignoux C, Nelson D, Sánchez E, Ortiz-Tello P, *et al.* Genomic insights into the ancestry and demographic history of South America. *PLoS Genet.* 2015;11:1-26. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005602>
20. National Geographic. Reference Populations-Geno 2.0 Next Generation-2018 Fecha de consulta: 6 de mayo de 2018. Disponible en: <https://genographic.nationalgeographic.com/reference-populations-next-gen/>
21. Ruiz-Linares A, Adhikari K, Acuña-Alonzo V, Quinto-Sánchez M, Jaramillo C, Arias W, *et al.* Admixture in Latin America: Geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. *PLoS Genet.* 2014;10:1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004572>
22. Moyano L. Epidemiología de la epilepsia en el Perú: Neurocisticercosis como causa de epilepsia secundaria en la región norte del Perú. Tesis. Human health and pathology. Université de Limoges; 2016. Español (NNT: 2016LIMO0135). <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01544029>
23. Daly A, Rettie A, Fowler D, Miners J. Review pharmacogenomics of *CYP2C9*: Functional and clinical considerations. *J Pers Med.* 2018;8:1-31. <https://doi.org/10.3390/jpm8010001>
24. Hicks JK, Swen JJ, Thorn CF, Sangkuhl K, Kharasch ED, Ellingrod VL, *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for *CYP2D6* and *CYP2C19* genotypes and dosing of tricyclic antidepressants. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;93:402-8. <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.2>
25. Nakai K, Habano W, Nakai K, Fukushima N, Suwabe A, Moriya S, *et al.* Ethnic differences in *CYP2C9*2* (Arg144Cys) and *CYP2C9*3* (Ile359Leu) genotypes in Japanese and Israeli populations. *Life Sci.* 2005;78:107-11. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.04.049>
26. Asociación Médica Mundial. Declaración de Helsinki. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, 2017. Fecha de consulta: 22 de marzo de 2018. Disponible en: <https://www.wma.net/es/politicas-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>
27. Bravo-Villalta HV, Yamamoto K, Nakamura K, Bayá A, Okada Y, Horiuchi R. Genetic polymorphism of *CYP2C9* and *CYP2C19* in a Bolivian population: An investigative and comparative study. *Eur J Clin Pharmacol.* 2005;61:179-84. <https://doi.org/10.1007/s00228-004-0890-5>
28. Roco A, Quiñones L, Agúndez JA, García-Martín E, Squicciarini V, Miranda C, *et al.* Frequencies of 23 functionally significant variant alleles related with metabolism of antineoplastic drugs in the Chilean population: Comparison with Caucasian and Asian populations. *Front Genet.* 2012;3:1-9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00229>
29. Soares RA, Santos PC, Machado-Coelho GL, Marques do Nascimento R, Mill JG, Krieger JE, *et al.* *CYP2C9* and *VKORC1* polymorphisms are differently distributed in the Brazilian population according to self-declared ethnicity or genetic ancestry. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012;16:957-63. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2012.0019>
30. Sánchez-Díaz P, Estany-Gestal A, Aguirre C, Blanco A, Carracedo A, Ibáñez L, *et al.* Prevalence of *CYP2C9* polymorphisms in the south of Europe. *Pharmacogenomics J.* 2009;9:306-10. <https://doi.org/10.1038/tpj.2009.16>
31. Vicente J, Gonzáles-Andrade F, Soriano A, Fanlo A, Martínez-Jarreta B, Sinués B. Genetic polymorphisms of *CYP2C8*, *CYP2C9* and *CYP2C19* in Ecuadorian Mestizo and Spaniard populations: A comparative study. *Mol Biol Rep.* 2014;41:1267-72. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2971-y>

Cartas al editor

Lima, 5 de agosto, 2019

Señores
Comité Editorial
Revista *Biomédica*
E. S. D.

Estimados señores:

Leímos con interés el artículo publicado por Zafra-Tanaka, *et al.*, en el número 2 del volumen 39 del 2019 de la revista *Biomédica*, en el cual se describe una aproximación a la denominada autoría de regalo con base en una revisión de las contribuciones de autoría mencionadas en artículos originales de una revista médica peruana (1), y consideramos que es necesario hacer algunas precisiones al respecto.

En primer lugar, resulta metodológicamente deseable medir la autoría mediante una encuesta dirigida a los autores. Varios estudios con esta metodología se han publicado y podrían orientar a los autores para realizar un estudio en el futuro que brinde información más precisa y exhaustiva sobre la realidad de la autoría (2).

En segundo lugar, en la discusión del estudio se menciona como parte de sus limitaciones que las contribuciones de autoría en la revista no serían reales debido a que “[...] los editores de la revista pueden haber descartado algunos manuscritos por no cumplir con los criterios de autoría, lo cual nos indicaría que el problema es mucho mayor al hallado en este estudio [...]”. Esto resulta una suposición muy lejana de la realidad. Debemos manifestar que los editores no podemos descartar manuscritos por sus reportes de autoría y la publicación de las contribuciones de cada autor; las publicaciones científicas siempre se han regido por la buena fe y, aunque nuestra revista fomenta decididamente el cumplimiento de los criterios de autoría del *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE), respeta la información original brindada por los autores. Ante una solicitud para excluir o incluir autores, los editores no pueden ser árbitros o determinar qué proceso cumplió o no cada uno de los autores (3). Por lo tanto, se siguen flujogramas de decisión establecidos por el *Committee on Publication Ethics* (COPE), según los cuales el proceso editorial del manuscrito se detiene hasta que los involucrados expresen conformidad con los cambios realizados en la autoría y, de no llegar a un acuerdo unánime, la institución o las instituciones donde se llevó a cabo la investigación deben ser quienes lo determinen (4).

En tercer lugar, nos parece importante poner los hallazgos en el contexto adecuado. En la publicación de Wislar, citada por los autores, se aprecia como un gran logro el haber disminuido a 21 % la autoría honoraria en varias revistas con alto factor de impacto, muchas de ellas consideradas como ‘revistas top’. Los problemas de autoría no son, entonces, propios de nuestra revista o nuestro país y existen en las mejores publicaciones internacionales (2). Frente a estos problemas, en la actualidad hay nuevas propuestas de autoría como la contenida en *The Structured Contributor Role Taxonomy* (CRediT), que, además de dar transparencia y reconocimiento de las contribuciones de los investigadores, aspira a dar información más precisa sobre las contribuciones de cada investigador y permite identificar revisores y especialistas que han tenido una variedad de roles en la investigación, lo cual permite una visión más holística de sus contribuciones a los resultados de los estudios (5,6).

Conflicto de intereses:

Hugo Arroyo Hernández es editor de la *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, y Lely Solari es miembro del Comité Editor.

Correspondencia:

Hugo Arroyo Hernández, Instituto Nacional de Salud, Cápac Yupanqui 1400, Lima, Perú
hugoarroyo2007@gmail.com

Los editores de revistas se enfrentan con frecuencia a problemas de autoría que se manejan antes de la publicación de un artículo y, en general, las buenas prácticas en las publicaciones científicas de ciencias de la salud deben ser impulsadas de todas las maneras posibles. Sin embargo, parte del proceso de mejoramiento debería incluir una práctica metodológicamente exhaustiva en las publicaciones relacionadas con bibliometría, para evitar puntos de vista que pudieran crear visiones negativamente sesgadas sobre nuestras revistas.

Hugo Arroyo Hernández,
Oficina General de Información y Sistemas, Instituto Nacional de Salud, Lima,
Perú

Lely Solari
Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú

Referencias

1. Zafra-Tanaka JH, Roca C, Canari-Casano JL, Vargas-Calla A. Autoría de regalo: una aproximación a su frecuencia en una revista peruana. *Biomédica*. 2019;39:323-9. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4316>
2. Wislar JS, Flanagan A, Fontanarosa PB, Deangelis CD. Honorary and ghost authorship in high impact biomedical journals: A cross sectional survey. *BMJ*. 2011;343:d6128. <https://doi.org/10.1136/bmj.d6128>
3. International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). Defining the role of authors and contributors, 2018. Fecha de consulta: 17 de julio de 2019. Disponible en: <http://www.icmje.org/recommendations/browse/roles-and-responsibilities/defining-the-role-of-authors-and-contributors.html>
4. Committee on Publication Ethics (COPE). How to recognize potential authorship problems. Fecha de consulta: 17 de julio de 2019. Disponible en: https://publicationethics.org/files/Recognise_Potential_Authorship_Problems.pdf
5. Holcombe A. Farewell authors, hello contributors. *Nature*. 2019;571:147. <https://doi.org/10.1038/d41586-019-02084-8>
6. Allen L, O'Connell A, Kiermer V. How can we ensure visibility and diversity in research contributions? How the Contributor Role Taxonomy (CRediT) is helping the shift from authorship to contributorship. *Learned Publishing*. 2019;32:71-4. <https://doi.org/10.1002/leap.1210>

Lima, 21 de agosto, 2019

Señores
Comité Editorial
Revista *Biomédica*

Estimados señores:

Hemos leído la carta escrita por los editores de la *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* y consideramos que no tenemos más que agregar. Por ese motivo vamos a optar por no responderla.

Saludos,
Jessica Zafra Tanaka
Autora de correspondencia