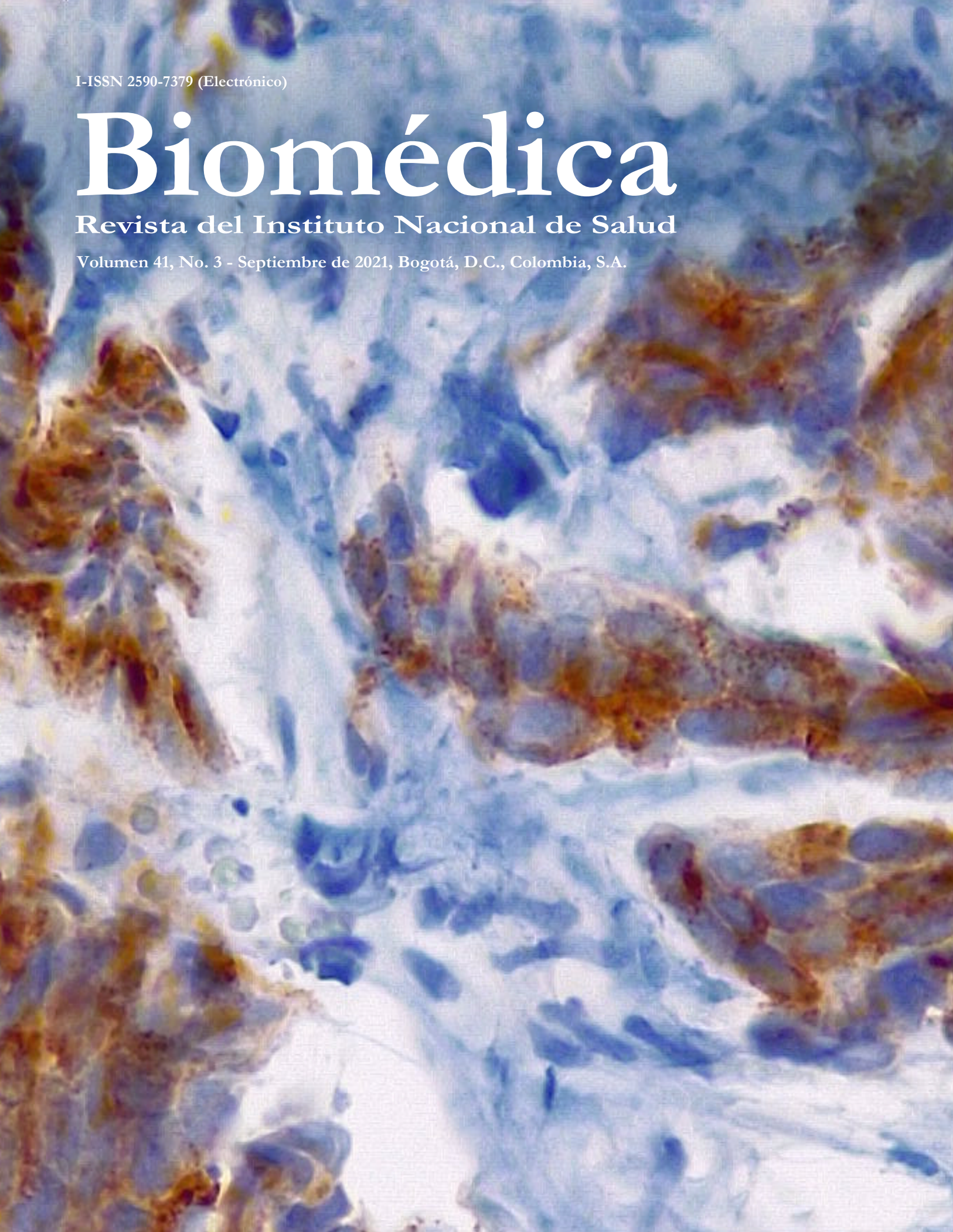


I-ISSN 2590-7379 (Electrónico)

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

Volumen 41, No. 3 - Septiembre de 2021, Bogotá, D.C., Colombia, S.A.



Portada: Tinción de inmunohistoquímica para cromogranina, 40X. Nótese la fuerte positividad citoplasmática y homogénea de las células neoplásicas.

Microscopio Leica, modelo 750, con cámara ICC-50

Gabriel Jaime Varela, Laboratorio de Patología Oncológica y Dermatopatología P.O.D., Medellín, Colombia

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 41, No. 3 - Bogotá, D.C., Colombia - Septiembre de 2021

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

JULIÁN ALFREDO FERNÁNDEZ-NIÑO
Universidad del Norte
Barranquilla, Colombia

JOSÉ MORENO-MONTOYA
Fundación Santa Fe de Bogotá
Bogotá, D.C., Colombia

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

ERIKA SANTAMARÍA
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

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

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

MAGDALENA WIESNER
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, D.C., Colombia

Comité Científico

ARNOLDO BARBOSA
Universidad del Tolima
Ibagué, Colombia

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

JORGE H. BOTERO
Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia

GUSTAVO ALONSO CABRERA
Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia

VÍCTOR CÁRDENAS
University of Arkansas
Little Rock, AK, Estados Unidos

ALBERTO CONCHA-EASTMAN
Guatapé, Colombia

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

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

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

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

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

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

JORGE HERNANDO DONADO
Universidad Pontificia Bolivariana
Medellín, Colombia

CARLOS ANDRÉS FANDIÑO
Universidad del Valle
Cali, Colombia

JOSÉ FIGUEROA
World Health Organization
Ginebra, Suiza

LUIS FERNANDO GARCÍA
Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia

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

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

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

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

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

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

ERNESTO JARAMILLO
Organización Mundial de la Salud
Ginebra, Suiza

MARCELO LABRUNA
Universidade de São Paulo
São Paulo, Brasil

JAIR LIZARAZO
Hospital Universitario Erasmo Meoz
Cúcuta, Colombia

JUAN GUILLERMO McEWEN
Corporación para Investigaciones
Biológicas
Medellín, Colombia

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

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

GERZAIN 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 Seriadas Científicas y Tecnológicas Colombianas* de Colciencias y del *Índice Latinoamericano de Revistas Científicas y Tecnológicas (LATINDEX)*.

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

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

Contenido

Editorial

Momento difícil para la salud y el bienestar de la niñez <i>Ernesto Durán-Strauch</i>	384
--	-----

Reporte de caso

Definición diagnóstica en una familia con <i>malattia leventinese</i> en Colombia <i>Nancy Gelvez, Paula Hurtado-Villa, Silvia Flórez, Anne Charlotte Brieke, Francisco Rodríguez, Ana María Bertolotto, Martha L. Tamayo</i>	388
Histiocitosis de células de Langerhans: reporte de caso y revisión de la literatura <i>Miguel Ángel Medina, Wendy Meyer, Carolina Echeverri, Natalia Builes</i>	396
Análisis farmacogenético retrospectivo de una paciente pediátrica en tratamiento anticoagulante: caso clínico <i>Mirta Cavieres, Marcelo Suárez, Gabriel Verón, Luis Abel Quiñones, Nelson Miguel Varela</i>	403
¿Carcinoma de mama o carcinoma de glándula sudorípara? Presentación de dos casos y análisis de la literatura <i>Mauricio Luján, Gabriel Varela, Diego Morán</i>	409
Psoriasis verrugosa en un hombre con antecedentes de psoriasis en placa, reporte de caso y revisión de la literatura <i>Javier Hernández, Ana Ruiz, Carolina Mesa, Lina Rodríguez</i>	420

Artículo original

Consecuencias de los conflictos armados en la salud mental de niños y adolescentes: revisión de revisiones de la literatura <i>Sandra Piñeros-Ortiz, Jaime Moreno-Chaparro, Nathaly Garzón-Orjuela, Zulma Urrego-Mendoza, Daniel Samacá-Samacá, Javier Eslava-Schmalbach</i>	424
Nueva actividad de los timocitos estimulada por el veneno de la serpiente de cascabel (<i>Crotalus durissus cumanensis</i>) <i>María M. Pulido-Méndez, Elvia Azuaje, Alexis Rodríguez-Acosta</i>	449
Niveles de micronutrientes en niños escolares colombianos e inseguridad alimentaria <i>Constanza Marín, Henry Oliveros, Eduardo Villamor, Mercedes Mora</i>	458
Frecuencia de positividad de la prueba de intradermorreacción a tuberculina en una cohorte de pacientes con artritis reumatoide <i>Wilson Bautista-Molano, Liza González, Daniel Fernández-Ávila, Rosa Cardozo, Óscar Ruiz</i>	472
Efecto de la inmunoterapia con alérgenos específicos en pacientes pediátricos con asma atendidos en una institución de salud de Colombia <i>Jorge Andrés Puerto, Susana Uribe, Víctor Calvo, Ricardo Cardona</i>	481
Malformaciones esqueléticas y alteraciones del crecimiento en fetos de ratas con diabetes moderada <i>Tahiry Gómez, Milagros García, Leticia Bequer, Cindy Freire, María Aimee Vila, Sonia Clapés</i>	493
Consumo crónico de edulcorantes en ratones y su efecto sobre el sistema inmunitario y la microbiota del intestino delgado <i>Jorge Alberto Escoto, Beatriz Elina Martínez-Carrillo, Ninfa Ramírez-Durán, Hugo Ramírez-Saad, José Félix Aguirre-Garrido, Roxana Valdés-Ramos</i>	504
Subtipos del carcinoma luminal de mama según el consenso de Saint Gallen en un grupo de pacientes venezolanas <i>Ángel Fernández-Tortolero, Aldo Reigosa-Yániz</i>	531
Evidencia mundial sobre el retraso del crecimiento infantil desde una perspectiva de salud pública: revisión sistemática <i>Paola Rueda-Guevara, Natalia Botero-Tovar, Kenny Margarita Trujillo, Andrea Ramírez</i>	541

Actualización

Retos y oportunidades en el estudio de vesículas extracelulares: contexto institucional a nivel mundial y situación actual en Colombia <i>Susana Novoa-Herrán</i>	555
--	-----

Revisión de tema

Sarcopenia y albúmina sanguínea: revisión sistemática con metaanálisis <i>Jack Roberto Silva-Fhon, Violeta Magdalena Rojas-Huayta, Juan Pablo Aparco-Balboa, Bernardo Céspedes-Panduro, Rosalina Aparecida Partezani-Rodrigues</i>	590
---	-----

Corrección de autores.....	604
----------------------------	-----

Contents

Editorial

A difficult time for children's health and wellbeing <i>Ernesto Durán-Strauch</i>	384
--	-----

Case report

Diagnostic definition of <i>malattia leventinese</i> in a family from Colombia <i>Nancy Gelvez, Paula Hurtado-Villa, Silvia Flórez, Anne Charlotte Brieke, Francisco Rodríguez, Ana María Bertolotto, Martha L. Tamayo</i>	388
Langerhans cell histiocytosis: Case report and literature review <i>Miguel Ángel Medina, Wendy Meyer, Carolina Echeverri, Natalia Builes</i>	396
Retrospective pharmacogenetic analysis of a pediatric patient under anticoagulant treatment: Clinical case <i>Mirta Cavieres, Marcelo Suárez, Gabriel Verón, Luis Abel Quiñones, Nelson Miguel Varela</i>	403
Breast carcinoma or sweat gland carcinoma? A report of two cases and a comparison with the literature <i>Mauricio Luján, Gabriel Varela, Diego Morán</i>	409
Verrucous psoriasis in a male patient with a history of vulgar psoriasis: Case report and literature review <i>Javier Hernández, Ana Ruiz, Carolina Mesa, Lina Rodríguez</i>	420

Original article

Mental health consequences of armed conflicts in children and adolescents: An overview of literature reviews <i>Sandra Piñeros-Ortiz, Jaime Moreno-Chaparro, Nathaly Garzón-Orjuela, Zulma Urrego-Mendoza, Daniel Samacá-Samacá, Javier Eslava-Schmalbach</i>	424
A novel activity on thymocytes cells exerted by the rattlesnake (<i>Crotalus durissus cumanensis</i>) venom <i>María M. Pulido-Méndez, Elvia Azuaje, Alexis Rodríguez-Acosta</i>	449
Food Insecurity and micronutrient status biomarkers in school-age Colombian children <i>Constanza Marín, Henry Oliveros, Eduardo Villamor, Mercedes Mora</i>	458
Frequency of positivity of the tuberculin intradermoreaction test in a cohort of patients with rheumatoid arthritis <i>Wilson Bautista-Molano, Liza González, Daniel Fernández-Ávila, Rosa Cardozo, Óscar Ruiz</i>	472
Impact of the allergen-specific immunotherapy in pediatric patients with asthma treated at a health institution in Colombia <i>Jorge Andrés Puerto, Susana Uribe, Víctor Calvo, Ricardo Cardona</i>	481
Skeletal malformations and growth disturbances in fetuses of mild diabetic rats <i>Tahiry Gómez, Milagros García, Leticia Bequer, Cindy Freire, María Aimee Vila, Sonia Clapés</i>	493
Chronic consumption of sweeteners in mice and its effect on the immune system and the small intestine microbiota <i>Jorge Alberto Escoto, Beatriz Elina Martínez-Carrillo, Ninfa Ramírez-Durán, Hugo Ramírez-Saad, José Félix Aguirre-Garrido, Roxana Valdés-Ramos</i>	504
Subtypes of luminal breast carcinoma according to the Saint Gallen Consensus in a group of Venezuelan patients <i>Ángel Fernández-Tortolero, Aldo Reigosa-Yániz</i>	531
Worldwide evidence about infant stunting from a public health perspective: A systematic review <i>Paola Rueda-Guevara, Natalia Botero-Tovar, Kenny Margarita Trujillo, Andrea Ramírez</i>	541

Update

Challenges and opportunities in the study of extracellular vesicles: Global institutional context and national state of the art <i>Susana Novoa-Herrán</i>	555
---	-----

Topic review

Sarcopenia and blood albumin: A systematic review with meta-analysis <i>Jack Roberto Silva-Fhon, Violeta Magdalena Rojas-Huayta, Juan Pablo Aparco-Balboa, Bernardo Céspedes-Panduro, Rosalina Aparecida Partezani-Rodrigues</i>	590
---	-----

Author correction.....	604
------------------------	-----

Editorial

Momento difícil para la salud y el bienestar de la niñez

En febrero de 2020 la Comisión OMS-UNICEF-Lancet, creada para analizar la situación de salud de la niñez a nivel global, publicó su informe. En él señalaba:

“[...] A pesar de los extraordinarios progresos logrados en los últimos decenios en lo concerniente a supervivencia, nutrición y educación, los niños afrontan actualmente un futuro incierto. El cambio climático, la degradación ecológica, las poblaciones migrantes, los conflictos, la desigualdad generalizada y las prácticas comerciales depredadoras [...],

amenazan la salud y el futuro de los niños en todos los países (1).

El informe marcó un giro en la agenda de salud y bienestar de la niñez centrada en el control de las enfermedades transmisibles y la desnutrición, y propuso ampliarla para incluir las enfermedades crónicas y otros problemas derivados de las intervenciones del hombre en su entorno natural y social.

El informe se ubica en la “transición epidemiológica” en la salud de la niñez en los países de ingresos altos a finales del siglo pasado y en aquellos de ingresos medios a principios de este siglo, circunstancia que en ese momento predominaba a nivel global. En ese contexto, se podría hablar de un “mosaico epidemiológico” en el que los problemas relacionados con el saneamiento básico y la pobreza, en disminución a nivel global y propios de los países de menos ingresos, coexisten con aquellos relacionados con la crisis ambiental, la esfera psicosocial y los comportamientos humanos de la situación de salud de la niñez, propios de los países de mayores ingresos.

Un mes después de publicado el informe, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la pandemia por COVID-19 y el mundo tomó medidas radicales para disminuir su propagación. Ello produjo un cambio profundo en los perfiles de salud y enfermedad, el cual aún no se ha acabado de caracterizar y entender plenamente. Con este brusco viraje se retornó – de alguna manera – a la primera etapa de la “transición epidemiológica” propuesta por Omran en 1971, quien caracterizó la siguiente etapa como la de “pandemias en retroceso” (2).

La sindemia¹ actual ha producido múltiples efectos en la salud y el bienestar de la niñez (3). Se incrementaron, por ejemplo, las muertes maternas (hasta el 28 de agosto de 2021 se habían presentado 361 muertes maternas tempranas en Colombia, es decir, un aumento del 35,2 % con respecto al mismo periodo de 2020, y del 87 % con respecto al 2019) (4);

Citación:

Durán-Strauch E. Momento difícil para la salud y el bienestar de la niñez. Biomédica. 2021;41:384-7.

Correspondencia:

Teléfono: 316 5000, extensiones 10298 y 10418
ejdurans@unal.edu.co

¹ *Sindemia* es un término acuñado por Singer para referirse a la interacción de dos o más enfermedades que potencian el daño causado por cada una de ellas; en este caso, se ha usado para referirse a la coexistencia de la enfermedad con hechos sociales y económicos que afectan la salud y el bienestar de toda la población.

aumentaron las defunciones neonatales por complicaciones obstétricas (de una tasa de 35,5 muertes por cada 100.000 nacidos vivos en el segundo trimestre de 2019, el país pasó a una tasa de 63,6 en el mismo periodo de 2020) (5); se incrementó significativamente la población que vive en la pobreza (aumentó de 35,7 % en el 2019 a 42,5 % en el 2020) y en la pobreza extrema (aumentó de 9,6 % en el 2019 al 15,1 % en el 2020) (6); se deterioró la seguridad alimentaria, lo que conlleva aumento de la desnutrición (en el 2019, el 89,3 % de los hogares consumía en promedio tres comidas al día y, en junio de 2021, solo el 66,2 % lo hacía) (7), así como del sobrepeso y la obesidad (8); aumentaron los conflictos en el interior de las familias, así como los casos reportados de maltrato infantil (9.011 en el 2019 y 13.266 en el 2020, con un aumento del 47 %) (9); hubo un deterioro de la salud mental tanto de padres y cuidadores como de los niños y adolescentes (10); aumentaron las dificultades para el acceso a la educación virtual (al inicio de la pandemia, el 37,3 % de los hogares colombianos poseía computador de escritorio, portátil o tableta y el 73,8 % de los mayores de 5 años tenía celular) (11), así como la deserción escolar (12); además, disminuyó el tiempo para el juego, el deporte y las actividades al aire libre (13); aumentó la orfandad debido a la muerte de los cuidadores (14), y se incrementó la exposición a la pornografía, el ciberacoso y el engaño pederasta (*grooming*) (15).

Otro efecto de la sindemia ha sido el detrimento en la cantidad y la calidad de un número significativo de actividades de promoción, prevención, diagnóstico, atención y rehabilitación, orientadas a la niñez y la adolescencia. La encuesta Pulso Social del DANE evidenció que, en julio de 2021, el 35,7 % de las personas afirmó que se había visto obligado a faltar a citas médicas o controles de desarrollo integral infantil desde el inicio de la cuarentena (16), situación que afecta la detección temprana y la intervención oportuna en la salud de los menores. Entre las actividades que más se han visto afectadas, están los controles integrales de salud, la vacunación, el seguimiento a niños y adolescentes con enfermedades crónicas o en situación de discapacidad, los procesos de rehabilitación, los controles de la gestación, las consultas de planificación familiar y el acceso a métodos anticonceptivos, la interrupción voluntaria del embarazo, la asistencia oportuna a urgencias, los controles de salud oral y salud visual, las consultas por nutrición, y las intervenciones del Sistema Nacional de Bienestar Familiar, entre otras.

Si bien toda la población en edad pediátrica se ha visto afectada, el impacto ha sido mayor en niños y adolescentes en condición de vulnerabilidad, es decir, los más pobres, los desplazados, los migrantes, los indígenas y otras minorías étnicas, así como quienes están en instituciones de protección y en situación de discapacidad, evidenciándose no solo la vulneración de su derecho a la salud, sino de todos sus derechos.

La salud y el bienestar de la niñez y la adolescencia atraviesan, entonces, un complejo momento en el que se combinan el deterioro reciente de las condiciones de vida y de la situación nutricional de un porcentaje importante de la población, con las dificultades en el acceso a una educación de calidad, los demás efectos directos e indirectos de la sindemia, y el proceso de transición que menciona el citado informe (1), en el cual aumentan los problemas de salud derivados de las afectaciones ambientales y los hábitos de nutrición y actividad física inadecuados, y persisten las enfermedades transmisibles y los déficits nutricionales.

Hasta principios del 2020, se percibía en los discursos oficiales en Colombia un relativo optimismo en torno a la mejoría de la salud de la niñez con base en la disminución progresiva de la mortalidad infantil, la cobertura sostenida de los índices de vacunación, la disminución del embarazo adolescente y el aumento progresivo de la escolaridad desde la primera infancia, entre otros, aunque persistían problemas críticos como la mortalidad por desnutrición o asociada con esta y los altos índices de maltrato, abuso sexual y muertes violentas de adolescentes, entre otros indicadores no favorables.

Hasta el 28 de agosto de 2021, 18 meses después de iniciada la *sindemia*, la infección por COVID-19 ha producido 423.442 casos (tasa de 29,6 por 1.000), 8.015 hospitalizaciones (1,9 %), 1.327 ingresos a unidades de cuidados intensivos (0,31 %) y 234 muertes (tasa de 1,6 por 100.000) en menores de 18 años (17), y aunque estas son cifras bastante inferiores a las de los demás grupos etarios, los efectos indirectos han sido críticos para las nuevas generaciones.

Entretanto, el sistema de salud colombiano tiene sus energías y recursos centrados en la contención del COVID-19, desconociendo la gravedad de los demás problemas de salud de la niñez, los cuales requieren una pronta intervención porque están en juego la salud, y el bienestar actual y futuro de los más jóvenes.

El sistema de salud ha reaccionado en aspectos importantes como la vacunación, la cual ha tendido a recuperar las coberturas previas a la *sindemia*, pero esto no es suficiente; necesitamos prontamente *descovidificar* la agenda de salud de la niñez (18), retomando las acciones y programas que el país venía adelantando, atendiendo problemas emergentes como las repercusiones en la salud mental y mejorando la cobertura de los diferentes servicios de salud dirigidos a la población menor de 18 años, pero, sobre todo, garantizando un ingreso digno a las familias para que puedan cuidar adecuadamente a sus hijos.

Ernesto Durán-Strauch
Profesor de Pediatría y coordinador del Observatorio sobre Infancia
Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, D.C., Colombia

Referencias

1. The WHO–UNICEF– Lancet Commissioners. After COVID-19, a future for the world's children? Lancet. 2020;396:298-300. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32540-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32540-1)
2. Omran OR. The epidemiologic transition. The Milbank Memorial Fund Quarterly. 1971;49:509-38.
3. Horton, R. COVID-19 is not a pandemic. Lancet. 2020;396:874. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32000-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32000-6)
4. Instituto Nacional de Salud. Boletín epidemiológico semana 34 de 2021. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2021.
5. Fundación Éxito. Efectos del COVID-19 en la primera infancia de Colombia. No es solo una emergencia. Enero 2021. Fecha de consulta: 11 de septiembre de 2021. Disponible en: <https://docplayer.es/203519775-Efectos-del-covid-19-en-la-primera-infancia-de-colombia-no-es-solo-una-emergencia>
6. DANE. Pobreza monetaria nacional 2020. Fecha de consulta: 10 de septiembre de 2021. Disponible en: <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/pobreza-y-condiciones-de-vida/pobreza-monetaria>

7. DANE. Encuesta Pulso Social, decimosegunda ronda, junio 2021 - julio 2021. Fecha de consulta: 11 de septiembre de 2021. Disponible en: <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/encuesta-pulso-social/encuesta-pulso-social-historicos>
8. Amézquita M. El impacto de COVID-19 en la obesidad pediátrica. *Andes Pediatr.* 2021;92:501-2. <https://doi.org/10.32641/andespediatr.v92i4.3922>
9. Alianza por la Niñez Colombiana - Niñez YA. La pandemia tiene en crisis los derechos de la niñez. Febrero 2021. Fecha de consulta: 12 de septiembre de 2021. Disponible en: <http://ninezya.org/wp-content/uploads/2021/03/Pandemia-tiene-en-crisis-derechos-de-la-nin%CC%83ez-Informe-Nin%CC%83ezYA.pdf>
10. Rodríguez-Gama A. La salud mental durante la pandemia por COVID-19. *Rev Fac Med.* 2021;69:e97128. <https://doi.org/10.15446/revfac-med.v69n2.97128>
11. DANE. Boletín Técnico Indicadores básicos de tenencia y uso de tecnologías de la información y las comunicaciones en hogares y personas de 5 y más años de edad. Fecha de consulta: 12 de septiembre 2021. Disponible en: https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/tic/bol_tic_hogares_2019.pdf
12. Seusan LA, Maradiegue, R. Educación en pausa. Una generación de niños y niñas en América Latina y el Caribe está perdiendo la escolarización debido al COVID-19. 2020. Panamá: UNICEF. Fecha de consulta: 9 de septiembre de 2021. Disponible en: <https://www.unicef.org/lac/media/18251/file/Educacion-en-pausa-web-1107.pdf>
13. Villquirán AF, Ramos OA, Jácome SJ, Meza M. Actividad física y ejercicio en tiempos de COVID-19. *Rev CES Med.* 2020;especial COVID-19:51-8. <https://doi.org/10.21615/cesmedicina.34.COVID-19.6>
14. Hillis SD, Unwin HJ, Chen Y, Cluver L, Sherr L, Goldman PS, *et al.* Global minimum estimates of children affected by COVID-19-associated orphanhood and deaths of caregivers: A modelling study. *Lancet.* 2021;398:391-402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01253-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01253-8)
15. Save the Children. (Des)información sexual: pornografía y adolescencia. 2020. Madrid: Save the Children. Fecha de consulta: 10 de septiembre de 2021. Disponible en: https://www.savethechildren.es/sites/default/files/2020-09/Informe_Desinformacion_sexual-Pornografia_y_adolescencia.pdf
16. DANE. Encuesta Pulso Social, decimotercera ronda, julio 2021. Agosto 2021. Fecha de consulta: 12 septiembre de 2021. Disponible en: <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/encuesta-pulso-social/encuesta-pulso-social-historicos>
17. @pvasquezcolpicu (Pablo Vásquez-Hoyos). “#COVID19: Reporte semana 22 a 28 de agosto 2021. Colombia. Pediatría.” Twitter, 29 agosto 2021. <https://twitter.com/pvasquezcolpicu/status/1431974274735149057?s=20>
18. Durán-Strauch, E. Recuperar el tiempo perdido. *Pediatría.* 2020;53:120-1.

Reporte de caso

Definición diagnóstica en una familia con *malattia leventinese* en Colombia

Nancy Gelvez¹, Paula Hurtado-Villa², Silvia Flórez³, Anne Charlotte Brieke⁴, Francisco Rodríguez⁴, Ana María Bertolotto^{5,6}, Martha L. Tamayo¹

¹ Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia

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

³ Independiente, Cúcuta, Colombia

⁴ Fundación Oftalmológica Nacional, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, D.C., Colombia

⁵ Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

⁶ Servicio de Pediatría, Hospital Universitario San Ignacio, Bogotá, D.C., Colombia

La *malattia leventinese* es una enfermedad hereditaria autosómica dominante, cuyos síntomas se inician entre la segunda y la cuarta décadas de la vida. Se caracteriza por la aparición de drusas localizadas entre el epitelio pigmentario de la retina y la membrana de Bruch; suele reducir la visión drásticamente y progresar a ceguera. La variante patogénica p.Arg345Trp en el gen *EFEMP1* se ha asociado con esta enfermedad.

Se presenta aquí la caracterización clínica y molecular de una familia con *malattia leventinese* mediante un manejo integral que involucró a oftalmólogos, pediatras y genetistas, lo que es de gran importancia, ya que el fenotipo de esta enfermedad suele confundirse con la degeneración macular. A todos los individuos de la familia se les hizo la evaluación oftalmológica con imágenes diagnósticas de retina y extracción de ADN a partir de una muestra de sangre periférica. Todos los exones del gen *EFEMP1* se amplificaron y secuenciaron. La variante patogénica p.Arg345Trp se identificó en los individuos afectados. Este es el primer reporte de *malattia leventinese* en una familia con la variante patogénica p.Arg345Trp en Colombia. El diagnóstico molecular de las distrofias retinianas es fundamental para diferenciar este tipo de enfermedades.

Palabras clave: distrofias retinianas; epitelio pigmentario de la retina; degeneración macular; retina.

Diagnostic definition of *malattia leventinese* in a family from Colombia

The *malattia leventinese* is an autosomal dominant inherited disease whose symptoms appear between the second and fourth decades of life. It is characterized by the appearance of drusen located between the retinal pigment epithelium and the Bruch membrane. It is usually associated with low vision and may progress to blindness. The pathogenic variant p.Arg345Trp in the *EFEMP1* gene has been associated with this disease. We characterized clinically and molecularly a family with *malattia leventinese* using a comprehensive approach that involved ophthalmologists, pediatricians, and geneticists. This approach is of great importance since the phenotype of this disease is often confused with macular degeneration. All family members underwent ophthalmological evaluation and DNA extraction from a peripheral blood sample. All exons of the *EFEMP1* gene were amplified and sequenced. The pathogenic variant p.Arg345Trp was identified in affected individuals in this family.

This is the first report of *malattia leventinese* in a family with the p.Arg345Trp pathogenic variant in Colombia. The molecular diagnosis of retinal dystrophies is essential to differentiate this type of pathology.

Keywords: Retinal dystrophies; retinal pigment epithelium; macular degeneration; retina.

La *malattia leventinese* es una rara enfermedad degenerativa de herencia autosómica dominante que afecta la mácula (1-3) y causa pérdida grave de la visión o ceguera legal (4). También se la conoce como distrofia retiniana en panal de abejas de Doyne.

La enfermedad generalmente se manifiesta entre los 20 y los 40 años de edad, pero puede aparecer en la niñez o en la tercera edad (2). Un rasgo característico temprano de la *malattia leventinese* es la presencia en distribución radial de unos depósitos extracelulares denominados drusas, que suelen tener aspecto de “panal de abejas” y que se acumulan entre el

Recibido: 06/07/2020

Aceptado: 25/02/2021

Publicado: 08/03/2021

Citación:

Gelvez N, Hurtado-Villa P, Flórez S, Brieke AC, Rodríguez F, Bertolotto AM, Tamayo ML. Definición diagnóstica en una familia con *malattia leventinese* en Colombia. Biomédica. 2021;41:388-95. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5604>

Correspondencia:

Marta L. Tamayo, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 No 40-62, edificio 32, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 320 8320, extensión 2793
mtamayo@javeriana.edu.co

Contribución de los autores:

Nancy Gelvez: estudios moleculares y correlación genotipo-fenotipo
Paula Hurtado-Villa: estudios moleculares, correlación genotipo-fenotipo y asesoría genética
Silvia Flórez y Francisco Rodríguez: diagnóstico clínico
Anne Charlotte Brieke: diagnóstico clínico, recopilación de exámenes paraclínicos
Ana María Bertolotto: correlación genotipo-fenotipo y recopilación de exámenes paraclínicos
Martha L. Tamayo: correlación genotipo-fenotipo y asesoría genética

Financiación:

Este proyecto fue financiado por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, proyecto 120372453645, contrato 656-2015 “Programa de atención integral a familias con enfermedades huérfanas con componente visual y auditivo – AIVA” y la Fundación Derecho a la Desventaja (FUNDALDE), Bogotá, D.C., Colombia.

Conflicto de intereses:

Los autores manifiestan no tener conflicto de intereses.

epitelio pigmentario de la retina y la membrana de Bruch (1,2). En una etapa más tardía de la enfermedad, se presenta una variedad de características clínicas e histopatológicas, incluidos la atrofia geográfica, los cambios en la pigmentación y la nueva irrigación coroidea, los cuales pueden llevar a disminución de la agudeza visual (2).

La *malattia leventinese* fue descrita por primera vez en individuos originarios del valle Leventina, en el sur de Suiza, de ahí su nombre (5). Hasta el momento, solo se ha reportado una variante patogénica en el gen *EFEMP1* como causante de la enfermedad, la c.1033C>T/p.Arg345Trp (1,6,7), la cual se ha detectado en población sueca, británica, australiana, norteamericana, japonesa y coreana (8).

Las drusas típicas de esta condición son acumulaciones de material extracelular, localizadas inmediatamente debajo del epitelio pigmentario de la retina (9), las cuales pueden ser una manifestación del proceso normal de envejecimiento o representar un signo importante asociado con enfermedades de la retina (10). La degeneración macular relacionada con la edad se caracteriza actualmente por la presencia de drusas y muchos fenotipos de drusas retinianas se agrupan bajo esta denominación. Esta es una enfermedad heterogénea y se han identificado hasta 34 *loci* diferentes (11). Son pocos los reportes relacionados con la *malattia leventinese*, lo que hace interesante su estudio y diferenciación diagnóstica con respecto a la degeneración macular relacionada con la edad.

En el presente estudio, se hicieron la evaluación oftalmológica completa y el estudio molecular del gen *EFEMP1* en una familia colombiana con tres individuos afectados.

Población de estudio

Se incluyeron cinco individuos: tres mujeres afectadas y dos individuos sanos. Esta familia es natural de Barranquilla y en la consulta de genética médica se logró determinar que tenía ancestros del sur de Suiza (figura 1).

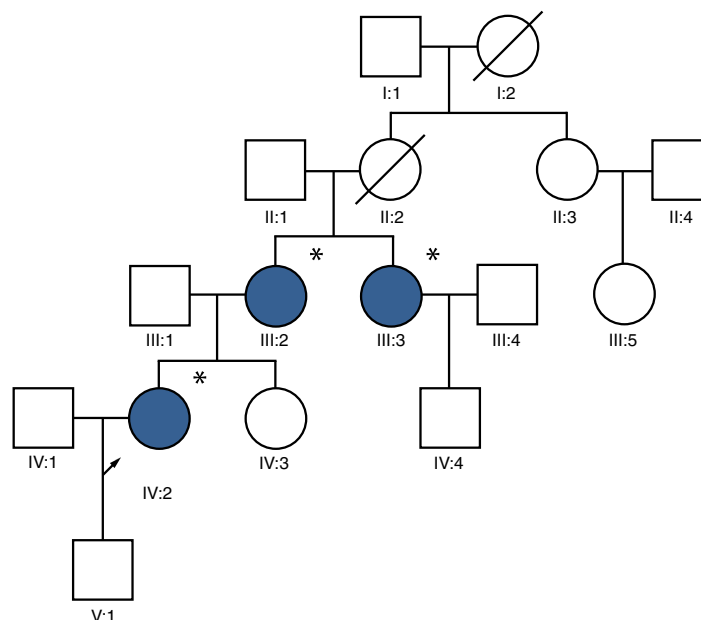


Figura1. Árbol genealógico de una familia colombiana con *malattia leventinese*

Evaluación clínica

Todos los individuos fueron evaluados por un oftalmólogo especializado en retina y vítreo. Se les practicaron exámenes paraclínicos a dos de las tres mujeres afectadas (figura 1), pero en la tercera no fue posible hacerlo. En el caso de la paciente IV:2, estos se hicieron a los 27 años de edad y, en la paciente III:2, a los 41 años. Los exámenes incluyeron campo visual, angiografía con fluoresceína y electroretinograma. El análisis molecular se realizó en los laboratorios del Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana Bogotá.

Análisis del gen *EFEMP1*

Se tomaron muestras de sangre periférica a los cinco individuos incluidos en el estudio. El ADN se extrajo mediante la técnica de fenol-cloroformo y se hicieron análisis de secuenciación bidireccional de Sanger de los 12 exones del gen *EFEMP1*.

Las condiciones de temperatura fueron las siguientes: 95 °C durante 10 segundos, 50 °C durante 5 segundos y 60 °C durante 4 minutos para 35 ciclos. La precipitación de la reacción de secuenciación se hizo con el método de etanol. Las secuencias se analizaron con un equipo ABI-PRISM 3100-Avant™ (Applied Biosystems) usando el estuche de secuenciación BigDye Terminator™, versión 3.1 (Applied Biosystems). Por último, se analizaron las secuencias con el programa SeqScape™ (Applied Biosystems). El procedimiento utilizado para la secuenciación fue el siguiente: una vez obtenido el producto de PCR, se purificó y se hizo la reacción de secuenciación con 2 µl de BigDye, 2 µl de solución tampón 5X, 1 µl de iniciador y 5 µl del producto purificado.

La secuencia consenso utilizada para el gen *EFEMP1* fue la ENST00000355426.8, obtenida en https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000115380;r=2:55865967-55924139;t=ENST00000355426.

Consideraciones éticas

Todos los individuos incluidos firmaron el consentimiento informado, aceptando la toma de muestras y la utilización de los datos de la historia clínica, así como su publicación. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Pontificia Universidad Javeriana. El protocolo se apega a la normatividad vigente contemplada en la Declaración de Helsinki de Fortaleza (Brasil) 2013 y la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

Hallazgos clínicos

Los exámenes paraclínicos se hicieron en dos de las tres mujeres afectadas de la familia (figura 1, cuadro 1). La paciente IV:2 fue valorada por presentar nictalopía como primer síntoma; refirió que su madre y una tía presentaban la enfermedad macular (III:2 y III:3). La mujer tenía alteración bilateral del epitelio pigmentario de la retina, con pigmentación fina, adelgazamiento retiniano macular, visualización de los vasos coroideos y drusas alrededor de la mácula (figura 2). Las alteraciones detectadas eran sugestivas de tres diagnósticos: a) drusas laminares hereditarias, b) retinitis *punctata albecens*, una variante de la retinosis pigmentosa, o c) retina pecosa (grupo de enfermedades caracterizado por múltiples

lesiones blancoamarillentas en el fondo de ojo (*fundus albipunctatus*, *fundus flavimaculatus*, drusas familiares y retina en “flecós” de Kandori). El seguimiento del caso evidenció que la enfermedad progresaba y se asociaba clínicamente con disminución de la visión.

La paciente III:2 presentaba disminución progresiva de la visión desde los 34 años. El diagnóstico inicial fue de *fundus flavimaculatus*, ya que en la angiografía que le practicaron a esa edad se reportó hiperfluorescencia del área macular con acumulaciones pigmentarias localizadas, que parecían corresponder a una degeneración macular relacionada con la edad y probablemente asociada con un *fundus albipunctatus*. Posteriormente, a la edad de 41 años, recibió un segundo diagnóstico posible, el de distrofia de retina (enfermedad de Stargardt) (cuadro 1) y, a los 48 años, en otra angiografía con fluoresceína, se evidenció una hiperfluorescencia moteada en toda el área macular que permaneció estable a lo largo de las fases de estudio, así como una hiperfluorescencia relativa del nervio óptico en ambos ojos.

Cuadro 1. Resultados de los exámenes clínicos y paraclínicos de los individuos afectados

	Paciente IV:2	Paciente III:2
Edad (años)	27	41
Agudeza visual	OD: 20/25; OI: 20/25	OD: 20/60; OI: 20/25
Electrorretinograma	Estimulación fotópica y escotópica normal en ambos ojos	Estimulación fotópica y escotópica disminuida en ambos ojos
Angiografía con fluoresceína	Múltiples puntos amarillentos hiperfluorescentes en patrón radiado sugestivos de drusas en polo posterior en ambos ojos	Región hiperfluorescente en el área de la fovea que alterna con puntos hiperfluorescentes alrededor en ambos ojos
Campimetría	Defecto peripapilar asociado con defecto macular incipiente en ambos ojos	OD: prueba de escasa confiabilidad por numerosas pérdidas de fijación. Los cambios sugieren disminución generalizada de la sensibilidad asociada con defecto temporal superior profundo. OI: escasa confiabilidad por numerosas pérdidas de fijación. Los cambios sugieren disminución generalizada de la sensibilidad asociada con defecto temporal superior profundo y defecto paracentral inferior moderado.

OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo

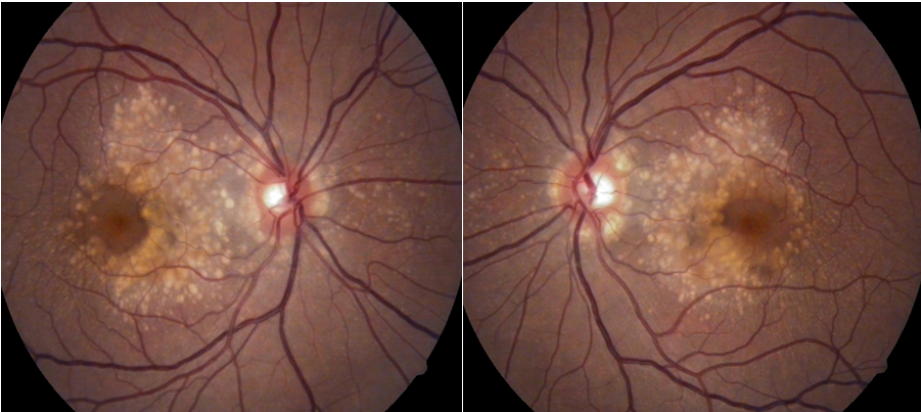


Figura 2. Foto del fondo de ojo de la paciente IV:2. En la angiografía con fluoresceína se aprecia el patrón de las drusas.

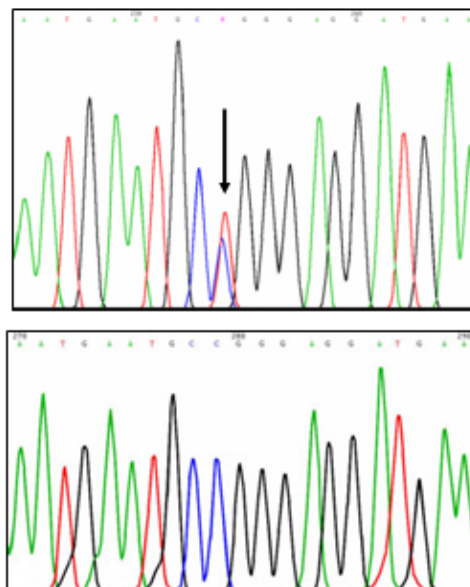


Figura 3. Electroferograma de la variante patológica p.Arg345Trp en el gen *EFEMP1*. Arriba: secuencia con variante patológica. Abajo: secuencia normal

A la paciente III:3, afectada también con disminución de la agudeza visual, no fue posible practicarle los exámenes paraclínicos. Sin embargo, en el examen de fondo de ojo se observaron lesiones amarillentas centrales en el área macular y otras con distorsión del área de la fóvea alternando con áreas de hiperpigmentación.

Los otros dos individuos incluidos en el estudio (IV:3 y IV:4) no presentaban disminución de la agudeza visual y en el examen del fondo de ojo no se reportaron alteraciones evidentes. Cabe destacar que el hijo de la paciente IV:2 era un menor de edad asintomático, razón por la cual no se le tomó muestra para el estudio molecular. En el examen del oftalmólogo pediatra, no se reportaron alteraciones en la retina.

Análisis molecular del gen *EFEMP1*

En los individuos III:2, III:3 y IV:2, se detectó la variante patológica p.Arg345Trp en el gen *EFEMP1* en estado heterocigoto (figura 3). Esta variante no se halló en los individuos sanos IV:3 y IV:4.

Discusión

La correlación entre los hallazgos clínicos de las tres mujeres afectadas, los resultados del estudio molecular y el antecedente familiar de ancestros originarios del valle del Leventino en el sur de Suiza, llevó al diagnóstico de enfermedad del valle Leventina (*malattia leventinese*), degeneración macular que conlleva disminución de la agudeza visual a edades tempranas, caracterizada por la presencia de drusas pequeñas de disposición radial en la periferia y drusas grandes confluyentes en el centro de la mácula, también conocidas como drusas dominantes o familiares.

La enfermedad fue inicialmente descrita en 1925 por Vogt en pacientes del valle del Leventino en Suiza. Lo usual es que se inicie de forma simétrica entre la segunda y la cuarta décadas de la vida, en algunos casos, con disminución

de la agudeza visual o metamorfopsias; no obstante, muchas otras personas pueden permanecer asintomáticas hasta edades más avanzadas.

El principal diagnóstico diferencial por fenotipo es la distrofia retiniana en panal de abejas de Doyme (3) y, aunque algunos autores han planteado que probablemente se trate de la misma enfermedad (2), otros afirman que son diferentes y que se distinguen por la variable disposición de las drusas; lo clásico en la *malattia leventinese* es que se sitúen en un patrón radial o radio de rueda (5). Otro diagnóstico diferencial es la degeneración macular relacionada con la edad, pero debe tenerse en cuenta que la principal diferencia está en la edad de inicio de la enfermedad, pues en la *malattia leventinese* generalmente se inicia entre la segunda y la cuarta décadas de la vida, en tanto que la degeneración macular aparece en edades más avanzadas (2,4).

La variante patogénica p.Arg345Trp, identificada en esta familia, es la única asociada con la enfermedad hasta el momento en diferentes poblaciones (1,5-8). En los estudios en pacientes de diferentes etnias, solo una vez se logró determinar esta variante en un ancestro común de origen suizo (1).

La edad de inicio de la enfermedad coincide con lo reportado por otros autores, ya que las mujeres afectadas manifestaron los primeros síntomas a los 27 y los 28 años. Como ya se dijo, los síntomas generalmente aparecen entre los 20 y los 40 años (12); sin embargo, en estas pacientes el diagnóstico clínico no se estableció a la edad de inicio de los síntomas, sino más tarde. Los hallazgos característicos incluyen drusas de inicio temprano en el polo posterior, a menudo dispuestas en una configuración radial, así como depósitos en el margen del disco óptico, drusas nasales en el disco óptico, atrofia del epitelio pigmentario de la retina en la mácula y la formación de membranas neovasculares subretinianas (13).

En la paciente III:2, los exámenes paraclínicos se practicaron de forma tardía, a pesar de que los síntomas oculares comenzaron a los 28 años, pero solo se detectaron cambios pigmentarios retinianos inespecíficos y muy avanzados que no permitieron hacer un diagnóstico; algo similar ocurrió con su hermana (paciente III:3). Por el contrario, al consultar al oftalmólogo especialista en retina y vítreo, la paciente IV:2, cuyos síntomas se iniciaron a los 27 años, fue remitida a genética con sospecha de una alteración retiniana hereditaria. En la consulta de genética médica, se detectaron los casos de los otros familiares, se identificó el patrón hereditario de la enfermedad y se encontró un ancestro originario del sur de Suiza.

Por último, fue el estudio molecular del gen *EFEMP1* lo que permitió el diagnóstico clínico en esta familia. En el cuadro 1 se presentan los hallazgos de los exámenes paraclínicos de las pacientes IV:2 y III:2. Es importante resaltar que las manifestaciones clínicas son más evidentes y características de la enfermedad en etapa temprana. En la angiografía con fluoresceína de la paciente IV:2, se halló el patrón de drusas (figura 2), en tanto que, en la paciente III:2, no se evidenció una diferenciación de este patrón.

El hecho de que uno o varios individuos de una misma familia consulten muy tardíamente, o lo hagan por separado, lleva a que los servicios de oftalmología general no sospechen la condición hereditaria y los afectados no obtengan un diagnóstico específico en muchos años. Este es un llamado a los oftalmólogos generales y a los especializados en retina y vítreo a indagar más exhaustivamente sobre los antecedentes familiares y a remitir

al genetista casos como este, en el que no se había indagado ni preguntado sobre el origen suizo de la familia.

El gen *EFEMP1* codifica para la proteína fibulina-3, una glucoproteína de matriz extracelular. Aunque su función aún no se comprende por completo, hay hallazgos que la involucran en una gran cantidad de procesos fisiopatológicos (14). Los datos recopilados sugieren que una mutación en este gen puede inducir la enfermedad mediante un mecanismo de ganancia de función (1). Se ha propuesto que la acumulación de fibulina-3 mal plegada en el retículo endoplasmático de las células del epitelio pigmentario retiniano induce al estrés de dicho retículo y la activación de la reacción de proteína desplegada (*unfolded protein response*, UPR) (15). Esta reacción es una cascada de señalización celular adaptativa que facilita las vías de eliminación y degradación de las proteínas del retículo endoplasmático (16), proceso que podría estimular la aparición de características reconocidas de la *malattia leventinese*, incluida la disfunción del epitelio pigmentario retiniano, la apoptosis, la eventual atrofia y la nueva irrigación coroidea (15).

El diagnóstico molecular de las distrofias maculares relacionadas con la edad es cada vez más relevante, pues permite precisar el diagnóstico. Se han descrito distrofias maculares monogénicas que también se caracterizan principalmente por drusas del polo posterior (13). El diagnóstico molecular abre la posibilidad de un tratamiento oportuno que permita retrasar la progresión de enfermedades que amenazan la visión, como la *malattia leventinese*.

Además, es importante que los pediatras y los oftalmólogos con subespecialidad en pediatría estén alerta cuando haya menores de edad en familias con una enfermedad autosómica dominante, pues existe una probabilidad del 50 % de heredar el gen afectado. El dilema ético implícito en la decisión de hacer la prueba molecular está entre hacer un diagnóstico precoz que puede beneficiar la calidad de vida del niño y enfrentar las consecuencias muy bien conocidas de hacer un diagnóstico molecular presintomático.

En este caso, se propuso a los padres hacer un seguimiento clínico oftalmológico permanente, de manera que, al momento de evidenciarse el más mínimo síntoma o signo de la enfermedad, se procediera a la prueba molecular a partir de una sospecha diagnóstica específica. De ahí que sea preciso alertar a los especialistas pediátricos a estar atentos ante este tipo de situaciones.

Dado que no ha habido reportes previos de esta enfermedad en una familia colombiana, este estudio brinda una herramienta muy útil para la asesoría genética y una base para futuros estudios relacionados con los diagnósticos diferenciales de la degeneración macular relacionada con la edad.

Agradecimientos

Agradecemos especialmente a la familia afectada por participar en el estudio, al Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana, a la Fundación Oftalmológica Nacional (FUNDONAL), a la Fundación Derecho a la Desventaja (FUNDALDE) y al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación.

Referencias

1. Stone EM, Lotery AJ, Munier FL, Heón E, Piguet B, Guymer RH, *et al.* A single *EFEMP1* mutation associated with both *Malattia Leventinese* and Doyme honeycomb retinal dystrophy. *Nat Genet.* 1999;22:199-202. <https://doi.org/10.1038/9722>
2. Marmorstein LY, Munier FL, Arsenijevic Y, Schorderet DF, McLaughlin PJ, Chung D, *et al.* Aberrant accumulation of *EFEMP1* underlies drusen formation in *Malattia Leventinese* and age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:13067-72. <https://doi.org/10.1073/pnas.202491599>
3. Souied EH, Leveziel N, Letien V, Darmon J, Coscas G, Soubrane G. Optical coherent tomography features of *Malattia Leventinese*. *Am J Ophthalmol.* 2006;141:404-7. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2005.09.001>
4. Johnson LV, Anderson DH. Age-related macular degeneration and the extracellular matrix. *N Engl J Med.* 2004;351:320-2. <https://doi.org/10.1056/NEJMp048131>
5. Pager CK, Sarin LK, Federman JL, Eagle R, Hageman G, Rosenow J, *et al.* *Malattia Leventinese* presenting with subretinal neovascular membrane and hemorrhage. *Am J Ophthalmol.* 2001;131:517-8. [https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(00\)00821-7](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(00)00821-7)
6. Matsumoto M, Traboulsi EI. Dominant radial drusen and Arg345Trp *EFEMP1* mutation. *Am J Ophthalmol.* 2001;131:810-2. [https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(00\)00926-0](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(00)00926-0)
7. Guymer R. The genetics of age-related macular degeneration. *Clin Exp Optom.* 2001;84:182-9. <https://doi.org/10.1111/j.1444-0938.2001.tb05023.x>
8. Zhan T, Xie X, Cao G, Jiang H, Wu S, Su Z, *et al.* *Malattia Leventinese*/Doyme honeycomb retinal dystrophy in a Chinese family with mutation of the *EFEMP1* gene. *Retina.* 2014;34:2462-71. <https://doi.org/10.1097/IAE.0000000000000259>
9. Khan KN, Mahroo OA, Khan RS, Mohamed MD, McKibbin M, Bird A, *et al.* Differentiating drusen: Drusen and drusen-like appearances associated with ageing, age-related macular degeneration, inherited eye disease and other pathological processes. *Prog Retin Eye Res.* 2016;53:70-106. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2016.04.008>
10. Ardeljan D, Chan CC. Aging is not a disease: Distinguishing age-related macular degeneration from aging. *Prog Retin Eye Res.* 2013;37:68-89. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.07.003>
11. Guymer RH. Splitting the lumps: The importance of phenotyping drusen. *Ophthalmol.* 2018;125:6-7. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.09.007>
12. Narendran N, Guymer RH, Cair M, Baird PN. Analysis of the *EFEMP1* gene in individuals and families with early onset drusen. *Eye (Lond.).* 2005;19:11-5. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6701435>
13. Michaelides M, Jenkins SA, Brantley MA, Andrews RM, Waseem N, Luong V, *et al.* Maculopathy due to the R345W substitution in fibulin-3: Distinct clinical features, disease variability, and extent of retinal dysfunction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:3085-97. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-1600>
14. Livingstone I, Uversky VN, Furniss D, Wiberg A. The pathophysiological significance of fibulin-3. *Biomolecules.* 2020;10:1294. <https://doi.org/10.3390/biom10091294>
15. Roybal CN, Marmorstein LY, Vander Jagt DL, Abcouwer SF. Aberrant accumulation of fibulin-3 in the endoplasmic reticulum leads to activation of the unfolded protein response and VEGF expression. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:3973-9. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0070>
16. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:519-29. <https://doi.org/10.1038/nrm2199>

Reporte de caso

Histiocitosis de células de Langerhans: reporte de caso y revisión de la literatura

Miguel Ángel Medina¹, Wendy Meyer², Carolina Echeverri³, Natalia Builes³

¹ Grupo AUNA, Instituto de Cancerología Las Américas, Medellín, Colombia

² Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia

³ Unidad de Cancerología, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia

La histiocitosis de células de Langerhans comprende un grupo heterogéneo de enfermedades inflamatorias cuyos principales componentes celulares son las células dendríticas y los macrófagos. El infiltrado inflamatorio puede afectar la piel y otros órganos, y el resultado clínico varía de leve a letal, dependiendo del subconjunto de células involucradas y el compromiso multisistémico. La demora en el diagnóstico puede ocurrir debido a su presentación inespecífica y a que los médicos tratantes no suelen sospecharla. Se reporta el caso de una lactante mayor a la cual, a pesar de múltiples consultas con síntomas inespecíficos pero característicos de la enfermedad, solamente se le pudo hacer el diagnóstico gracias a los hallazgos histopatológicos.

Palabras clave: histiocitosis de células de Langerhans; histiocitosis; pediatría; conjuntivitis, dermatitis seborreica.

Langerhans cell histiocytosis: Case report and literature review

Histiocytosis comprises a heterogeneous group of inflammatory diseases whose main cellular components are dendritic cells and macrophages. The inflammatory infiltrate can affect the skin and other organs and the clinical outcome varies from mild to fatal depending on the involved cell subset and multisystemic compromise. Delay in diagnosis may occur due to its non-specific presentation and to a low suspicion on the part of the clinician. We report the case of an infant who despite multiple consultations with nonspecific but characteristic symptoms of the disease was only finally diagnosed thanks to histopathological findings.

Keywords: Histiocytosis, Langerhans-cell; histiocytosis; pediatrics; conjunctivitis; dermatitis, seborrheic.

La histiocitosis de células de Langerhans es una alteración histiocítica poco frecuente que se caracteriza por la proliferación de células del sistema fagocítico mononuclear (monocitos, macrófagos, células dendríticas) en diferentes órganos y sistemas. Dicha proliferación puede ser localizada (lesión únicamente en la piel o una aislada en el hueso), o bien, generalizada en varios órganos y sistemas. Predomina en la infancia y en el sexo masculino, en una relación de 1,5:1 con el femenino, y afecta a 4 de 9 niños menores de 15 años por millón, con una edad media de presentación de 30 meses (1-3).

Su manifestación clínica es heterogénea y poco específica, lo que da lugar a múltiples cuadros clínicos, la mayoría de ellos con expresión cutánea precoz, rasgo que permite orientar el diagnóstico, pero también hay formas fulminantes asociadas con compromiso multisistémico, morbilidad aguda o crónica y mortalidad. Los pacientes se estratifican por riesgo según la extensión de la enfermedad y los órganos afectados (4). Los esquemas de estratificación de riesgo han cambiado en los últimos años y continúan evolucionando, pero son útiles para establecer el mejor esquema de tratamiento a partir del compromiso de cada paciente (5,6).

En Colombia, no se conoce con certeza la incidencia de esta enfermedad. En las series publicadas, no obstante, se evidencia un mayor compromiso sistémico, con una incidencia probablemente subestimada por la poca especificidad de los síntomas, y su asociación con el carácter crónico de la enfermedad y sus tratamientos. Es importante resaltar que el impacto de las características genéticas en la progresión y las secuelas a largo plazo es

Recibido: 06/08/2020

Aceptado: 10/03/2021

Publicado: 29/03/2021

Citación:

Medina MA, Meyer W, Echeverri C, Builes N. Histiocitosis de células de Langerhans: reporte de caso y revisión de la literatura. Biomédica. 2021;41:396-402.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.5430>

Correspondencia:

Natalia Builes, Unidad de Cancerología, Hospital Pablo Tobón Uribe, Calle 78b No 69-240, piso 1, Medellín, Colombia
Teléfono: (571) 445 9104 y (571) 445 9103
lnbuiles@hptu.org.co

Contribución de los autores:

Todos los autores contribuyeron a recopilar la información, organizar cronológicamente el manuscrito, analizar los datos clínicos y los resultados de laboratorio, hacer la búsqueda bibliográfica y en la escritura del artículo final.

Financiación:

No se recibieron recursos económicos para esta publicación.

Conflicto de intereses:

Los autores no tienen conflictos de intereses.

escaso. Asimismo, se ha señalado que las manifestaciones clínicas afectan el pronóstico, como en el caso de aquellas similares a las de la dermatitis seborreica, asociadas con el diagnóstico tardío, el consecuente aumento de la morbilidad y el empeoramiento del pronóstico (7-9).

En este contexto, se presenta el caso de una lactante con histiocitosis de células de Langerhans que inicialmente se diagnosticó erróneamente como dermatitis seborreica, y que presentaba un cuadro clínico crónico de lesiones en la piel que posteriormente comprometió múltiples sistemas. En el curso de la enfermedad, nunca se sospechó el diagnóstico de histiocitosis de células de Langerhans, el cual finalmente se precisó de forma incidental mediante el estudio patológico.

Presentación del caso

Se trata de una niña lactante de 12 meses de edad, sin antecedentes personales ni familiares de importancia. A los seis meses de edad, presentó erupción micropapular, eritematosa, puntiforme y pruriginosa en los hombros y el cuello. Posteriormente, aparecieron lesiones descamativas en cuero cabelludo y tórax indicativas de dermatitis seborreica. Recibió múltiples tratamientos hidratantes durante seis meses sin ninguna mejoría.

A los 12 meses, de forma súbita y con rápida evolución, presentó edema palpebral izquierdo asociado con eritema periorbitario, pero sin otros síntomas. En el examen clínico, la paciente presentaba aumento de volumen en el tercio medio de la hemicara izquierda, con importante asimetría, y el párpado inferior izquierdo tenía coloración violácea.

En el hemograma inicial se reportó: 10 g/dl de hemoglobina; 32,1 % de hematocrito; 14.700 mm³ leucocitos; 46 % de neutrófilos; 46,4 % linfocitos; 594.000 mm³ plaquetas, y 2 mg/dl de proteína C reactiva. La función hepática y la renal eran normales para su edad.

En la tomografía computarizada (TC) de órbita simple y con contraste, se observó una lesión isodensa encapsulada en la región infraorbitaria izquierda (figura 1A). La resonancia magnética (RM) de cráneo, órbita y cuello reveló una lesión tumoral en la región infraorbitaria y la maxilar izquierdas, con compromiso de tejidos blandos e infiltración ósea del maxilar, el arco cigomático y el piso orbitario, con extensión infraorbitaria y extensión al espacio masticatorio, y lesiones nodulares que comprometían la glándula parótida izquierda y la tabla ósea frontal derecha (figura 1B).

En la TC simple de tórax, se observaron cuatro nódulos pulmonares alojados en la periferia del pulmón derecho y compromiso de la columna vertebral en T4 (figura 1C). La paciente nunca presentó síntomas respiratorios y, dada su edad, no fue posible practicar pruebas de función pulmonar. En la radiografía de serie ósea se encontraron lesiones líticas en cráneo y pelvis, pero no así en los huesos largos (figura 1D).

Se hizo una biopsia por escisión de la lesión infrapalpebral izquierda, en la que se encontraron fragmentos de tejido infiltrado por proliferación de células elongadas con hendiduras nucleares. En el fondo, se observaron células gigantes multinucleadas y un menor número de eosinófilos (figura 2). Los exámenes inmunohistoquímicos específicos para CD1 (tinción de membrana citoplasmática), proteína S100 (tinción nuclear y citoplasmática) y CD68 (marcador histiocítico) fueron positivos. La biopsia permitió confirmar el diagnóstico histopatológico de histiocitosis de células de Langerhans.

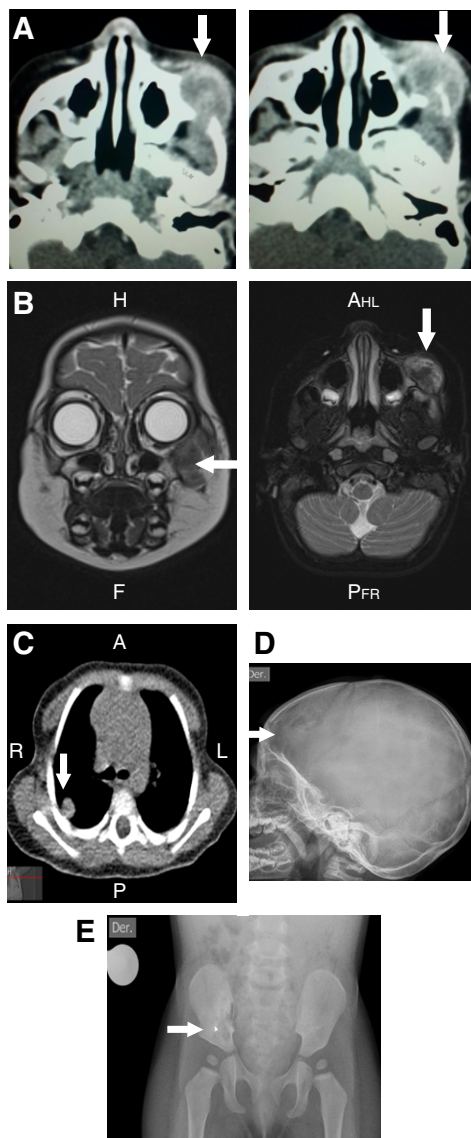


Figura 1. A. Tomografía inicial con contraste de órbita simple: se observa una lesión isodensa encapsulada en la región infraorbitaria izquierda que muestra cápsula que capta el medio de contraste. El centro de la lesión es el cuerpo del hueso malar izquierdo que está erosionado y remodelado por la lesión. La lesión erosiona el arco cigomático izquierdo, se extiende a la órbita izquierda y rechaza el globo ocular en sentido central y superior. Sus diámetros son: cefalo-caudal de 2,3 cm, antero-posterior de 2,2 cm y transversal de 2 cm. **B.** Resonancia magnética con contraste de cara y cráneo: se aprecia una lesión tumoral en las regiones infraorbitaria y maxilar izquierdas, con compromiso de tejidos blandos e infiltración ósea de maxilar, arco cigomático y piso orbitario, y con extensión infraorbitaria y al espacio masticatorio; se observa una lesión que compromete la tabla ósea frontal derecha. **C.** Tomografía computarizada simple de tórax: nódulos pulmonares en la periferia del pulmón derecho. **D.** Radiografía simple de cráneo: lesión lítica de bordes esclerosos y 23 x 15 mm en el hueso frontal derecho. **E.** Radiografía de pelvis: lesión lítica de bordes esclerosos en la porción inferior del ilíaco derecho, adyacente a la articulación sacroilíaca, de aproximadamente 25 x 15 mm.

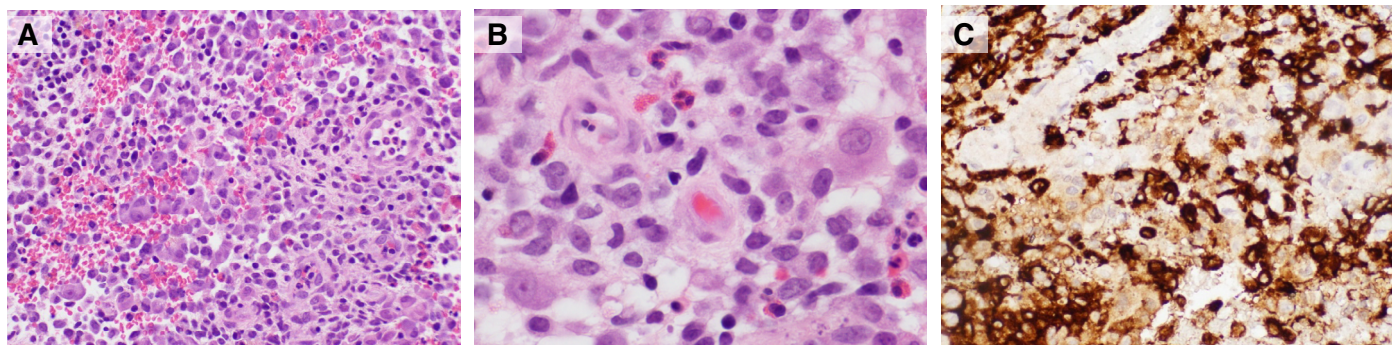


Figura 2. En los cortes se observan fragmentos de tejido infiltrado por una proliferación de células elongadas con hendiduras nucleares. En el fondo se encuentran células gigantes multinucleadas y un menor número de eosinófilos. **A.** Hematoxilina-eosina, 40X. **B.** Hematoxilina-eosina, 100 X. **C.** CD1a

Por los órganos afectados y la extensión de la enfermedad, se hizo una estratificación del riesgo y se la clasificó como una enfermedad multisistémica sin compromiso de órgano de riesgo. Se inició el tratamiento según el protocolo LCH III de la Sociedad Internacional de Histiocitosis, el cual incluye el uso de vinblastina durante seis semanas y de prednisona durante cuatro semanas. La mejoría clínica y radiológica en esta paciente se valoró como intermedia, por lo que se repitió el tratamiento. Al final de las 12 semanas de vinblastina, hubo resolución de las lesiones, por lo cual se continuó con un tratamiento de mantenimiento durante 12 meses. Al cabo de 48 meses de seguimiento, la paciente no presentaba signos de recaída de la enfermedad.

Discusión

La histiocitosis de células de Langerhans es una afección poco común que se presenta principalmente en la infancia y con diversas formas clínicas. Existe controversia sobre la etiología de la enfermedad y se ha debatido por años si se trata de una alteración inmunitaria o una neoplasia.

Dado que puede aparecer como una lesión de resolución espontánea o con tratamiento antiinflamatorio, se la ha considerado un proceso inflamatorio. Sin embargo, en otros casos se puede manifestar con compromiso diseminado y requerir tratamientos más agresivos, incluida la quimioterapia, lo cual sugiere una posible naturaleza neoplásica (10-12), ya que se encuentran activas las células de Langerhans patológicas, así como citocinas inflamatorias que expresan la CD40.

La clonalidad de las células de Langerhans era la teoría que apoyaba un origen neoplásico, pero la clonalidad en células inmunitarias no es suficiente para clasificar una enfermedad como maligna (13). En el 2010, se identificó una serie de anomalías genéticas involucradas, y la Organización Mundial de la Salud (OMS) consideró la enfermedad como alteración genética neoplásica, ya que corresponde a una proliferación neoplásica clonal de las células de Langerhans. Se ha reportado la mutación V600E en el gen *BRAF*, la cual interviene en la vía de activación de las cinasas MAPK, frecuentemente mutada en algunas neoplasias, y se encarga de enlazar las señales extracelulares con la maquinaria intracelular necesaria para controlar el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celulares (10). Estas observaciones sugieren el origen neoplásico de la enfermedad (14).

En la actual clasificación de las alteraciones histiocíticas, propuesta por la Sociedad Internacional de Histiocitosis en el 2016, los pacientes son clasificados en cinco grupos con base en aspectos clínicos, histológicos y moleculares: grupo I, o Langerhans; grupo C, cutáneo y mucocutáneo; grupo M, histiocitosis maligna; grupo R, enfermedad de Rosai Dorfman, y grupo H, linfocitosis hemofagocítica y síndrome de activación del macrófago. La histiocitosis de células de Langerhans corresponde al grupo I o Langerhans (15).

Presentación clínica

Por lo general, la enfermedad tiene una presentación clínica heterogénea, que va desde la forma de resolución espontánea hasta el compromiso multisistémico, cuyo curso es impredecible. Se puede presentar regresión espontánea, así como recurrencias crónicas y deterioro que pueden llegar a ser fatales (16). Su clasificación corresponde al número de lesiones, sitios involucrados y extensión. Estos criterios, sumados a la reacción al tratamiento, son una herramienta valiosa para determinar el riesgo de mortalidad.

El sistema más comúnmente afectado es el óseo (80 %), principalmente los huesos del cráneo, seguidos por los huesos largos y las vértebras (17,18). El compromiso de la piel puede verse hasta en una tercera parte de los pacientes y afecta con mayor frecuencia las áreas intertriginosas. Las formas de presentación comúnmente descritas son lesiones en forma de erupción papular, ulcerativas o vesiculares, úlceras hipopigmentadas que posteriormente sanan, así como formas similares a la dermatitis seborreica (10,19). Poompuen, *et al.*, han señalado cómo la similitud con la dermatitis seborreica puede retrasar el diagnóstico por la dificultad de distinguir las lesiones de una y otra condición y, además, porque la dermatitis seborreica es una entidad comúnmente observada en la edad pediátrica, como en el presente caso. Las lesiones óseas asociadas con la dermatitis seborreica pueden ser la clave para una detección temprana de la histiocitosis de células de Langerhans (8), la cual puede sospecharse ante esta asociación y la poca mejoría con los tratamientos instaurados.

Además, se ha descrito el compromiso periorbitario (proptosis), aunque la afectación del nervio óptico no es clara (20). Las cadenas ganglionares cervicales se ven comprometidas y alcanzan tamaños muy grandes, pudiendo afectarse también ganglios del mediastino y el abdomen. No se han descrito casos de afectación en gónadas, riñón o vejiga.

El compromiso de los huesos del cráneo y la región hipotalámica es frecuente, ocasionando diabetes insípida (50 %). El compromiso de la hipófisis anterior, acompañada de deficiencia de la hormona del crecimiento, es la segunda endocrinopatía más frecuente (10 %) y hasta el 60 % de los pacientes presenta hipotiroidismo, hipogonadismo e hiperprolactinemia cuando hay este compromiso hipofisiario (21).

En el sistema nervioso central, se presenta como una enfermedad neurodegenerativa con manifestaciones progresivas: síndrome cerebeloso (temblor, anormalidades en reflejos, ataxia, dismetría) o compromiso motor, parálisis pseudobulbar, disartria, disfagia, espasticidad, problemas de aprendizaje o, incluso, enfermedades psiquiátricas. También, se han descrito lesiones tumorales intracraneales que se manifiestan como un síndrome paraneoplásico autoinmunitario (16). Cuanto mayor sea el compromiso de los huesos del cráneo y del sistema neuroendocrino, mayor será el riesgo de enfermedad neurodegenerativa (21-23).

También, puede presentarse compromiso de órganos como hígado, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos; además, puede haber un mayor riesgo de mortalidad al afectarse ciertos órganos, principalmente, el sistema hematopoyético, el hígado y el bazo (13,24). Por otra parte, la histiocitosis pulmonar de células de Langerhans es frecuente en adultos, especialmente en fumadores. En niños, este tipo de presentación es poco frecuente y, generalmente, se asocia con compromiso multisistémico extenso y mayor morbilidad (25).

Diagnóstico

El diagnóstico se basa en hallazgos clínicos, radiográficos e histopatológicos mediante biopsia por escisión, en la cual se evidencia la infiltración de tejidos por histiocitos que expresan la CD207 y la CD1+ en la superficie. A pesar de ser un diagnóstico relativamente fácil de confirmar, muchas veces se atrasa por falta de sospecha clínica, como en el caso de la paciente que se reporta (13,24).

Se debe evaluar la extensión de la enfermedad con radiografías del cráneo, el esqueleto y el tórax. En el hemograma completo se suele observar anemia leve, y puede presentarse pancitopenia por disfunción de la médula ósea asociada con hepatoesplenomegalia. En el aspirado de médula ósea inicial, la celularidad es normal, pero una vez avanzada la enfermedad, puede tornarse hipocelular y es posible ver células de Langerhans y macrófagos hemofagocitados. Se debe valorar la función hepática (aminotransferasas, bilirrubinas, gamma-glutamyl transferasa) y la renal para descartar compromiso en estos órganos (20,24).

La ecografía de abdomen puede ayudar a descartar compromiso hepático, en tanto que la tomografía de cráneo permite evaluar lesiones en órbita, mastoides, esfenoides y huesos temporales. La resonancia magnética puede evidenciar lesiones histiocíticas ocupantes de espacio en los hemisferios cerebrales, la hipófisis, las meninges, el plexo coroideo, el tallo cerebral y la médula espinal, que podrían tomarse por tumores del sistema nervioso central, metástasis o enfermedades granulomatosas, en tanto que las lesiones degenerativas se podrían interpretar como áreas de atrofia cerebral (24). Los estudios de imágenes pueden ser de utilidad para evaluar la actividad de la enfermedad y, según el tejido bajo estudio, para establecer la necesidad de recurrir a la resonancia magnética, la tomografía por emisión de positrones o la TC, siendo esta última la mejor para evaluar los huesos del cráneo, el parénquima cerebral y las lesiones en la hipófisis (24,26).

Conclusiones

La histiocitosis de células de Langerhans en una enfermedad poco común, cuyo pronóstico y resultado están determinados por el diagnóstico temprano y el consecuente tratamiento oportuno. Por ello, es de vital importancia considerarla entre los diagnósticos diferenciales de las lesiones de piel que no mejoran con los tratamientos instaurados y para descartar enfermedades comunes según el grupo de edad, punto clave para el médico general y el pediatra, con el fin de remitir a los pacientes al especialista para un pronto manejo que disminuya las complicaciones a largo plazo.

Se requieren más estudios para conocer mejor su fisiopatología en aras de lograr un diagnóstico temprano, de manera que no haya que esperar la evolución de la enfermedad hasta la invasión sistémica. Como se sabe, enfermedad que no se conoce, no se diagnostica.

Referencias

1. Venkatramani R, Rosenberg S, Indramohan G, Jeng M, Jubran R. An exploratory epidemiological study of Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;59:1324-6. <https://doi.org/10.1002/pbc.24136>
2. Guyot-Goubin A, Donadieu J, Barkaoui M, Bellec S, Thomas C, Clavel J. Descriptive epidemiology of childhood Langerhans cell histiocytosis in France, 2000-2004. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;51:71-5. <https://doi.org/10.1002/pbc.21498>
3. Morán E, Durán C, Orozco L, Palacios C, Sáez-de-Ocáriz M, García M. Histiocitosis de células de Langerhans: nuevos conceptos. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*. 2018;16:36-44.
4. Leung AK, Lam JM, Leong KF. Childhood Langerhans cell histiocytosis: A disease with many faces. *World J Pediatr*. 2019;15:536-45. <https://doi.org/10.1007/s12519-019-00304-9>
5. Berres ML, Lim KP, Peters T, Price J, Takizawa H, Salmon H, et al. *BRAF*-V600E expression in precursor versus differentiated dendritic cells defines clinically distinct LCH risk groups. *J Exp Med*. 2015;212:281. <https://doi.org/10.1084/jem.2013097701202015c>
6. Minkov M. Multisystem Langerhans cell histiocytosis in children: Current treatment and future directions. *Paediatr Drugs*. 2011;13:75-86. <https://doi.org/10.2165/11538540-000000000-00000>

7. Gómez AM, Lotero V, Martínez P, Medina D, Ramírez O. Histiocitosis de células de Langerhans en niños. Descripción de 10 casos. *Revista CES Med.* 2013;27:177-84.
8. Poompuen S, Chaiyavit J, Techasatien L. Diverse cutaneous manifestation of Langerhans cell histiocytosis: A 10-year retrospective cohort study. *Eur J Pediatr.* 2019;178:771-6. <https://doi.org/10.1007/s00431-019-03356-1>
9. Nann D, Schneckenburger P, Steinhilber J, Metzler G, Beschoner R, Schwarze CP, *et al.* Pediatric Langerhans cell histiocytosis: The impact of mutational profile on clinical progression and late sequelae. *Ann Hematol.* 2019;98:1617-26. <https://doi.org/10.1007/s00277-019-03678-y>
10. Thacker NH, Abula O. Pediatric Langerhans cell histiocytosis: State of the science and future directions. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2019;17:122-31.
11. Stålemark H, Laurencikas E, Karis J, Gavhed D, Fadeel B, Henter JI. Incidence of Langerhans cell histiocytosis in children: A population-based study. *Pediatr Blood Cancer.* 2008;51:76-81. <https://doi.org/10.1002/pbc.21504>
12. Laman JD, Leenen PJ, Annels NE, Hogendoorn PC, Egeler RM. Langerhans-cell histiocytosis 'insight into DC biology'. *Trends Immunol.* 2003;24:190-6. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00063-2](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00063-2)
13. Haroche J, Cohen-Aubart F, Rollins BJ, Donadieu J, Charlotte F, Idhah A, *et al.* Histiocytoses: Emerging neoplasia behind inflammation. *Lancet Oncol.* 2017;18:e113-25. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30031-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30031-1)
14. Nelson DS, Quispel W, Badalian-Very G, van Halteren AG, van den Bos C, Bovée JV, *et al.* Somatic activating ARAF mutations in Langerhans cell histiocytosis. *Blood.* 2014;123:3152-5. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-06-511139>
15. Emile JF, Abula O, Fraïtag S, Horne A, Haroche J, Donadieu J, *et al.* Revised classification of histiocytoses and neoplasms of the macrophage-dendritic cell lineages. *Blood.* 2016;127:2672-81. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-690636>
16. Grois N, Fahrner B, Arceci RJ, Henter JI, McClain K, Lassmann H, *et al.* Central nervous system disease in Langerhans cell histiocytosis. *J Pediatr.* 2010;156:873-81. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2010.03.001>
17. Atsumi Y, Saito Y, Hataya H, Yuza Y. Initial symptoms of Langerhans cell histiocytosis: A case series. *Glob Pediatr Health.* 2019;19:2333794X19857377. <https://doi.org/10.1177/2333794X19857377>
18. Kim JE, Yi WJ, Heo MS, Lee SS, Choi SC, Huh KH. Langerhans cell histiocytosis of the jaw, a mimicker of osteomyelitis on CT and MR images: A retrospective analysis. *Medicine (Baltimore).* 2019;98:e16331. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000016331>
19. Aricò M, Egeler RM. Clinical aspects of Langerhans cell histiocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1998;12:247-58. [https://doi.org/10.1016/S0889-8588\(05\)70508-6](https://doi.org/10.1016/S0889-8588(05)70508-6)
20. Broadbent V, Egeler RM, Nesbit ME Jr. Langerhans cell histiocytosis--clinical and epidemiological aspects. *Br J Cancer Suppl.* 1994;23:S11-6.
21. Donadieu J, Rolon MA, Thomas C, Brugieres L, Plantaz D, Emile JF, *et al.* Endocrine involvement in pediatric-onset Langerhans' cell histiocytosis: A population-based study. *J Pediatr.* 2004;144:344-50. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2003.12.030>
22. Le Guennec L, Decaix C, Donadieu J, Santiago-Ribeiro M, Martin-Duverneuil N, Levy R, *et al.* The cognitive spectrum in neurodegenerative Langerhans cell histiocytosis. *J Neurol.* 2014;261:1537-43. <https://doi.org/10.1007/s00415-014-7375-y>
23. Grois N, Pötschger U, Prosch H, Minkov M, Arico M, Braier J, *et al.* Risk factors for diabetes insipidus in Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer.* 2006;46:228-33. <https://doi.org/10.1002/pbc.20425>
24. Allen CE, Ladisch S, McClain KL. How I treat Langerhans cell histiocytosis. *Blood.* 2015;126:26-35. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-569301>
25. Khanbabaei G, HassasYeganeh M, Tabatabaei SA, Khatami A, Bazrafshan S, Rezaei N. Langerhans cell histiocytosis with pulmonary involvement and unilateral pneumothorax. *Turk J Pediatr.* 2010;52:638-41.
26. Jessop S, Crudgington D, London K, Kellie S, Howman-Giles R. FDG PET-CT in pediatric Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Blood Cancer.* 2020;67:e28034. <https://doi.org/10.1002/pbc.28034>

Reporte de caso

Análisis farmacogenético retrospectivo de una paciente pediátrica en tratamiento anticoagulante: caso clínico

Mirta Cavieres¹, Marcelo Suárez^{2,3}, Gabriel Verón², Luis Abel Quiñones^{2,4}, Nelson Miguel Varela^{2,4}

¹ Laboratorio Clínico, Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna, Santiago, Chile

² Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética, Departamento de Oncología Básico-Clínico, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile

³ Servicio de Farmacia, Hospital Clínico Red de Salud UC-Christus, Santiago, Chile

⁴ Red Latinoamericana para la Implementación y Validación de Guías Clínicas Farmacogenómicas (RELIVAF-CYTED), Santiago, Chile

Se presenta el caso clínico de una paciente de 10 años diagnosticada con miocardiopatía dilatada, quien registró valores en el índice internacional normalizado (*International Normalized Ratio*, INR) superiores a 10 con la dosis estándar de acenocumarol, además de otros valores que indicaban el estado incoagulable, lo que obligó a suspender y reiniciar el tratamiento en varias ocasiones. Después de más de 30 días de tratamiento, sorprendentemente se lograron los niveles esperados y estables en el INR con la mitad de la dosis recomendada para una paciente de su edad y peso.

Se decidió hacer un análisis farmacogenético retrospectivo del caso mediante RT-PCR con sondas *TaqMan*TM que incluyó cinco polimorfismos de un solo nucleótido y distinto grado de asociación con la dosis-respuesta a los fármacos antivitaminicos K (AVK): rs2108622 (gen *CYP4F2*), rs9923231, rs7294 (gen *VKORC1*), rs1799853 y rs1057910 (gen *CYP2C9*). La paciente resultó ser homocigota para el rs9923231 (*VKORC1*) y heterocigota para el rs2108622 (*CYP4F2*). Se ha evidenciado a nivel nacional e internacional que este perfil genético está fuertemente asociado con una necesidad de dosis menores de antivitaminicos K.

En conclusión, el análisis farmacogenético confirmó que la condición genética de la paciente, la cual conlleva una baja expresión de la enzima *VKORC1* (blanco terapéutico de los antivitaminicos K), hacía predecible la necesidad de una dosis menor a la establecida según los protocolos clínicos recomendados por la *Food and Drug Administration* (FDA) y *PharmGKB*TM para los fármacos cumarínicos. El análisis genotípico previo de la paciente hubiese permitido alcanzar el rango terapéutico más prontamente, evitando potenciales riesgos de hemorragia, lo que demuestra la importancia de los análisis farmacogenéticos en tratamientos de gran variabilidad y estrecho rango terapéutico.

Palabras clave: acenocumarol; farmacogenética; anticoagulantes; vitamina K.

Retrospective pharmacogenetic analysis of a pediatric patient under anticoagulant treatment: Clinical case

We present the clinical case of a 10-year-old patient diagnosed with dilated cardiomyopathy who registered INR values above 10 upon receiving standard doses of acenocoumarol, as well as other values reported as uncoagulable, forcing the discontinuation and restart of treatment more than once. Expected and stable INR levels were achieved after more than 30 days of treatment, surprisingly with half the recommended dose for a patient of her age and weight. We decided to conduct a retrospective pharmacogenomic analysis including nucleotide genetic polymorphisms (SNPs) with different degrees of association with the dose/response to antivitamin K (AVK) drugs: rs2108622 (gene *CYP4F2*), rs9923231, rs7294 (gene *VKORC1*), rs1799853, and rs1057910 (*CYP2C9* gene) using *TaqMan*[®] RT-PCR. The patient was homozygous for rs9923231 (*VKORC1*) and heterozygous for rs2108622 (*CYP4F2*), a genetic profile strongly associated with a requirement of lower AVK doses as shown by national and international evidence.

In conclusion, the pharmacogenetic analysis confirmed that this patient's genetic conditions, involving low expression of the VKA therapeutic target, required a lower dose than that established in clinical protocols as recommended by the *Food and Drug Administration* (FDA) and the *PharmGKB*[®] for coumarin drugs. A previous genotypic analysis of the patient would have allowed reaching the therapeutic range sooner, thus avoiding potential bleeding risks. This shows the importance of pharmacogenetic analyses for highly variable treatments with a narrow therapeutic range.

Keywords: Acenocoumarol; pharmacogenetics; anticoagulants; vitamin K.

Recibido: 06/10/20
Aceptado: 28/05/21
Publicado: 15/06/21

Citación:

Cavieres M, Suárez M, Verón G, Quiñones LA, Varela NM. Análisis farmacogenético retrospectivo de una paciente pediátrica en tratamiento anticoagulante: caso clínico. *Biomédica*. 2021;41:403-8.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.5840>

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; móvil: (969) 8500 1351
nvarela@med.uchile.cl

Contribución de los autores:

Mirta Cavieres: valoración clínica y sustentación de la información clínica
Marcelo Suárez y Gabriel Verón: análisis por biología molecular para la obtención de los genotipos
Luis Abel Quiñones y Nelson Varela: revisión bibliográfica y escritura del manuscrito
Nelson Miguel Varela: concepción y revisión del manuscrito, desarrollo de la discusión
Todos los autores aprobaron la versión final.

Financiación:

No se contó con financiamiento.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de morbilidad y mortalidad en el mundo (1). Anualmente ocurren, aproximadamente, 17,5 millones de muertes por esta causa y se estima que, para el año 2030, la cifra aumentará a 23,6 millones, en especial, debido a enfermedades como fibrilación auricular, accidente cerebrovascular, infarto agudo de miocardio y miocardiopatías (1). Estas últimas son un grupo de enfermedades que afectan primariamente al músculo cardíaco e incluyen las valvulopatías adquiridas, la cardiopatía hipertensiva, la enfermedad coronaria o la pericárdica. Las miocardiopatías dilatadas de origen familiar se heredan por un mecanismo autosómico dominante (2,3). Entre los fármacos que se utilizan para su tratamiento, se encuentran los cumarínicos o antivitaminicos K (AVK) (3), los cuales tienen un estrecho margen terapéutico asociado a la variabilidad individual en la respuesta terapéutica, por lo que el riesgo de hemorragias puede aumentar durante el inicio del tratamiento debido a los ajustes en la dosis (3,4).

Los antivitaminicos K, como la warfarina y el acenocumarol, actúan inhibiendo competitivamente la vitamina K epóxido reductasa C1 (VKORC1), en tanto que, desde el punto de vista farmacocinético, los antivitaminicos K son metabolizados principalmente por el citocromo P450 2C9 (CYP2C9). Por otro lado, el CYP4F2 es el encargado de metabolizar la vitamina K hidroquinona a hidroxivitamina K, eliminándola del ciclo metabólico. En consecuencia, una disminución en su actividad aumenta la disponibilidad de vitamina K, lo que implicaría la necesidad de mayores dosis de antivitaminicos K (5).

Desde el punto de vista farmacogenético, la *Food and Drug Administration* (FDA) recomienda analizar tres polimorfismos de nucleótido simple (*Single-Nucleotide Polymorphism*, SNP) antes de administrar warfarina: el rs1799853, el rs1057910 (ambos en CYP2C9) y el rs9923231 (VKORC1) (6); de este último se tiene el mayor nivel de evidencia (7,8) (cuadro 1). Por su parte, el *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium* (CPIC) incluyó en su guía clínica del 2018 la eventual necesidad de analizar el rs2108622 (CYP4F2) para el tratamiento con warfarina (9). En un reciente estudio publicado por nuestro grupo en 304 pacientes adultos chilenos en tratamiento con acenocumarol, se estableció que las variables clínicas (edad, peso y sexo) y el INR inicial solo incidían en la variabilidad de la dosis en un 19 %, en tanto que las variantes genéticas rs9923231 (VKORC1), rs1799853 (CYP2C9) y rs1057910 (CYP2C9) daban cuenta de un 37 % de dicha variabilidad (10).

Cuadro 1. Resultado de los genotipos estudiados en la paciente, fenotipo esperado y recomendación de dosis para acenocumarol según la evidencia

Gen SNP	VKORC1 rs9923231	VKORC1 rs7294	CYP2C9 rs1799853	CYP2C9 rs1057910	CYP4F2 rs2108622
Genotipo observado en la paciente	A/A Homocigoto para el SNP	C/C Homocigoto wt	C/C Homocigoto wt	A/A Homocigoto wt	C/T Heterocigoto
Fenotipo descrito para el genotipo observado*	Bajos niveles de la enzima VKOR	Bajo riesgo de hemorragias	Bajo riesgo de hemorragias	Bajo riesgo de hemorragias	Metabolismo intermedio de vitamina K hidroquinona
Recomendación de dosis para ACC* según genotipo observado	Dosis menor de la estándar	Dosis estándar	Dosis estándar	Dosis estándar	Dosis estándar
Nivel de evidencia*	Alto	Bajo	Bajo	Moderado	Moderado

VKORC1: vitamina k epóxido reductasa c1; wt: *Wild Type* (alelo más frecuente); ACC: acenocumarol

*Obtenido de <https://www.pharmgkb.org> (14)

En este contexto, se presenta el caso clínico de una paciente de 10 años que no mejoró de la manera esperada con el protocolo de ajuste de dosis para el tratamiento con acenocumarol. Tras realizar los estudios farmacogenéticos, esto se explicó por su perfil genético y se correlacionó con las dosis de antivitamínicos K que finalmente lograron la mejoría de la paciente.

Presentación del caso

Se trata de una paciente pediátrica con diagnóstico de miocardiopatía dilatada al nacer e insuficiencia mitral a los 9 años. El equipo de genética del Hospital Pediátrico “Dr. Luis Calvo Mackenna” confirmó que la causa de la miocardiopatía dilatada era genética, de tipo autosómica dominante. Dada la condición clínica de la paciente y por decisión del equipo médico, se inició el tratamiento con acenocumarol (jarabe de 1 mg/ml). En ese momento, la paciente tenía 10 años y su peso era de 29 kg. Antes del tratamiento con acenocumarol había recibido ácido acetilsalicílico (100 mg/día) durante dos meses. Al inicio del tratamiento con acenocumarol, la paciente recibió, además, los siguientes medicamentos: furosemida, captopril, digoxina e inmunoglobulina, ninguno con interacción con el acenocumarol (Micromedex™).

La dosificación de acenocumarol se ajustó a los protocolos del Hospital y a la “Guía práctica para el tratamiento anticoagulante en pediatría” de la Sociedad Chilena de Hematología basada en estudios nacionales e internacionales (11). La administración del acenocumarol comenzó con una dosis de carga de 0,1 mg/kg (2,9 mg/día) y una dosis diaria de 0,05 mg/kg (1,5 mg/día), con lo cual el valor esperado de INR debía haber estado entre 2,5 y 3,5 (12,13), según las pautas de tratamiento del Hospital. Cinco días después de iniciado el tratamiento, dicho valor era de 16,0 (incoagulable), razón por la cual se administraron 10 mg de vitamina K (por vía oral) y se suspendió el anticoagulante por ese día. Al día siguiente, el valor de INR fue de 1,6. Posteriormente, la dosis de mantenimiento se ajustó a 1 mg/día y el INR arrojó un valor de 2,6 (figura 1).

Siete días después, la paciente ingresó al servicio de urgencias del Hospital con un INR de 12,0. Se ajustó nuevamente la dosis a 0,017 mg/kg (0,5 mg/día) y, cuatro días después, la paciente alcanzó un INR de 4,1. Los posteriores ajustes consecutivos permitieron alcanzar un INR de 2,3. En la figura 1, se presenta en detalle la dosificación y los valores de INR de la paciente hasta los 33 días de iniciado el tratamiento con acenocumarol.

El 9 de agosto del 2018, la paciente fue trasladada a otro centro asistencial de salud y no se pudo continuar su seguimiento.

Los últimos datos obtenidos datan de agosto del 2019, cuando la paciente asistió a control en el Hospital. En esa fecha, tenía 11 años de edad, pesaba 49 kg, y recibía una dosis de acenocumarol de 0,02 mg/kg (1 mg/día), la mitad de la recomendada para pacientes con esa edad y peso (11). Sin embargo, su INR se mantenía dentro del rango terapéutico (2,5-3,5).

Análisis genético

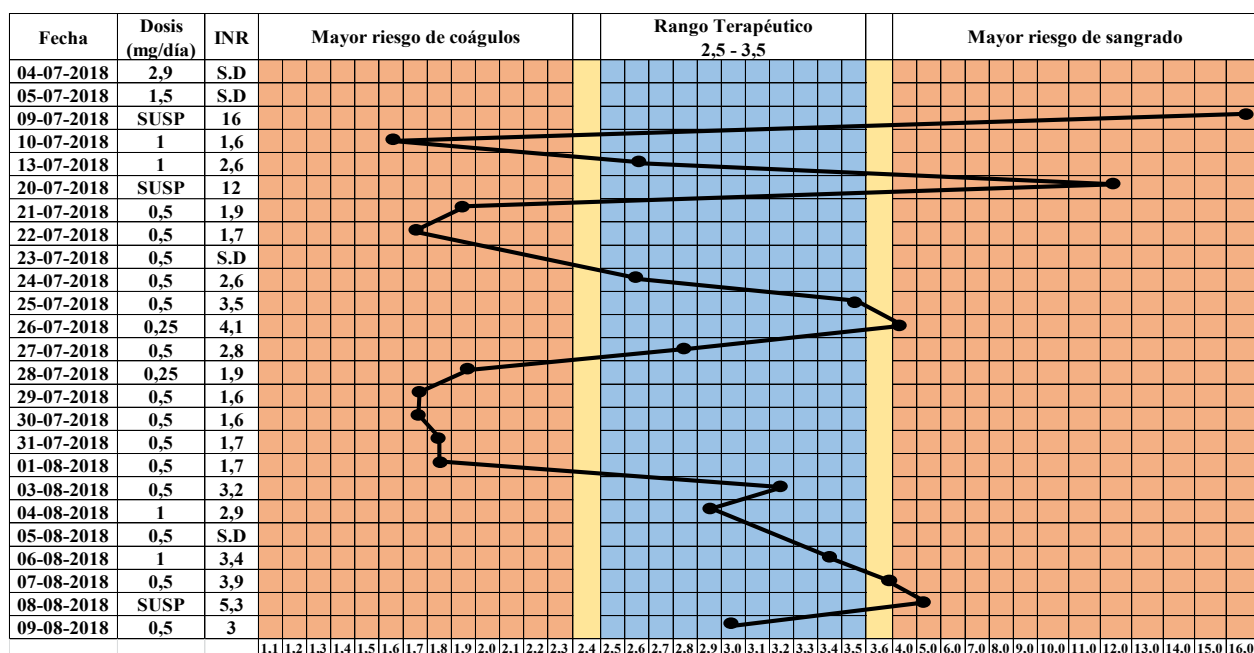
Para la identificación de los SNP rs2108622 (gen *CYP4F2*), rs9923231, rs7294 (ambos en el gen *VKORC1*), rs1799853 y rs1057910 (los dos en el gen *CYP2C9*), se obtuvo ADN genómico de la paciente a partir de una muestra de sangre venosa periférica, utilizando un estuche comercial (EZNA Blood DNA minikit™ (Omega Bio-tek). La determinación de los genotipos estudiados (cuadro 2) se hizo por discriminación alélica mediante sondas

TaqMan™ y PCR en tiempo real. Los reactivos utilizados fueron TaqMan Genotyping Master Mix™ y TaqMan Drug Metabolism Genotyping™ Assay (ThermoFisher Scientific, USA).

Los resultados y la interpretación de los análisis genéticos se presentan en el cuadro 1, los cuales se recibieron el 9 de agosto del 2018, informando que la paciente era homocigota para el rs9923231 (*VKORC1*) y heterocigota para el rs2108622 (*CYP4F2*). Este perfil genético implica que las dosis de cumarínicos deben ser menores que las establecidas según criterios clínicos para alcanzar el rango terapéutico deseado (en este caso, un INR entre 2,5 y 3,5).

Aspectos éticos

Para la publicación de este caso clínico, se contó con el consentimiento informado firmado por la madre de la paciente y la autorización del Comité de Ética Científico Pediátrico del Servicio de Salud Metropolitano Oriente del Ministerio de Salud, Chile.



Fecha (DD-MM-AAAA), correspondiente al día en que fue tomada la muestra; INR: *International Normalized Ratio*; SUSP: dosis suspendida; SD: sin datos
 Nota: la fecha 04-07-2018 corresponde al día en que se administró la dosis de carga inicial de acenocumarol.

Figura 1. Valores del INR y dosis de acenocumarol administradas a la paciente (10 años de edad; 29 kg de peso) en los primeros 33 días de tratamiento

Cuadro 2. Genes analizados y secuencias contexto

Gen (SNP)	Tipo	Secuencia contexto	ID del ensayo
<i>VKORC1</i> (rs9923231)	wt	GATTATAGGCGTGAGCCACCGCACC[C]GGCCAATGGTTGTTTTTCAGGTCTT	C__30403261_20
	MAF	GATTATAGGCGTGAGCCACCGCACC[T]GGCCAATGGTTGTTTTTCAGGTCTT	
<i>VKORC1</i> (rs7294)	wt	GGCACATTTGGTCCATTGTCATGTG[C]GGGTATGGCAGGAGGAGGGGGTAAT	C__7473918_10
	MAF	GGCACATTTGGTCCATTGTCATGTG[T]GGGTATGGCAGGAGGAGGGGGTAAT	
<i>CYP4F2</i> (rs2108622)	wt	CCCCGCACCTCAGGGTCCGGCCACA[C]AGCTGGGTTGTGATGGGTTCCGAAA	C__16179493_40
	MAF	CCCCGCACCTCAGGGTCCGGCCACA[T]AGCTGGGTTGTGATGGGTTCCGAAA	
<i>CYP2C9</i> (rs1799853)	wt	GATGGGGAAGAGGAGCATTGAGGAC[C]GTGTTCAAGAGGAAGCCCGCTGCCT	C__25625805_10
	MAF	GATGGGGAAGAGGAGCATTGAGGAC[T]GTGTTCAAGAGGAAGCCCGCTGCCT	
<i>CYP2C9</i> (rs1057910)	wt	TGTGGTGCACGAGGTCCAGAGATAC[A]TTGACCTTCTCCCCACCAGCCTGCC	
	MAF	TGTGGTGCACGAGGTCCAGAGATAC[C]TTGACCTTCTCCCCACCAGCCTGCC	C__2710492_10

wt: *Wild Type* (alelo más frecuente); MAF: *Minor Allele Frequency* (alelo menos frecuente); [N]: cambio nucleotídico que da cuenta del polimorfismo de un solo nucleótido o SNP. Extraído de TaqMan® SNP Genotyping Assays (Número de catálogo: 4362691), ThermoFisher Scientific®

Discusión

Los polimorfismos genéticos y sus efectos en la dosis de los fármacos, entre ellos los antivitamínicos K, han sido estudiados ampliamente (14). Se han desarrollado diversos algoritmos de dosificación, principalmente para el uso de la warfarina en diferentes etnias, utilizando variables clínicas y farmacogenéticas, con el fin de mejorar la seguridad (evitar el riesgo de hemorragia) y la eficacia (disminuir el tiempo para el ajuste de la dosis) del tratamiento.

El presente caso clínico corresponde a una paciente pediátrica que no respondió de manera adecuada a la dosis estándar de acenocumarol, lo que obligó a constantes modificaciones y ajustes en la pauta de dosificación durante más de 30 días (figura 1). El análisis genético de la paciente evidenció un fenotipo metabolizador normal de la vitamina K hidroquinona (heterocigota para rs2108622, *CYP4F2*), pero una baja expresión de la *VKORC1*, enzima blanco de este fármaco (homocigota para rs9923231) (cuadro 1). El rs9923231 está localizado en la región promotora del gen *VKORC1* y el cambio nucleotídico (NC_000016.10:g.31096368C>T) reduce la unión de factores de transcripción, desencadenando una disminución en la expresión del mRNA, y con ello, también en la cantidad de la enzima *VKORC1* (13). Por otro lado, el SNP rs2108622 (NC_000019.10:g.15879621C>T) produce un cambio en la secuencia de aminoácidos de la *CYP4F2* (NP_001073.3:p.Val433Met), reduciendo su actividad. No obstante, en estudios internacionales se ha evidenciado que su efecto es recesivo, por lo que la condición heterocigota en la paciente no implicaría un cambio fenotípico significativo ni se asociaría con la necesidad de modificar la dosis estándar de antivitamínicos K. Es importante señalar que la frecuencia de estos SNP (rs9923231 y rs2108622) en la población chilena es alta: 0,467 y 0,229, respectivamente (10).

El perfil genético observado explicaría los altos valores del INR que la paciente presentó frente a la dosis estándar de acenocumarol, para la que solo se consideraron variables clínicas (principalmente antropométricas). Cabe destacar que la paciente alcanzó cuatro veces una condición de anticoagulación excesiva y, por ende, un gran riesgo de hemorragia (figura 1). Los últimos registros de la paciente (agosto de 2019) muestran que logró alcanzar el rango terapéutico (INR entre 2,5 y 3,5) con la mitad de la dosis recomendada de acenocumarol. De haber tenido los análisis farmacogenéticos aquí descritos en el momento de iniciar el tratamiento con este fármaco, se hubiera podido alcanzar el rango terapéutico en menos tiempo (mayor eficacia) y mejorar sustancialmente la seguridad del tratamiento (evitando episodios de INR sobre 3,5).

Conclusión

Los resultados obtenidos confirman que la paciente presentaba un fenotipo farmacocinético y farmacodinámico que requería dosis de antivitamínicos K menores a las establecidas en los protocolos que consideran únicamente variables antropométricas, tal y como se ha establecido en estudios internacionales y nacionales previos. Es necesario implementar criterios farmacogenéticos en las guías clínicas del tratamiento anticoagulante con antivitamínicos K, siguiendo las recomendaciones de organismos regulatorios como la FDA dada la gran variabilidad observada en la reacción a los antivitamínicos K, su estrecho margen terapéutico y la frecuencia con que estos polimorfismos genéticos se presentan en nuestra

población. La incorporación de variables respaldadas por evidencia sólidas en los algoritmos de dosificación permitiría alcanzar una mayor seguridad y eficacia del tratamiento anticoagulante.

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades cardiovasculares. Fecha de consulta: 5 de julio del 2020. Disponible en: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/es/
2. Vukasovic JL. Miocardiopatía dilatada: aspectos genéticos, infecciosos, inflamatorios y del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2015;26:210-6. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2015.04.009>
3. Landefeld CS, Beyth RJ. Anticoagulant-related bleeding: Clinical epidemiology, prediction, and prevention. *Am J Med*. 1993;95:315-28. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(93\)90285-w](https://doi.org/10.1016/0002-9343(93)90285-w)
4. White HD, Gruber M, Feyzi J, Kaatz S, Tse HF, Husted S, *et al.* Comparison of outcomes among patients randomized to warfarin therapy according to anticoagulant control: Results SPORTIF III and V. *Arch Intern Med*. 2007;167:239-45. <https://doi.org/10.1001/archinte.167.3.239>
5. Florez J, Sedano MC. Farmacología humana: farmacología de la hemostasia, la coagulación y la fibrinólisis. Sexta edición. Barcelona: Editorial Elsevier Masson; 2014. p. 736-8.
6. U.S. Food and Drug Administration. Table of pharmacogenomic biomarkers in drug labeling. Fecha de consulta: 5 de julio del 2020. Disponible en: <https://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ucm572698.htm>
7. Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, *et al.* Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;92:414-7. <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.96>
8. Owen RP, Gong L, Hersh S, Klein TE, Altman RB. VKORC1 pharmacogenomics summary. *Pharmacogenet Genomics*. 2011;20:642-4. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833433b6>
9. Johnson JA, Caudle KE, Gong L, Stein CM, Scott SA, Lee MT, *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for pharmacogenetics-guided warfarin dosing : 2017 update. *Clin Pharmacol Ther*. 2017;102:397-404. <https://doi.org/10.1002/cpt.668>
10. Roco A, Nieto E, Suárez M, Rojo M, Bertoglia MP, Verón G, *et al.* A pharmacogenetically guided acenocoumarol dosing algorithm for Chilean patients: A discovery cohort study. *Front Pharmacol*. 2020;11:1-9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00325>
11. Bonduel M, Sciuccati G, Hepner M, Feliu-Torres A, Pieroni G, Frontroth JP, *et al.* Acenocoumarol therapy in pediatric patients. *J Thromb Haemost*. 2003;1:1740-3. <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00256.x>
12. Holbrook A, Schulman S, Witt DM, Vandvik PO, Fish J, Kovacs MJ, *et al.* Evidence-based management of anticoagulant therapy: Antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012;141(Supl.2):e152S-e184S. <https://doi.org/10.1378/chest.11-2295>
13. Guyatt GH, Akl EA, Crowther M, Gutterman DD, Schünemann HJ. Executive summary: Antithrombotic therapy and prevention of thrombosis. 9th edition. American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012;141(Supl.2):7-47. <https://doi.org/10.1378/chest.1412S3>
14. Potamias G, Lakiotaki K, Katsila T, Lee MTM, Topouzis S, Cooper DN, *et al.* Deciphering next-generation pharmacogenomics: An information technology perspective. *Open Biol*. 2014;4:421-32. <https://doi.org/10.1098/rsob.140071>

Reporte de caso

¿Carcinoma de mama o carcinoma de glándula sudorípara? Presentación de dos casos y análisis de la literatura

Mauricio Luján^{1,2}, Gabriel Varela^{3,4,5}, Diego Morán¹

¹ Oncología Clínica, Clínica de Oncología Astorga, Medellín, Colombia

² Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia

³ Patología Oncológica, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia

⁴ Patología Oncológica, Clínica Aurora, Medellín, Colombia

⁵ Patología Oncológica, Hospital San Vicente Fundación, Medellín, Colombia

El carcinoma apocrino primario de glándula sudorípara es una neoplasia con una muy baja incidencia, que puede representar un reto diagnóstico, clínico e histológico, y un reto terapéutico local, adyuvante y de la enfermedad avanzada. La edad media de los pacientes es de alrededor de 67 años, y no se ha observado preferencia según el sexo. Se presenta con mayor frecuencia en las axilas y en el cuero cabelludo. Se caracteriza clínicamente por un lento crecimiento, aunque puede progresar agresivamente, con compromiso local, ganglionar y metastásico, principalmente, pulmonar, hepático y óseo. El tratamiento recomendado –una vez establecida la histología– consiste en una resección local amplia con un margen claro de 1 a 2 cm y linfadenectomía regional si se detectan ganglios clínicamente positivos. El tratamiento adyuvante (radioterapia o quimioterapia) y de la enfermedad avanzada no está claramente establecido.

Se presentan dos pacientes de sexo femenino con sospecha inicial de cáncer de mama, en quienes se diagnosticó finalmente un carcinoma apocrino de glándula sudorípara.

Palabras clave: neoplasias de la mama; neoplasias cutáneas; glándulas apocrinas; patología; informes de casos.

Breast carcinoma or sweat gland carcinoma? A report of two cases and a comparison with the literature

Primary apocrine carcinoma of the sweat gland is a neoplasm with a very low incidence that may represent a clinical and histological diagnostic challenge, as well as for adequate local, adjuvant, and advanced disease management. The average age of patients is around 67 years with no gender preference. This cancer develops primarily at the axillary and scalp levels and is clinically characterized by slow growth, but can progress aggressively with local, nodal, and metastatic involvement (primarily lung, liver, and bone). The recommended management, once the histology is established, consists of a wide local resection with a clear margin of 1 to 2 cm and regional lymphadenectomy if clinically positive nodes are detected. The adjuvant treatment (radiotherapy or chemotherapy) and for the advanced disease is not established.

We report here the cases of two female patients initially diagnosed with breast cancer who were finally diagnosed with apocrine carcinoma of the sweat gland.

Keywords: Breast neoplasm; skin neoplasm; apocrine glands; pathology; case reports.

El carcinoma apocrino primario de glándulas sudoríparas es una neoplasia extremadamente rara con pocos casos reportados en la literatura científica. La incidencia es bastante baja: de 0,0049 a 0,0173 casos por 100.000 personas al año.

Se caracteriza clínicamente por un lento crecimiento, lo que lo hace confundir con un tumor benigno lo cual puede retrasar el diagnóstico; no obstante, puede progresar agresivamente y producir compromiso local, ganglionar y metastásico. La edad media de presentación de los pacientes es de alrededor de 67 años y no se ha observado preferencia según el sexo. El cáncer se desarrolla principalmente en las axilas y el cuero cabelludo, aunque también se ha reportado en diversos sitios anatómicos [cabeza y cuello (cara, canales auditivos, párpados), tronco, extremidades y área anogenital].

El tratamiento recomendado –una vez establecida la histología– consiste en una resección local amplia con un margen claro de 1 a 2 cm

Recibido: 31/07/2020

Aceptado: 14/06/2021

Publicado: 17/06/2021

Citación:

Luján M, Varela G, Morán D. ¿Carcinoma de mama o carcinoma de glándula sudorípara? Presentación de dos casos y análisis de la literatura. Biomédica. 2021;21:409-19.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.5758>

Correspondencia:

Mauricio Luján, Clínica de Oncología Astorga, Calle 8 No 43C-55, Medellín, Colombia
Teléfono: (317) 423 2272
mlujan@une.net.co

Contribución de los autores:

Todos los autores participaron en la búsqueda bibliográfica, el reporte de casos clínicos, la discusión del tema y la redacción del manuscrito.

Financiación:

No se recibieron recursos económicos para esta publicación.

Conflicto de intereses:

No existe ninguno.

y linfadenectomía regional si se detectan ganglios clínicamente positivos. El tema más controvertido es el tratamiento adyuvante (radioterapia o quimioterapia). Estos tumores pueden recurrir localmente y en los ganglios, e inclusive, producir metástasis sistémicas en pulmón, hígado y huesos. Dada su baja incidencia, puede representar un reto diagnóstico, clínico e histológico, y un reto terapéutico, local, adyuvante y de la enfermedad avanzada (1).

Se presentan dos casos de carcinoma apocrino primario de glándulas sudoríparas, ambos en mujeres, uno en axila, inicialmente manejado como posible cáncer primario de mama, y uno en la piel cervical posterior, inicialmente informado por patología como metástasis de cáncer de mama.

Caso clínico 1

Se trata de una mujer de 69 años, valorada por el Servicio de Oncología en junio de 2020, con antecedentes de tiroidectomía total por carcinoma papilar de tiroides en estadio I a los 62 años. Recibió yodo radiactivo y posterior suplencia hormonal con levotiroxina. Como antecedentes familiares, había tres hermanas con cáncer de mama y, la madre y dos hermanos, con cáncer gástrico. No había otros datos de importancia y la paciente negó contacto con tóxicos. En cuanto a los antecedentes ginecoobstétricos, había tenido tres embarazos, tres partos y ningún aborto; la menarquia ocurrió a los 13 años y, la menopausia, a los 50.

Fue remitida inicialmente a Dermatología, y refirió presentar un nódulo eritematoso de crecimiento progresivo desde abril del 2019, en la piel de la región lateral izquierda occipito-cervical. En una ecografía de junio de 2019, se reportó una lesión nodular hipoeoica, bien definida, avascular, de 14 x 9 mm, sugestiva de ser un ganglio. Se practicó una biopsia por aspiración con aguja fina en junio de 2019, cuyo resultado fue negativo para neoplasia. Ante un leve crecimiento, se decidió hacer una biopsia por escisión en octubre de 2019, en la que se reportó un compromiso intradérmico por tumor epitelial.

Los estudios de inmunohistoquímica fueron positivos para GATA3, CK20, receptores de estrógenos y progestágenos y CK7, y negativos, para TTF1 y HER2. Con un KI67 de 60 %, se sugirió el diagnóstico de carcinoma infiltrante de grado 2 de origen mamario. Los exámenes practicados –endoscopia digestiva superior, colonoscopia, ecografía transvaginal, tomografía de tórax y abdomen, y citología vaginal– fueron normales. La mamografía de noviembre de 2019 fue reportada como BI-RADS 2.

Con estos estudios fue remitida al Servicio de Oncología Clínica donde en el examen físico se documentó cicatriz en la región cervico-occipital lateral izquierda, con leve fibrosis, sin lesiones tumorales palpables o visibles en piel, tejidos blandos, cavidad oral, cervical, axilar o mamario. Se solicitó una revisión de la histopatología, y se hizo un nuevo panel de inmunohistoquímica con reporte positivo para sinaptofisina, cromogranina, BER-EP4, GATA3 y andrógenos, y negativo para CD56, CK5, CK6, CK20, D240, PAX8, tiroglobulina y TTF1. Con base en estos resultados, se consideró que se trataba de un carcinoma de glándula sudorípara con diferenciación neuroendocrina y mucinosa (figuras 1-4).

Caso clínico 2

Se trata de una mujer de 70 años valorada en el Servicio de Mastología el 10 diciembre del 2019. La paciente tenía antecedentes personales de hipertensión arterial sistémica y dislipidemia controladas, pero sin otros antecedentes familiares o tóxicos de importancia.

Reportó una lesión nodular en la mama derecha en agosto de 2019. En la mamografía de ese momento, se reportó una categoría BI-RADS 4b por la presencia de una masa densa de 26 mm en la unión de los cuadrantes externos y el ganglio axilar derecho. En una ecografía del 18 de septiembre del 2019, se reportó una lesión nodular de 15 x 11 x 7 mm en la unión de los cuadrantes externos y el ganglio axilar derecho de 15 mm. La biopsia con aguja *Trucut* guiada por ecografía del 23 de agosto del 2019 no evidenció neoplasia maligna ni atipias, solo necrosis. Se ordenó una nueva biopsia de mama y de ganglio axilar el 20 de septiembre del 2019, en la cual no se evidenció neoplasia maligna de mama, pero sí focos de adenosis esclerosante y ganglio axilar positivo para neoplasia maligna.

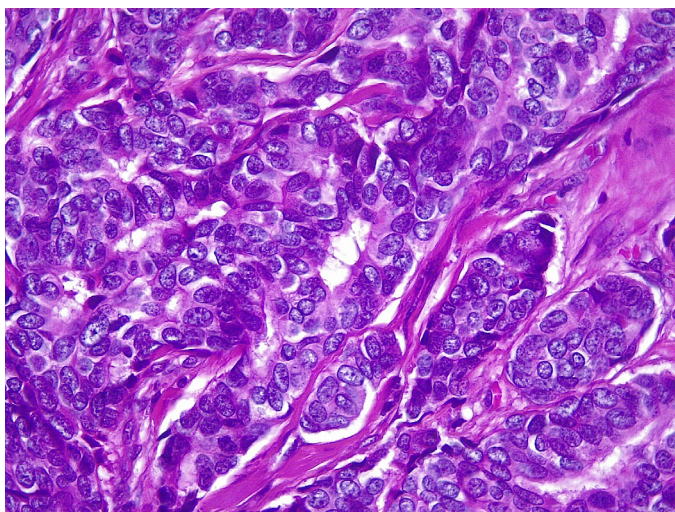


Figura 1. En la microfotografía se aprecia una neoplasia constituida por cordones estrechos de células epiteliales displásicas con citoplasma anfófilo que adoptan un patrón expansivo invadiendo el estroma. Nótese la leve atipia nuclear. Hematoxilina y eosina, 40X.

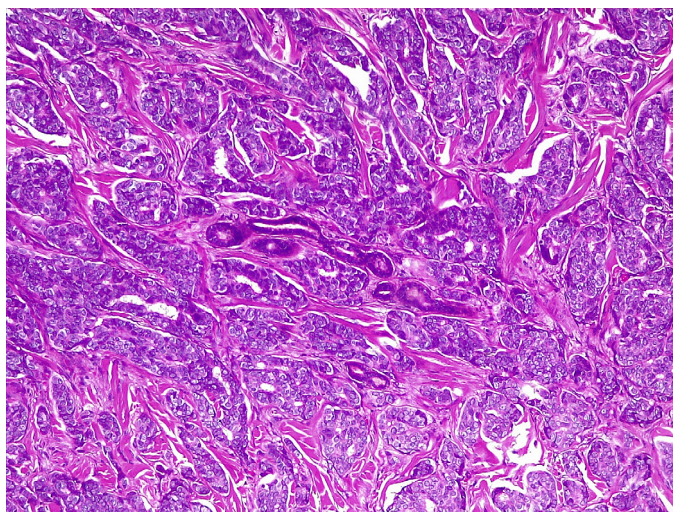


Figura 2. Se observa la distribución irregular de los nidos entre el estroma colagenizado, esbozando áreas sólidas y cribiformes sin necrosis. En el centro se visualiza un ovillo de glándulas sudoríparas que están siendo rodeadas por el tumor. Hematoxilina y eosina, 10X.

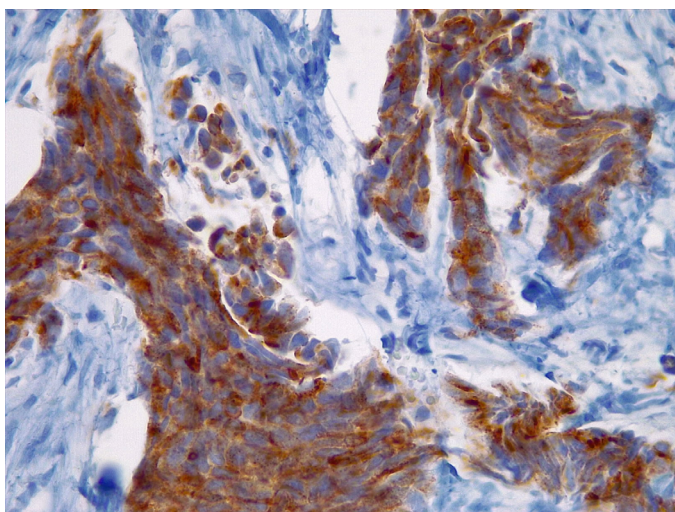


Figura 3. Cromogranina (inmunohistoquímica), 40X.

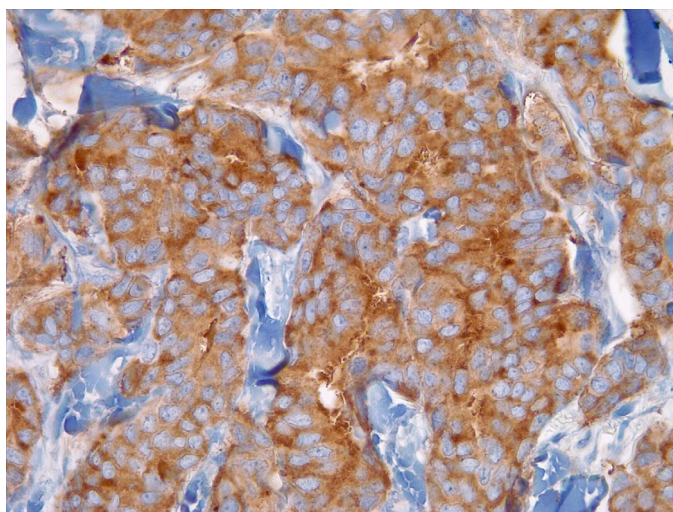


Figura 4. Sinaptofisina (inmunohistoquímica), 40X.

En la resonancia magnética de mamas del 30 de octubre del 2019, se detectó un patrón de captación del tipo de masa derecha irregular, con un tamaño de 13 x 8,7 x 8,1 mm y realce heterogéneo en la fase inicial rápida y posterior de meseta (tipo 2) superior y medial a esta, así como un área de realce del tipo 'no masa' de 24 x 8 x 23 mm con realce heterogéneo en la fase inicial rápida y posterior de meseta (tipo 2) más restricción de difusión y ganglios axilares en las cadenas 1, 2 y 3 de hasta 7,7 mm. No se observaron ganglios mamarios internos; la mama izquierda aparecía normal.

En una nueva biopsia de mama el 15 de noviembre del 2020, no se evidenció neoplasia maligna. En el examen físico no se detectaron hallazgos mamarios claros, pero se palparon adenomegalias móviles de 25 mm en la axila derecha. Se decidió hacer una biopsia abierta de ganglio axilar el 8 de enero del 2020, en la cual se encontró compromiso por neoplasia de célula grande de patrón difuso, sin estructuras tubulares y tejido axilar mamario supernumerario sin malignidad. En la prueba de inmunohistoquímica, se reportaron resultados positivos para CK, S100, CK7, SOX10 y p53; y negativos, para CK20, GATA3, TTF1, p63 y melan-A, ACL, así como para receptores hormonales, con un Ki67 de 15 % y HER2 negativo.

En marzo del 2020, en una tomografía por emisión de positrones-tomografía computarizada (PET-TC), se evidenciaron lesiones hipercaptantes en la axila derecha, la región supraclavicular y la infraclavicular y la base del cuello en el lado derecho, resultados que se interpretaron como un posible tumor primario de mama TxN3M0.

Se decidió hacer mastectomía más vaciamiento ganglionar en abril del 2020, cuya histopatología no registró actividad tumoral en el tejido mamario; no obstante, hubo 5 ganglios positivos de 15, y nidos neoplásicos similares a los reportados en estudios previos de histopatologías. Una vez valorada en el Servicio de Oncología Clínica, en abril del 2020 se decidió iniciar quimioterapia adyuvante con un esquema de doxorrubicina y ciclofosfamida en dosis densa.

Al hacer una nueva revisión de todo el material de histopatología y los estudios de inmunohistoquímica, se reportaron resultados negativos para HMB45, CD30, CD5, HLA-DR, CD43, CD87, CD7, CD4, CD2, CD1A, melan-A, CD45, CD20, ALK1, p63, PAX5, CD3, CD56, GATA3, andrógenos y PLQ, y positivos para EMA, CK, SOX10, CK7 y S100, por lo que se consideró que se trataba de un adenocarcinoma apocrino de glándula sudorípara primario axilar (figuras 5-8).

Se decidió suspender la quimioterapia iniciada y hacer una nueva PET-TC en junio del 2020 cuyo resultado fue negativo, por lo que se administró radioterapia adyuvante y se continuó el seguimiento clínico.

Consideraciones éticas

Se observaron las normas éticas para la investigación en seres humanos contenidas en la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia y se mantuvo la confidencialidad de la información de las pacientes. Las pacientes autorizaron el uso de sus historias clínicas.

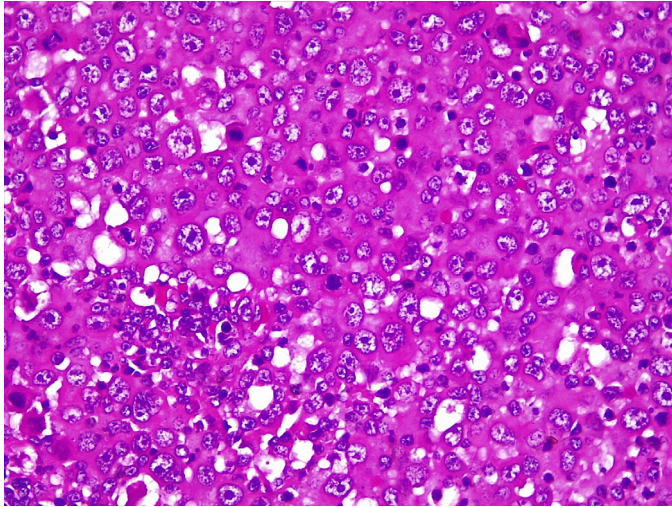


Figura 5. La imagen histológica muestra un tumor formado por células grandes, núcleos hiper cromáticos, nucléolos prominentes y múltiples figuras mitóticas. El citoplasma es abundante e intensamente eosinófilo. Hematoxilina y eosina, 40X.

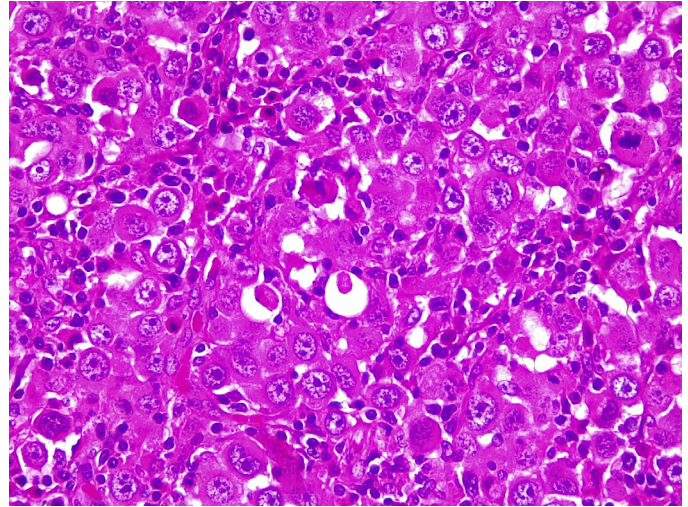


Figura 6. Nótese la formación glandular y la presencia de secreción granular eosinofílica intraluminal proveniente de la decapitación de la célula tumoral. Varias células presentan gránulos finos citoplasmáticos. Los linfocitos maduros que rodean y penetran la neoplasia corresponden a la localización ganglionar del tumor. Hematoxilina y eosina, 40X.

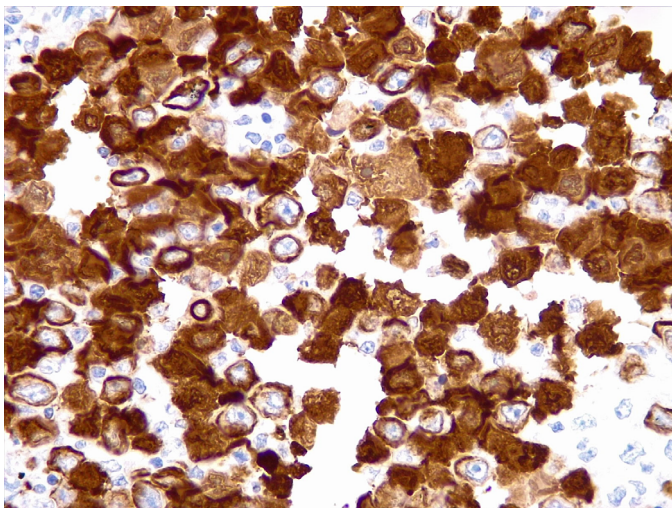


Figura 7. Citoqueratina 7 (inmunohistoquímica), 40X.

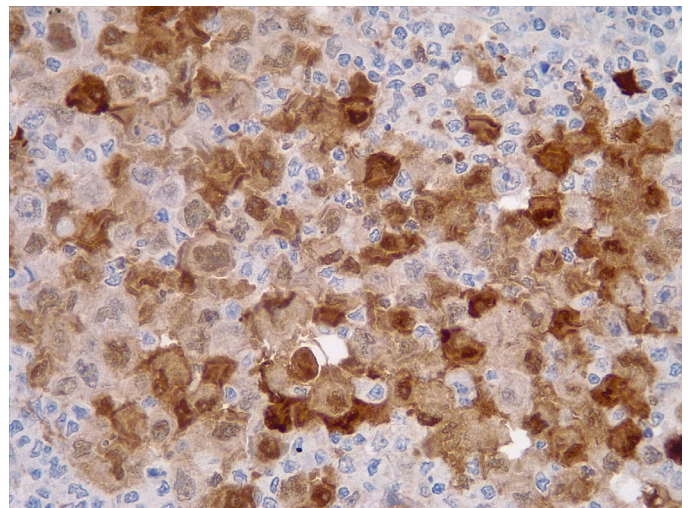


Figura 8. S100, 40X

Discusión

Los tumores de glándula sudorípara son tumores poco frecuentes. En un análisis de la base de datos del programa de *The Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER) entre 1973 y 2013, se encontraron 5.298 pacientes con tumores de anexos localizados en cabeza y cuello, de los cuales 295 correspondían a tumores de glándulas sudoríparas y 104 a adenocarcinoma apocrino. La edad media en el momento del diagnóstico fue de 67 años. La incidencia calculada en Estados Unidos (base de datos de SEER) es de 0,0049 a 0,0173 por 100.000 habitantes por año. En el caso de lesiones de origen mamario, esta corresponde a menos del 1 % de los tumores triple negativos, lo mismo sucede con los tumores cutáneos, en los que los tumores benignos y malignos de anexos representan menos del 1 % de los tumores de piel no melanoma y se derivan de células ecrinas, apocrinas, sebáceas o ceruminosas de la piel o de los folículos (2).

El origen más probable de estas neoplasias es el tejido normal o modificado de células apocrinas y, aunque su etiopatogenia no ha sido aún

bien descrita, al parecer la exposición a la luz ultravioleta puede ser un factor de riesgo. Desde el punto de vista molecular, se han descrito mutaciones en los genes supresores *PTCH1* y *CDH1*, y mutaciones somáticas en los genes *TCF7L1*, *ARID1A*, *FBX011*, *FBNP1*, *1L6ST*, *MYC* y *WHSC1L* (3).

Las neoplasias malignas de glándula sudorípara se han estratificado según su potencial de recurrencia y metástasis en dos grupos (4) (cuadro 1). El diagnóstico ha evolucionado con el tiempo y el uso de las técnicas de inmunohistoquímica ha dado mayor claridad, especialmente en el uso de anticuerpos como el EKH5 y el EKH6, que son específicos para los órganos con secreción ecrina (5). Otros criterios del diagnóstico histológico incluyen el material positivo para PAS y resistente a diastasa en células de la luz, y con positividad inmunohistoquímica para la GCDFP-15 (6), así como expresión positiva para el receptor de andrógenos. Es de resaltar que la expresión positiva del receptor de estrógeno puede estar presente hasta en el 36 % de los tumores apocrinos de glándulas sudoríparas (7). Para que puedan considerarse carcinomas apocrinos puros de mama deben tener un perfil negativo para el receptor de estrógenos y positivo para andrógenos, aunque esta diferencia puede ser ante todo académica porque su comportamiento es similar al de los *apocrine-like* en cuanto a la supervivencia global y libre de enfermedad (8). El uso del antígeno carcinoembrionario (CEA) y de los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGF) puede ser particularmente útil para diferenciar estos tumores de una metástasis de carcinoma mamario (3).

El carcinoma de glándula sudorípara endocrino productor de mucina es una neoplasia neuroendocrina usualmente de bajo grado, considerada por muchos autores como el análogo cutáneo del adenocarcinoma papilar sólido de glándula mamaria. Aunque en los primeros estudios se reportaba una predilección por el párpado y la piel periorbitaria, se ha encontrado en muchas otras localizaciones extraoculares y es un reto diagnóstico para los patólogos. En algunas ocasiones puede ser la lesión precursora de un carcinoma mucinoso cutáneo, por lo cual es importante conocer esta entidad recientemente descrita y reconocida en la última clasificación de tumores cutáneos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (9).

Histológicamente puede tener varios patrones, desde nódulos expansivos, quistes y papilas, hasta áreas sólidas y cribiformes. Las células son redondas a poligonales, tienen un tamaño intermedio y presentan una escasa tasa de mitosis. Usualmente no se observa necrosis. La cantidad de mucina intracelular o extracelular varía según el tumor y tiende a ser muy poco notoria en las fases iniciales o en las zonas sólidas.

Cuadro 1. Clasificación del riesgo de las neoplasias malignas de glándula sudorípara (4)

Bajo riesgo	Alto riesgo
Carcinoma cribiforme	Porocarcinoma
Carcinoma secretorio	Hidradenocarcinoma
Carcinoma endocrino de glándula sudorípara con producción mucinosa	Adenocarcinoma digital papilar
Carcinoma mucinoso	Carcinoma apocrino
Carcinoma microquístico anexial	Siringocistoadenocarcinoma papilífero
Carcinoma ductal ecrino escamoide	Neoplasias malignas originadas en espiroadenoma, cilindroma, espiroadenocilindroma; con alto grado morfológico
Carcinoma adenoide quístico	Carcinoma histiocistoide
Neoplasias malignas originadas en espiroadenoma, cilindroma, espiroadenocilindroma con bajo grado morfológico	Adenocarcinoma anexial NOS

NOS: *Not otherwise specified*

El diagnóstico ha evolucionado con el tiempo y el uso de las técnicas de inmunohistoquímica ha significado una mayor claridad, utilizando un panel amplio para lograr identificar su histogénesis, ya que a veces es imposible diferenciarlo histológicamente de una metástasis de adenocarcinoma de mama. Los marcadores que suelen ser positivos (mas no específicos) son el CK7, CK8, CK18, AE1/AE3, CAM5.2, EMA, GCDFP-15, estrógenos y progesterona. Lo más característico es la expresión de marcadores neuroendocrinos como la sinaptofisina y la cromogranina (10).

En cuanto a su diagnóstico diferencial desde el punto de vista microscópico, debe considerarse el hidradenoma, el hidrocistoma con hiperplasia ductal papilar y el adenoma apocrino. Todos ellos son relativamente fáciles de diferenciar debido a la ausencia de componente infiltrativo, su menor tamaño y la ausencia de atipia. El principal reto diagnóstico es discriminarlo de una metástasis de adenocarcinoma papilar sólido de mama, pues pueden ser exactamente iguales, incluso en la inmunohistoquímica, siendo la correlación clínico-patológica el criterio de referencia. Es de resaltar que la expresión positiva del receptor de estrógeno puede estar presente hasta en el 36 % de los tumores apocrinos de glándulas sudoríparas (7).

El adenocarcinoma apocrino de glándula sudorípara es una inusual neoplasia cutánea de anexos, que se manifiesta histológicamente con signos inequívocos de secreción por decapitación o gránulos de cimógenos citoplasmáticos. Además, no debe detectarse a nivel microscópico ninguna otra lesión con diferenciación apocrina, como en el caso de siringocistadenocarcinoma papilífero, carcinoma mucinoso, carcinoma papilar digital o neoplasias benignas como cilindroma, espiadenoma y tumor mixto apocrino. Tampoco debe estar asociado u originado en una glándula especializada: las de Moll, las ceruminosas, las anogenitales y las de tipo mamario) (11).

Histológicamente, el tumor está conformado por células epiteliales con abundante citoplasma granular eosinófilo, parcialmente vacuolado. Puede tener diferenciación ductal y secreción por decapitación. El pleomorfismo y las figuras mitóticas son variables. El nucléolo tiende a ser conspicuo. En algunas ocasiones puede adoptar patrones morfológicos con células en anillo de sello o aspecto histiocitoide, similar al carcinoma de células en anillo de sello o histiocitoide periorbitario. En la inmunohistoquímica, las células tumorales son positivas para citoqueratina 7 y tienen expresión variable para CEA, S100, EMA, estrógenos y progesterona (12). Anticuerpos como el EKH5 y el EKH6 son específicos para los órganos con secreción ecrina y han demostrado ser útiles (5). Otros criterios para el diagnóstico histológico incluyen material positivo para PAS y resistente a la diastasa en células lumenales, positividad inmunohistoquímica para GCDFP-15 (6), así como expresión positiva para el receptor de andrógenos.

El diagnóstico histopatológico diferencial se establece básicamente con la metástasis cutánea del adenocarcinoma ductal mamario, más aún si este tiene una morfología apocrina, situación que es difícil de sortear, inclusive teniendo la ayuda de la inmunohistoquímica, ya que ambos tumores pueden compartir el mismo perfil inmunológico y solo la ausencia de lesión mamaria puede discriminarlos. Hay algunos datos que pueden ser de ayuda para lograr diferenciarlos y determinar su origen, como la presencia de neoplasia *in situ* o evidencia de transición de una glándula apocrina preexistente. La expresión de EGFR (HER1), D2-40 y P63 puede apoyar más el diagnóstico del carcinoma

primario que el del metastásico (13); sin embargo, cuando la enfermedad se presenta con compromiso axilar, la investigación clínica y la correlación patológica son lo más recomendable.

Clínicamente, estos tumores se caracterizan por ser masas sólidas o quísticas asociadas con cambios inflamatorios de la piel suprayacente y, en ocasiones, ulceración. Los sitios más frecuentes son la axila y la región anogenital, pero básicamente pueden aparecer en cualquier lugar donde haya glándulas con actividad apocrina. El patrón predominante de la enfermedad es localmente invasor, pero tiene habilidad para diseminarse sistémicamente, especialmente por vía linfática. En el 57 % de los casos, la enfermedad se diagnostica en un estadio localizado y, en un 5 %, en estadio metastásico; sin embargo, este porcentaje podría ser mayor si se usa PET-FDG como método de diagnóstico (14).

Como en los tumores cutáneos, el principal tratamiento es el quirúrgico, con resecciones radicales, con un margen libre de 1 a 2 cm. El papel de la disección ganglionar aún es debatido, aunque los análisis retrospectivos han demostrado que los pacientes con compromiso ganglionar tienen una menor mediana de supervivencia, 33 meses Vs. 55 meses cuando no hay compromiso ganglionar. A pesar de estos datos, hasta ahora el compromiso ganglionar se ha considerado como un factor de pronóstico, pues no existe una recomendación estándar en cuanto a su manejo y se desconoce si la disección ganglionar extensa puede modificar el curso de la enfermedad (15). El uso de las imágenes de resonancia magnética podría ayudar a planear de forma más precisa su tratamiento (1).

A diferencia de otras localizaciones, los tumores en cabeza y cuello se tratan más frecuentemente con disecciones ganglionares cervicales con o sin radioterapia cuando se ha determinado clínicamente o mediante ganglio centinela el compromiso ganglionar. Cabe resaltar que en esta localización hay una gran probabilidad de enfermedad metastásica, asociada principalmente a un mayor volumen tumoral en el momento del diagnóstico (16). En un análisis retrospectivo sobre tumores de anexos cutáneos localizados en cabeza y cuello, se encontró que la calidad de la resección se relacionaba directamente con el pronóstico, en tanto que otras variables, como la edad avanzada, el alto grado o el gran volumen tumoral, así como la presencia de compromiso ganglionar, se comportaban como factores de pronóstico adverso. La presencia de adenopatías se considera el principal factor pronóstico adverso para la supervivencia (HR=3,223; IC_{95%} 1,52-6,835; p=0,002) (2).

La radioterapia se ha indicado en los pacientes con enfermedad localmente avanzada, especialmente en quienes el margen es menor de 5 mm o es positivo, o que tienen un alto grado histológico o adenopatía (6). Además, se ha propuesto la radioterapia en los pacientes con tumores mayores de 5 cm moderadamente diferenciados o con invasión vascular y perineural (17). El papel de la quimioterapia parece limitarse a la enfermedad metastásica o recurrente sin posibilidades de manejo local (18). De hecho, en las evaluaciones de tumores apocrinos de la mama sin enfermedad metastásica, se ha encontrado que la administración de terapia adyuvante puede comportarse como un factor de pronóstico adverso (HR=4,41; IC_{95%} 1,01-19,19; p=0,048) (19). Se ha recomendado el uso de bleomicina, 5-fluorouracilo, carboplatino, metotrexato, paclitaxel, epirrubicina o ciclofosfamida, pero este carece de una base sólida (1,20,21). Según algunas experiencias anecdóticas en tumores con expresión del receptor de estrógenos, el uso de tamoxifeno

ha dado resultados positivos (22,23). Los estudios de genética realizados en ciertos subtipos tumorales, como el carcinoma secretorio de piel, han permitido encontrar translocaciones 12;15, lo cual resulta en el gen de fusión *ETV6-NTRK3*, que podría ser objeto de intervención mediante los inhibidores del *NTRK*, pero su uso se basa en la racionalidad biológica más que en la evidencia clínica, tal como sucede con el adenocarcinoma papilar digital y la sobreexpresión de *FGFR2* como blanco terapéutico (4). En la práctica clínica, se administran medicamentos diseñados contra las mutaciones de *PTCH1* (vismodegib) y *TCF7L1*, pero su uso tampoco es extenso (3).

Estos tumores parecen tener un pronóstico diferente que sus contrapartes dependiendo de la localización de la enfermedad: en el caso de los tumores localizados en cabeza y cuello, la supervivencia global a 10 años es del 54 %, y la supervivencia libre de progresión, del 97 %, siendo más baja que en el caso de los tumores de piel no melanoma (2).

En el análisis de la literatura (búsqueda en Pubmed y Embase de artículos publicados e indexados entre 1975 y 2020, disponibles en texto completo en inglés, español, francés y alemán; no se consideraron comunicaciones orales o resúmenes; las palabras clave incluyeron los términos “glándulas sudoríparas”, “carcinoma”, “neoplasias cutáneas”, “glándulas apocrinas”), se encontraron 102 casos de carcinoma apocrino primario de glándulas sudoríparas reportados entre 1978 y 2020 que, junto con los dos informados aquí, se resumen en el cuadro 2 (1,3,15,16,18,24).

Cuadro 2. Características clínicas de 104 pacientes con carcinoma apocrino primario de glándula sudorípara, reportados entre 1978 y 2020 (1,3,15,16,18,24)

	n=104 (100 %)
Sexo	53 mujeres (50,9 %)
Edad media en años [DE]	63 [13]
Localización	
Axilar	36 (34,6)
Cuero cabelludo	25 (24,0)
Miembros inferiores	11 (10,5)
Miembros superiores	10 (9,6)
Tronco	4 (3,8)
Vulva	3 (2,8)
Cabeza y cuello	3 (2,8)
Perianal	1 (0,9)
Manejo local	
Escisión	54 (51,9)
Resección local amplia	26 (25,4)
Resección local amplia más vaciamiento ganglionar	17 (16,3)
No reportado	6 (5,8)
Manejo adyuvante	
Radioterapia	3 (2,9)
Radioterapia más quimioterapia	3 (2,9)
Quimioterapia	1 (0,9)
Recurrencia local o ganglionar	20 (19,2)
Metástasis	
En el momento del diagnóstico	1 (0,9)
Durante el seguimiento	9 (8,6)
Sitios de metástasis	
Ósea	5 (4,8)
Pulmón	5 (4,8)
Hígado	1 (0,9)
Cerebro	1 (0,9)
Mortalidad	15 (14,4)

Los carcinomas apocrinos primarios de glándulas sudoríparas son tumores infrecuentes para los cuales no se han establecido aún criterios diagnósticos y de tratamiento. La integración de los datos de histopatología y la presentación clínica son de gran importancia, ya que, particularmente en la axila (sitio más frecuente), se pueden afectar el tratamiento, el pronóstico y la calidad de vida del paciente. El manejo local adecuado y el compromiso ganglionar son los dos principales factores pronósticos y establecen la posible necesidad de tratamientos complementarios en torno a los cuales no hay claridad hasta la fecha.

Referencias

- Gatti AP, Tonello L, Pfaffenzer W, Savóia FO, Goergen DI, De Pieri Coan R, *et al.* Apocrine sweat gland adenocarcinoma: A rare case report and review. *Int J Surg Case Rep.* 2017;36:78-81. <https://doi.org/10.1016/j.ijscr.2017.04.0>
- Jandali DB, Ganti A, Al-Khudari S, Tajudeen BA, Revenaugh PC. Prognostic factors and survival outcomes for head and neck cutaneous adnexal cancers. *Am J Otolaryngol.* 2019;40:110-14. <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2018.09.011>
- Wauer U, Sellei R, Zoga E, Braun S, Lorenz D. Atypical course of an apocrine sweat gland carcinoma: A very rare malignant tumor and his interdisciplinary treatment. *SM J Case Rep.* 2017;3:1052.
- Brenn T. Do not break a sweat: Avoiding pitfalls in the diagnosis of sweat gland tumors. *Mod Pathol.* 2019;33:25-41. <https://doi.org/10.1038/s41379-019-0377-7>
- Ahn CS, Sangüeza OP. Malignant sweat gland tumors. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2019;33:53-71. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2018.09.002>
- Paties C, Taccagni GL, Papotti M, Valente G, Zangrandi A, Aloï F. Apocrine carcinoma of the skin. A clinicopathologic, immunocytochemical, and ultrastructural study. *Cancer.* 1993;71:375-81. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19930115\)71:2<375::aid-cnrcr2820710218>3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19930115)71:2<375::aid-cnrcr2820710218>3.0.co;2-4)
- Le LP, Dias-Santagata D, Pawlak AC, Cosper AK, Nguyen AT, Selim MA, *et al.* Apocrine-eccrine carcinomas: molecular and immunohistochemical analyses. *PLoS ONE* 2012;7:e47290. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047290>
- Imamovic D, Bilalovic N, Skenderi F, Beslagic V, Ceric T, Hasanbegovic B, *et al.* A clinicopathologic study of invasive apocrine carcinoma of the breast: A single-center experience. *Breast J.* 2018;24:1105-8. <https://doi.org/10.1111/tbj.13140>
- Zembowicz A, García CF, Tannous ZS, Mihm MC, Koerner F, Pilch BZ. Endocrine mucin-producing sweat gland carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2005;29:1330-9. <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000170348.40057.60>
- Agni M, Raven ML, Bowen RC, Laver NV, Chevez-Barrios P, Milman T, *et al.* An update on endocrine mucin-producing sweat gland carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2020;44:1005-16. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001462>
- Warkel RL. Apocrine gland adenoma and adenocarcinoma of the axilla. *Arch Dermatol.* 1978;114:198-203. <https://doi.org/10.1001/archderm.1978.01640140016004>
- Kazakov DV, McKee PH, Michal M, Kacerovska D. Cutaneous adnexal tumors. First edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Health; 2012. p. 830.
- Elder DE, Massi D, Scolyer RA, Willemze R. WHO Classification of Skin Tumors. Fourth edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, International Academy of Pathology; 2018. p. 470.
- Suyama T, Yokoyama M, Nishimura T, Kobayashi K, Katagiri K. Sweat gland carcinoma of the left axilla with disseminated carcinomatosis of the bone marrow. *Int J Dermatol.* 2020;59:e281-4. <https://doi.org/10.1111/ijd.14854>
- Hollowell KL, Agle SC, Zervos EE, Fitzgerald TL. Cutaneous apocrine adenocarcinoma: Defining epidemiology, outcomes, and optimal therapy for a rare neoplasm. *J Surg Oncol.* 2012;105:415-9. <https://doi.org/10.1002/jso.22023>
- Al-Hakami H, Awad BI, Al-Garni M, Al-Maghrabi HA, Al-Shareef N. Apocrine carcinoma of the scalp with neck lymph node metastasis: A case report and review of the literature. *J Family Med Prim Care.* 2019;8:3758-62 <https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc.833.19>

17. Chamberlain RS, Huber K, White JC, Travaglino-Parda R. Apocrine gland carcinoma of the axilla: Review of the literature and recommendations for treatment. *Am J Clin Oncol*. 1999;22:131-5. <https://doi.org/10.1097/00000421-199904000-00005>
18. Seong MK, Kim EK, Han K, Seol H, Kim HA, Noh WC. Primary apocrine sweat gland carcinomas of the axilla: A report of two cases and a review of the literature. *World J Surg Oncol*. 2015;13:59. <https://doi.org/10.1186/s12957-015-0473-1>
19. Meattini I, Pezzulla D, Saieva C, Bernini M, Orzalesi L, Sánchez LJ, *et al*. Triple negative apocrine carcinomas as a distinct subtype of triple negative breast cancer: A case-control study. *Clin Breast Cancer*. 2018;18:e773-80. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.02.012>
20. Miller DH, Peterson JL, Buskirk SJ, Vallow LA, Ta R, Joseph R, *et al*. Management of metastatic apocrine hidradenocarcinoma with chemotherapy and radiation. *Rare Tumors*. 2015;7:13335. <https://doi.org/10.4081/rt.2015.6082>
21. Fujisawa Y, Fujimoto M. Metastatic cutaneous apocrine carcinoma of the axilla successfully treated using systemic chemotherapy with i.v. epirubicin and cyclophosphamide followed by oral fluorinated pyrimidine. *J Dermatol*. 2014;41:280-2. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.12414>
22. Goldstein R, Stefanato CM, Warbey V, Harries M. Advanced vulvar apocrine carcinoma expressing estrogen receptors that responds to tamoxifen therapy. *Future Oncol*. 2012;8:1199-203. <https://doi.org/10.2217/fon.12.94>
23. Daniel SJ, Nader R, Kost K, Hüttner I. Facial sweat gland carcinoma metastasizing to neck nodes: A diagnostic and therapeutic challenge. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001;127:1495-8. <https://doi.org/10.1001/archotol.127.12.1495>
24. Hicham T, Mohammed B, Naoufa H. Primary cutaneous apocrine carcinoma with distant metastasis. *J Cancer Clin Trials*. 2018;3:2. <https://doi.org/10.4172/2577-0535.1000145>

Presentación de caso

Psoriasis verrugosa en un hombre con antecedentes de psoriasis en placa, reporte de caso y revisión de la literatura

Javier Hernández¹, Ana Ruiz¹, Carolina Mesa², Lina Rodríguez²

¹ Departamento de Dermatopatología, Clínica CES, Universidad CES, Medellín, Colombia

² Departamento de Dermatología, Clínica CES, Universidad CES, Medellín, Colombia

La psoriasis verrugosa es una variante atípica y poco frecuente de la psoriasis, con pocos casos reportados en la literatura. Se caracteriza por la presencia de placas hipertróficas y verrugosas simétricas en extremidades y tronco.

Se presenta el caso de un paciente de 63 años con diagnóstico de psoriasis en placa 20 años atrás, tratado con esteroide tópico y quien 10 años antes había desarrollado una placa de aspecto verrugoso en el tercio distal de la cara posterior de la pierna izquierda. Se tomó la biopsia de la lesión por sospecha de un carcinoma escamocelular (verrugoso). El estudio histopatológico mostró cambios indicativos de psoriasis verrugosa y descartó la presencia de malignidad.

Palabras clave: psoriasis; carcinoma; informes de caso.

Verrucous psoriasis in a male patient with a history of vulgar psoriasis: Case report and literature review

Verrucous psoriasis is an atypical and rare variant of psoriasis with few cases reported in the literature. It is characterized by the presence of symmetric hypertrophic and verrucous plaques on the limbs and trunk.

We present the case of a 63-year-old male patient with a history of vulgar psoriasis for 20 years who was receiving treatment with topical steroids and had developed a verrucous plaque in the distal third of the posterior aspect of the leg 10 years before. We conducted a biopsy of the lesion to confirm or discard the diagnostic impression of squamous cell carcinoma (verrucous). The histopathological study showed changes compatible with verrucous psoriasis ruling out the presence of malignancy.

Keywords: psoriasis; carcinoma; case reports.

La psoriasis verrugosa es una variante poco frecuente de la psoriasis, con pocos casos reportados en la literatura. Clínicamente, se caracteriza por placas hipertróficas de aspecto verrugoso que suelen ser simétricas. Entre otros diagnósticos diferenciales, se incluyen el carcinoma verrugoso, las verrugas virales y el liquen plano hipertrófico.

Se presenta el caso de un paciente de 63 años con antecedentes de psoriasis en placa, quien desde hacía 10 años había desarrollado una placa verrugosa de crecimiento lento en el tercio distal de la cara posterior de la pierna izquierda.

Reporte de caso

Se trata de un paciente masculino de 63 años con antecedentes de epilepsia, con diagnóstico de psoriasis en placas desde hacía 20 años tratada con esteroide tópico, que consultó al servicio de dermatología por aumento del número de lesiones.

En el examen físico, se evidenciaron placas eritematosas infiltradas con descamación plateada en codos, muslos, región interglútea y tobillos, con un índice de gravedad de la psoriasis (*Psoriasis Area Severity Index*, PASI) de 9,9 y un índice de 2 en la calidad de vida en dermatología (*Dermatology Life Quality Index*, DLQI). En el tercio distal de la cara posterior de la pierna izquierda, presentaba una lesión hiperqueratósica, exofítica y descamativa de hasta 5 cm en su eje mayor; al desprender la superficie hiperqueratósica

Recibido: 25/02/21
Aceptado: 15/06/21
Publicado: 07/07/21

Citación:

Hernández J, Ruiz A, Mesa C, Rodríguez L. Psoriasis verrugosa en un hombre con antecedente de psoriasis en placa, reporte de caso y revisión de la literatura. *Biomédica*. 2021;41:420-3.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.6042>

Correspondencia:

Javier Ricardo Hernández, Calle 60 N° 98-46, apartamento 805, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (57) (317) 517 8675
jahemo19@gmail.com

Contribución de los autores:

Javier Hernández y Ana Ruiz: diagnóstico histopatológico de la psoriasis verrugosa
Carolina Mesa y Lina Rodríguez: evaluación inicial y seguimiento del paciente, toma de la biopsia
Javier Hernández: toma y edición de las microfotografías histológicas
Lina Rodríguez: toma y edición de las fotografías clínicas y dermatoscopia
Todos los autores participaron en la revisión de la literatura y escritura del manuscrito.

Financiación:

El estudio se financió con recursos propios.

Conflicto de intereses:

Los autores no reportan ningún conflicto de intereses.

se observó un aspecto papilomatoso sobre una base de color blanquecino (figura 1). Por la sospecha de carcinoma escamocelular (verrugoso), se tomó una biopsia de la lesión y se inició fototerapia dada la contraindicación en el paciente del tratamiento sistémico.

En el estudio histopatológico, se observó una lesión en piel de aspecto papilomatoso con hiperqueratosis, focos de paraqueratosis, formación de microabscesos neutrofílicos en el estrato córneo, zonas de agranulosis, acantosis con elongación de la red de crestas epidérmicas y adelgazamiento de los platos suprapapilares (figura 2). En la dermis subyacente, se detectaron vasos sanguíneos dilatados en las papilas dérmicas con infiltrado inflamatorio linfocitario perivascular superficial. El estudio de inmunohistoquímica para el marcador p16 fue negativo. Se estableció el diagnóstico histológico de psoriasis de variedad verrugosa y no se encontraron signos de carcinoma escamocelular verrugoso ni cambios citopáticos que sugirieran una verruga viral.

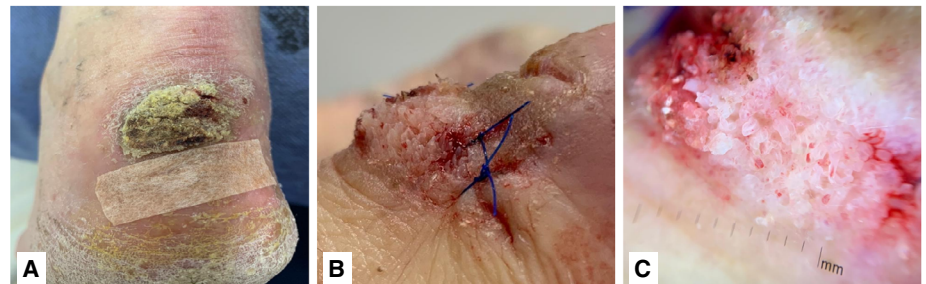


Figura 1. A. Placa de bordes bien definidos, regulares, de color marrón claro, hiperqueratósica y exofítica en el tercio distal de la cara posterior de la pierna izquierda. B. Placa de superficie papilomatosa posterior a la toma de la biopsia. C. En la dermatoscopia, se evidenció superficie papilomatosa blanquecina que cubría toda la extensión de la lesión.

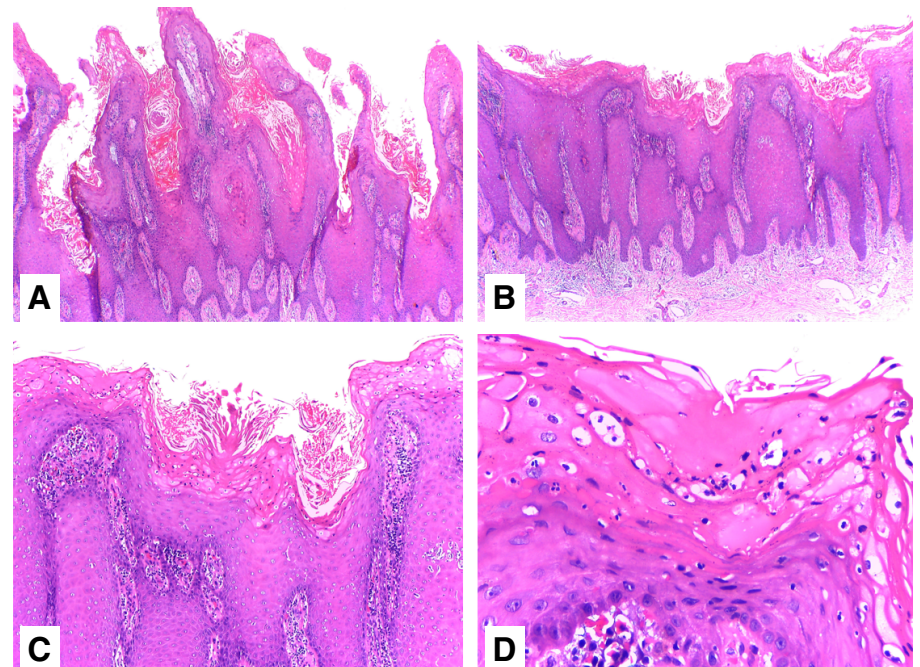


Figura 2. A. Papilomatosis acentuada con hiperqueratosis y acantosis epidérmica (Hematoxilina y eosina, 4X). B. Hiperqueratosis, acantosis con elongación y fusión de la red de crestas epidérmicas (Hematoxilina y eosina, 4X). C. Hiperqueratosis, agranulosis, adelgazamiento de los platos suprapapilares y vasos sanguíneos dilatados en las papilas dérmicas (Hematoxilina y eosina, 10X). D. Hiperqueratosis con microabscesos de Munro y agranulosis (Hematoxilina y eosina, 40X).

Consideraciones éticas

El reporte se ajustó a las disposiciones de la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, según las cuales este fue un estudio sin riesgo, ya que solo se tomaron datos de la historia clínica del paciente. Asimismo, se mantuvo la confidencialidad de la información clínica y se obtuvo el consentimiento informado para la publicación del caso.

Discusión

La psoriasis verrugosa es una variante atípica y poco frecuente de la psoriasis. Entre sus presentaciones clínicas, se encuentran la forma localizada, la eritrodérmica o la relacionada con fármacos (1), esta última presentada en el reporte del caso de un paciente con hepatitis C tratado con interferón alfa, que desarrolló una psoriasis verrugosa después de recibir el medicamento (2).

Clínicamente, esta condición se caracteriza por placas simétricas de aspecto verrugoso e hipertróficas sobre una base eritematosa (3) localizadas en piernas, brazos, tronco y cara dorsal de las manos (1). Debe sospecharse en los pacientes con antecedentes de psoriasis en placa que desarrollan de forma paulatina lesiones verrugosas, si se ha descartado un proceso infeccioso concomitante (4).

En el estudio histopatológico de la psoriasis verrugosa, se presenta la superposición de cambios propios de la psoriasis vulgar y de las verrugas virales (3,5); la piel aparece con acentuada papilomatosis, hiperqueratosis, microabscesos de neutrófilos en el estrato córneo (microabscesos de Munro), ocasionalmente agregados de neutrófilos en el estrato espinoso y acentuada acantosis con elongación de la red de crestas que, además, presentan anastomosis; en las papilas dérmicas hay vasos sanguíneos dilatados (6) e infiltrado inflamatorio, pero no se observan cambios coilocíticos (3).

La causa etiológica se desconoce, aunque se ha asociado con diabetes mellitus, disfunción pulmonar, flebitis e inmunosupresión (3); algunos autores la han relacionado con trastornos de la circulación linfática (3,6,7) y con trauma repetido en el sitio de aparición de las placas (1).

Entre los diagnósticos clínicos diferenciales, se debe considerar el carcinoma verrugoso, las verrugas virales, las infecciones micóticas, el liquen plano hipertrófico (4) y los nevus epidérmicos (1). La distinción entre la psoriasis verrugosa y el carcinoma verrugoso suele ser difícil, sin embargo, la ausencia de un patrón de crecimiento endofítico, sumada a la negatividad para el marcador p16, inclina la balanza a favor de la psoriasis verrugosa (4).

La información sobre esta variedad de psoriasis se basa en los casos reportados en la literatura. La enfermedad es de difícil manejo y no existe un consenso sobre el tratamiento que debe emplearse. Los pacientes han sido manejados con queratolíticos y esteroides tópicos de gran potencia, pero cuando se administran en monoterapia, la respuesta terapéutica ha sido deficiente (1,3,4). Con el uso de acitretín, etretinato, metotrexato y de la terapia biológica con etanercept, adalimumab, infliximab y ustekinumab, se ha obtenido una mejoría parcial (1, 7). Recientemente, se describió el caso de un paciente con psoriasis verrugosa de larga data que recibió múltiples tratamientos sin éxito; finalmente, presentó mejoría con apremilast (8).

Conclusión

La psoriasis verrugosa es una variante poco frecuente de la psoriasis que debe sospecharse en todos aquellos pacientes con antecedente de psoriasis que presenten placas hipertróficas de aspecto verrugoso y crecimiento lento. Se debe hacer el diagnóstico diferencial con el carcinoma verrugoso, las verrugas virales y el liquen plano hipertrófico, entre otros.

Referencias

1. Shivers L, Montanez-Wiscovich ME. Verrucous psoriasis treated with methotrexate and acitretin combination therapy. *Cutis*. 2019;104:E10-2.
2. Scavo S, Gurrera A, Mazzaglia C, Magro G, Pulvirenti D, Gozzo E, *et al*. Verrucous psoriasis in a patient with chronic C hepatitis treated with interferon. *Clin Drug Investig*. 2004;24:427-9. <https://doi.org/10.2165/00044011-200424070-00006>
3. Curtis AR, Yosipovitch G. Erythrodermic verrucous psoriasis. *J Dermatolog Treat*. 2012;23:215-8. <https://doi.org/10.3109/09546634.2010.550912>
4. Garvie K, Simpson MM, Logemann N, Lackey J. Verrucous psoriasis: A rare variant of psoriasis masquerading as verrucous carcinoma. *JAAD Case Rep*. 2019;5:723. <https://doi.org/10.1016/j.jdc.2019.04.025>
5. Khalil FK, Keehn CA, Saeed S, Morgan MB. Verrucous psoriasis: A distinctive clinicopathologic variant of psoriasis. *Am J Dermatopathol*. 2005;27:204-7. <https://doi.org/10.1097/01.dad.0000157450.39033.31>
6. Baba A, Fujii K, Arimura A, Tada Ki, Higashi Y, Matsushita S, *et al*. Psoriasis with verrucous appearance. *Int J Dermatol*. 2016;55:e419-e21. <https://doi.org/10.1111/ijd.13243>
7. Okuyama R, Tagami H. Psoriasis verrugosa in an obese Japanese man; a prompt clinical response observed with oral etretinate. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2006;20:1359-61. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2006.01716.x>
8. Okazaki S, Osawa R, Nakajima H, Nakajima K, Sano S. Favorable response to apremilast in a patient with refractory psoriasis verrugosa. *J Dermatol*. 2019;46:544-7. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.14877>

Artículo original

Consecuencias de los conflictos armados en la salud mental de niños y adolescentes: revisión de revisiones de la literatura

Sandra Piñeros-Ortiz^{1,2}, Jaime Moreno-Chaparro^{3,4}, Nathaly Garzón-Orjuela³, Zulma Urrego-Mendoza^{1,5}, Daniel Samacá-Samacá³, Javier Eslava-Schmalbach^{3,6}

¹ Grupo de Investigación Violencia y Salud, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

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

³ Grupo de Investigación en Equidad en Salud, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia

⁵ Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

⁶ Hospital Universitario Nacional de Colombia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D. C., Colombia

Recibido: 10/03/2020

Aceptado: 24/02/2021

Publicado: 24/02/2021

Citación:

Piñeros-Ortiz S, Moreno-Chaparro J, Garzón-Orjuela N, Urrego-Mendoza Z, Samacá-Samacá D, Eslava-Schmalbach J. Consecuencias de los conflictos armados en la salud mental de niños y adolescentes: revisión de revisiones de la literatura. Biomédica. 2021;41:424-48.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.5447>

Correspondencia:

Sandra Piñeros-Ortiz, Grupo de Investigación Violencia y Salud, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono móvil: (321) 360 6813
seortiz@unal.edu.co

Contribución de los autores:

Sandra Piñeros-Ortiz: diseño del estudio, síntesis de resultados y discusión de la evidencia

Jaime Moreno-Chaparro: búsqueda bibliográfica, selección de títulos, extracción de datos y discusión de la evidencia

Nathaly Garzón-Orjuela: diseño del estudio, búsqueda bibliográfica, selección de títulos y extracción de datos

Zulma Urrego-Mendoza: diseño del estudio
Daniel Samacá-Samacá: búsqueda bibliográfica y selección de títulos

Javier Eslava-Schmalbach: diseño del estudio y discusión de la evidencia

Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

Financiación:

Este estudio hace parte del proyecto de investigación "Red intersectorial basada en la comunidad para el manejo de problemas y trastornos mentales asociados con el desplazamiento forzado por conflicto armado en el municipio de Soacha – Cundinamarca (estudio piloto)"; financiado por la Convocatoria Nacional Sesquicentenario de la Universidad Nacional de Colombia 2017.

Conflicto de intereses:

No existe ninguno.

Introducción. Los conflictos armados dejan consecuencias evidentes en la salud mental de la población infantil y adolescente. En ese marco, se ha documentado una serie de situaciones que tienen como factor común la vulnerabilidad de esta población y las afectaciones biopsicosociales significativas.

Objetivo. Determinar y sintetizar las diferentes consecuencias de los conflictos armados en la salud mental de la población infantil y adolescente.

Materiales y métodos. Se realizó una búsqueda sistemática exhaustiva de revisiones bibliográficas hasta julio de 2019 en las bases de datos MEDLINE (Ovid), EMBASE, Cochrane Central Register of Controlled Trials, LILACS y otras. Se seleccionaron los artículos y se analizaron de forma narrativa sus características, objetivos y consecuencias en salud mental en tres momentos: antes del conflicto, durante el conflicto y en el posconflicto.

Resultados. De un total de 587 artículos potencialmente relevantes, se seleccionaron 72. En los estudios sobre el periodo anterior al conflicto, se detallaron experiencias psicológicas y síntomas somáticos anticipatorios. Durante el conflicto, se evidenciaron síntomas regresivos, conductuales y cognitivos, como enuresis, miedo, tristeza, agresión, hiperactividad e inatención, entre otros. Además, se establecieron consecuencias directas, como trastornos de adaptación, depresión, ansiedad y, en mayor medida, estrés postraumático. Por último, en el posconflicto, se recopiló la información sobre los procesos de transmisión de las consecuencias y la resiliencia. Por otro lado, se profundizó en las consecuencias potenciales en el desarrollo biopsicosocial, la moralidad, la identidad, el contexto, la cultura, la educación y la sociedad.

Conclusiones. Las consecuencias de los conflictos armados en la salud mental se inscriben en un proceso complejo que se expresa en función de la etapa evolutiva de la exposición, del tiempo del conflicto armado y de los factores contextuales.

Palabras clave: niños; adolescentes; salud mental; conflictos armados; violencia; guerra.

Mental health consequences of armed conflicts in children and adolescents: An overview of literature reviews

Introduction: Armed conflicts affect the mental health of children and adolescents. Their outcomes in these populations have been documented identifying vulnerability and significant biopsychosocial damage as the most common factors.

Objective: To identify and synthesize the mental health consequences of armed conflicts in children and adolescents.

Materials and methods: We carried out a comprehensive and systematic search of reviews published until July 2019 in the MEDLINE (Ovid), EMBASE, Cochrane Central Register of Controlled Trials, and LILACS databases, as well as in additional sources. The information was retrieved and analyzed narratively by describing the characteristics and objectives of the studies and the mental health consequences of armed conflicts in three periods of time: pre-armed conflict, during the armed conflict, and post-conflict.

Results. Out of 587 potentially relevant studies, we finally selected 72. In the pre-armed conflict period, we described in detail the psychological experiences and the anticipatory somatic symptoms. During the conflict, we identified regressive, behavioral, and cognitive

symptoms such as enuresis, fear, sadness, aggression, hyperactivity, and inattention, among others. Direct mental health consequences such as adjustment disorders, depression, anxiety, and post-traumatic stress were also identified. Finally, in the post-conflict period, we referred to the transmission of mental health consequences and resilience processes. On the other hand, we reviewed in depth the potential consequences of armed conflicts on biopsychosocial development, morality, identity, culture, education, and society.

Conclusion. The development of mental health consequences due to the exposure to armed conflicts in these populations is a complex process that depends on the stage of the exposure, the length of the conflict, and contextual factors.

Keywords: Child; adolescent; mental health; armed conflicts; violence; warfare.

Según el reporte *Conflict Barometer* del *Heidelberg Institute for International Conflict Research*, entre el 2018 y el 2019 se registraron 374 conflictos sociopolíticos activos en el mundo, de los cuales más del 57 % se desarrolló de forma violenta (1). El Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) señaló, en el 2018, que la violencia extrema contra niños y adolescentes es una constante en los conflictos armados (2). La utilización de infantes y adolescentes como escudos humanos y su reclutamiento forzado son tácticas vigentes, a las que se suman otras formas de violencia como el secuestro, el abuso y la explotación sexual, con serias repercusiones para la salud de las víctimas (2).

En el marco de los conflictos armados y otras emergencias humanitarias, se emplean de manera complementaria, aunque diferenciada, los conceptos de salud mental y bienestar psicosocial (3). Los organismos del sector de la salud suelen preferir la denominación de salud mental, que alude a aquellas condiciones emocionales, cognitivas y conductuales de las personas afectadas que se abordan desde el paradigma biomédico, en tanto que el término bienestar psicosocial se emplea en las ciencias sociales para referirse a aquellas afectaciones que requieren la intervención y la rehabilitación psicosocial para prevenirlas y superarlas (3,4). En suma, cualquier emergencia humanitaria, incluidos los conflictos armados, tiene efectos complejos que mezclan la perspectiva psicosocial y la de salud mental.

Las vivencias inherentes a los conflictos armados, no solo atentán contra la seguridad y la estabilidad de las poblaciones, sino que producen sufrimiento con consecuencias en la salud mental y el bienestar psicosocial (5,6). En la población infantil, estas afectaciones comprometen procesos sociales, productivos, capacidades y habilidades para convivir en la comunidad (7). Varios estudios coinciden en que la vulnerabilidad es mayor cuando la exposición ocurre en etapas tempranas de la vida (6,8-11) como consecuencia de la muerte o la separación forzada de los seres queridos (12-15). Las secuelas físicas de los ataques directos incrementan esta vulnerabilidad (14-16). Algunos factores contextuales que se suman a lo anterior son el aumento de la pobreza y la discriminación (15,16), el acceso deficiente a los servicios públicos, el hacinamiento o el aislamiento (8,16,17).

Además de la alteración de las competencias de tipo social y productivo en infantes y adolescentes expuestos a conflictos armados, se reportan en los estudios altas tasas de trastornos y síntomas mentales, especialmente del espectro ansioso, depresivo y traumático (trastornos de estrés postraumático). Las dificultades en la atención, la inseguridad, la agresividad, las distorsiones cognitivas y el consumo de sustancias psicoactivas son expresiones de dichos trastornos y de otros problemas psicosociales (14,16). En oposición a estas consecuencias psicopatológicas, algunos estudios plantean potenciales efectos positivos, específicamente la resiliencia (6,8). En las revisiones

publicadas, la influencia del contexto social y de otros factores, como la etapa del conflicto sociopolítico y su ubicación geográfica, limitan la interpretación de los resultados (8,15,18). Para ofrecer un panorama general de tales consecuencias en la salud mental de niños y adolescentes, se llevó a cabo una revisión de revisiones de la literatura, con el fin de sintetizarlas y plantear recomendaciones encaminadas a mejorar la investigación en este campo.

Materiales y métodos

Se realizó una búsqueda bibliográfica sistemática y exhaustiva, siguiendo las directrices del grupo Cochrane para revisiones sistemáticas (19).

Criterios de inclusión de los estudios

Se consideraron las revisiones narrativas o sistemáticas, con o sin metaanálisis, de estudios cuantitativos o cualitativos que incluyeran a la población infantil o adolescente expuesta a conflictos armados y presentara las consecuencias o afectaciones de su salud mental y desarrollo biopsicosocial. No se restringió por idioma o año de publicación.

Método de búsqueda de los estudios

La *búsqueda* (anexo 1) incluyó los estudios publicados hasta julio del 2019 en las bases de datos MEDLINE (plataforma Ovid), EMBASE, *Cochrane Database of Systematic Reviews* (plataforma Ovid) y LILACS. Asimismo, se hizo una búsqueda de literatura gris en *Open Grey* y *Google académico*, y se buscó manualmente en los listados de referencias de los estudios incluidos (bola de nieve).

Tamización y extracción de datos

La selección inicial de estudios a partir de los títulos y *resúmenes* estuvo a cargo de dos revisores de manera independiente con base en los criterios de inclusión. Los desacuerdos se solucionaron por consenso entre los dos, revisando de nuevo los criterios y los estudios. Posteriormente, se hizo una segunda tamización para verificar los criterios de inclusión mediante la revisión del texto completo.

Síntesis de la evidencia

Debido a la gran heterogeneidad de los estudios, no fue posible combinar los resultados de las revisiones sistemáticas. Por lo tanto, se elaboró una síntesis narrativa de los hallazgos centrada en la recolección de la mayor cantidad de información sobre el tema, con el fin de determinar el conjunto de saberes que se ha ido construyendo a lo largo del tiempo, el cual se refleja en la recopilación y síntesis juiciosa de los estudios secundarios sobre el tema. Por ello, y teniendo en cuenta el enfoque temático, se decidió descartar la evaluación de la calidad de la evidencia privilegiando el conocimiento.

La síntesis se consolidó a partir del concepto ampliado de salud mental, que abarca el paradigma biomédico y el de bienestar psicosocial, exponiendo en cada uno las afectaciones evidenciadas en los estudios consultados. Los hallazgos se organizaron en torno a los momentos detectables de los conflictos armados en los que las consecuencias aparecían como significativas. En un primer momento, correspondiente al periodo previo al conflicto, estas consecuencias se relacionan con la representación anticipatoria de los eventos traumáticos asociados. Con el inicio del conflicto, se desarrolla un

nuevo momento en el cual se consolidan diferentes consecuencias que, posteriormente, evolucionan en un tercer momento, el del posconflicto.

Resultados

Se encontraron 587 estudios potencialmente relevantes después de eliminar los duplicados. Después de la revisión del texto completo mediante la metodología PRISMA (20), se excluyeron 82 referencias (figura 1, anexo 2); finalmente, se incluyeron 72 publicaciones para la síntesis de evidencia. Las características generales de los estudios incluidos se presentan en el cuadro 1.

El periodo de publicación de los estudios abarcó de 1989 (21) a 2018 (22,23). El 61,1 % de ellos correspondió a revisiones de tipo narrativo y el 38,9 %, a revisiones sistemáticas. Los tipos de estudios incluyeron: a) todos los tipos de estudios cuantitativos y cualitativos; b) estudios exclusivamente cuasiexperimentales o experimentales, transversales o retrospectivos; c) estudios específicos de seguimiento a largo plazo, y d) estudios etnográficos y de casos (24). Las especificidades de las poblaciones abordadas en los estudios se detallan en la figura 2; además, en el cuadro 2 se puntualizan los estudios incluidos.

Principales consecuencias en la salud mental

Según los estudios revisados, las consecuencias negativas predominantes en la salud mental en el periodo previo al conflicto, el conflicto y el posconflicto, se enmarcaron en el espectro de la depresión, la ansiedad y el estrés postraumático.

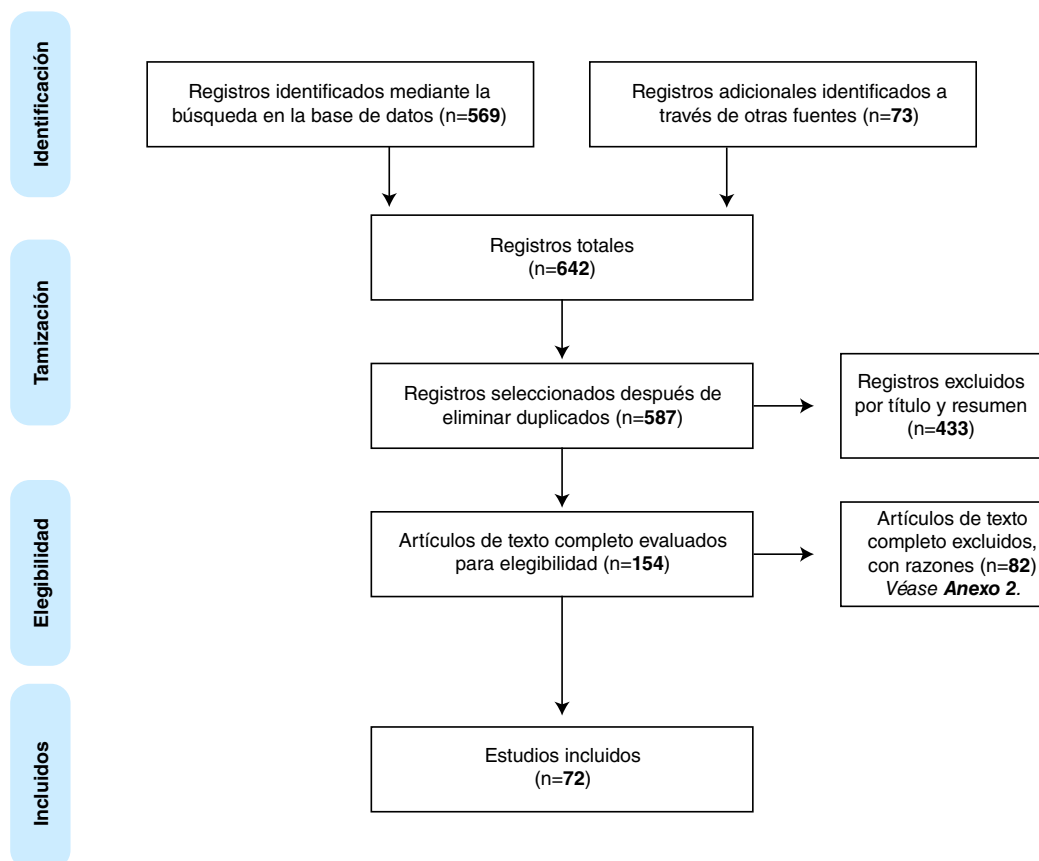


Figura 1. Diagrama de flujo (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*, PRISMA®)

Cuadro 1. Características generales de los estudios incluidos

Autor y referencia	Tipo de revisión	Tipos de estudios	Número de estudios incluidos	Población
1 Gibson K (1989)	Narrativa	Todos los referentes a la temática	No reportado, tomaron 70 referencias en total.	Víctimas de conflicto
2 Jensen PS, Shaw J (1993)	Narrativa	Todos los estudios y literatura sobre la existencia, frecuencia y tipo de problemas sociales, emocionales y de comportamiento	No reportado, tomaron 80 referencias en total.	Víctimas de conflicto
3 Elbedour S, Ten Benseel R, Bastien DT (1993)	Narrativa	Estudios que revisan la interacción de factores sociales, biológicos e individuales en la intensidad del trauma	No reportado, tomaron 65 referencias en total.	Víctimas de conflicto
4 Fox PG, Cowell JM, Montgomery AC (1994)	Sistemática	Diseños cuasiexperimentales o experimentales. Todos los estudios fueron transversales y retrospectivos y se publicaron entre 1983 y 1992.	12 incluidos	Refugiados del sudeste asiático
5 Rousseau C (1995)	Narrativa	Todos los referentes a la temática	No reportado, tomaron 108 referencias en total.	Refugiados
6 Summerfield D (2000)	Narrativa	Todos los referentes a la temática	No reportado, tomaron 28 referencias en total.	Víctimas de conflicto
7 Davis L, Siegel LJ (2000)	Narrativa	Todos los referentes a la temática, específicamente a TEPT	No reportado, tomaron 117 referencias en total.	Víctimas de conflicto
8 Berman H (2001)	Narrativa	Todos los referentes a la temática, específicamente a TEPT	No reportado, tomaron 73 referencias en total.	Refugiados
9 Mandalakas AM (2001)	Narrativa	Estudios de los efectos a largo plazo	No reportado, tomaron 40 referencias en total.	Expuestos a emergencias humanitarias complejas
10 Fazel M, Stein A (2002)	Narrativa	Todos los referentes a la temática	No reportado, tomaron 55 referencias en total.	Refugiados
11 Hoven CW, Duarte CS, Mandell DJ (2003)	Narrativa	Todos los referentes a la temática	No reportado, tomaron 55 referencias en total.	Refugiados
12 van Ijzendoorn MH, Bakermans-Kranenburg MJ, Sagi-Schwartz A (2003)	Sistemática	Todos los referentes a la temática	32 incluidos	Víctimas de conflicto
13 Pfefferbaum B, Pfefferbaum RL, Gurwitch RH, Nagumalli S, Brandt EN, Robertson MJ, <i>et al.</i> (2003)	Narrativa	Todos los referentes a la temática con énfasis en salud mental, servicios para niños y ambiente posterior al ataque	No reportado, tomaron 43 referencias en total.	Víctimas de conflicto
14 DeRanieri JT, Clements PT, Clark K, Kuhn DW, Manno MS (2004)	Narrativa	Todos los referentes a la temática	No reportado, tomaron 34 referencias en total.	Víctimas de conflicto
15 Barenbaum J, Ruchkin V, Schwab-Stone M (2004)	Narrativa	Todos los referentes a la temática	No reportado, tomaron 207 referencias en total.	Víctimas de conflicto
16 Lustig SL, Kia-Keating M, Knight WG, Geltman P, Ellis H, Kinzie JD, <i>et al.</i> (2004)	Narrativa	Todos los referentes a la temática	No reportado, tomaron 105 referencias en total.	Refugiados
17 Pine DS, Costello J, Masten A (2005)	Narrativa	Todos los referentes a la temática	No reportado, tomaron 109 referencias en total.	Víctimas de conflicto
18 Ehntholt KA, Yule W (2006)	Narrativa	Estudios publicados sobre las dificultades de salud mental de los niños y adolescentes refugiados	No reportado, tomaron 111 referencias en total.	Refugiados
19 Moss WJ, Ramakrishnan M, Storms D, Siegle AH, Weiss WM, Lejnev I, <i>et al.</i> (2006)	Narrativa	Todos los referentes a la temática	No reportado, tomaron 56 referencias en total.	Víctimas de conflicto
20 Williams R (2006)	Narrativa	Todos los referentes a la temática	No reportado, tomaron 85 referencias en total.	Víctimas de conflicto
21 Williams R (2007)	Narrativa	Todos los referentes a la temática	No reportado, tomaron 94 referencias en total.	Víctimas de conflicto
22 Morris J, van Ommeren M, Belfer M, Saxena S, Saraceno B (2007)	Sistemática	Diseños enfocados a la temática con énfasis en estudios de casos e investigación etnográfica	No reportado, tomaron 89 referencias en total.	Víctimas de conflicto y participación como combatientes
23 Betancourt TS, Khan KT (2008)	Narrativa	Todos los referentes a la temática	No reportado, tomaron 99 referencias en total.	Víctimas de conflicto
24 Neuner F, Catani C, Ruf M, Schauer E, Schauer M, Elbert T (2008)	Narrativa	Estudios longitudinales y de seguimiento	No reportado, tomaron 93 referencias en total.	Víctimas de conflicto
25 Lustig SL, Tennakoon L (2008)	Narrativa	Estudios de narrativas y testimonios con énfasis en experiencia, testimonio y análisis del impacto	14 incluidos	Refugiados
26 Dekel R, Goldblatt H (2008)	Narrativa	Todos los referentes a la temática, específicamente de tipo empírico, clínicos y descriptivos de orden cualitativo y cuantitativo	16 estudios empíricos que describen 17 proyectos	Víctimas de conflicto
27 Qouta S, Punamäki R-L, El Sarraj E (2008)	Narrativa	Todos los referentes a la temática	11 artículos principales y 82 referencias de soporte	Víctimas de conflicto
28 Prasad AN, Prasad PL (2009)	Narrativa	Todos los referentes a la temática	No reportado, tomaron 23 referencias en total.	Víctimas de conflicto
29 Jordans MJD, Tol WA, Komproe IH, De Jong JVTM (2009)	Sistemática	Todos los estudios relevantes al tema incluidos ensayos clínicos aleatorizados, de diseño cuasiexperimental y estudios de caso	66 incluidos	Víctimas de conflicto
30 Persson TJ, Rousseau C (2009)	Sistemática	Todos los referentes a la temática con especificidad en empíricos	7 incluidos	Víctimas de conflicto

31	Sullivan PM (2009)	Sistemática	Todos los referentes a la temática	50 incluidos	Víctimas de conflicto con discapacidades
32	Attanayake V, McKay R, Joffres M, Singh S, Burkle F, Mills E (2009)	Sistemática	Todos los referentes a la temática con énfasis en trastorno de estrés postraumático (TEPT)	17 incluidos	Víctimas de conflicto
33	Torrado M, Camargo M, Pineda N, Bejarano D (2009)	Narrativa - estado del arte	Todos los diseños enfocados a la temática	No reportado, tomaron 33 referencias en total.	Víctimas de conflicto, principalmente < 6 años
34	Steel Z, Chey T, Silove D, Marnane C, Bryant RA, van Ommeren M (2009)	Sistemática	Todos los diseños enfocados a la temática	181 incluidos	Refugiados
35	Crowley C (2009)	Narrativa	Todos los estudios referentes a la temática	No reportado, tomaron 52 referencias en total.	Refugiados
36	Peltonen K, Punamäki RL (2010)	Narrativa	Todos los estudios relevantes en el tema incluidos ensayos clínicos aleatorizados, diseños cuasiexperimentales y estudios de caso	16 estudios, 4 ensayos clínicos aleatorizados, 11 diseños de antes y después, 1 estudio de caso	Refugiados
37	Hernández-Barrera A, Restrepo-Espinosa M (2011)	Narrativa	Todos los diseños referentes a la temática	No reportado, tomaron 51 referencias en total.	Refugiados/ desplazamiento
38	White CJ, De Burgh HT, Fear NT, Iversen AC (2011)	Sistemática	Todos los diseños referentes a la temática	9 incluidos	Hijos de militares/víctimas de conflicto
39	Bronstein I, Montgomery P (2011)	Sistemática	Todos los diseños referentes a la temática con énfasis en refugiados	22 estudios	Refugiados
40	Henley J, Robinson J (2011)	Narrativa	Todos los diseños referentes a la temática	No reportado, tomaron 104 referencias en total.	Refugiados
41	Yahav R (2011)	Narrativa	Todos los diseños referentes a la temática	No reportado, tomaron 80 referencias en total.	Víctimas de conflicto
42	Montgomery E (2011)	Narrativa de estudios empíricos	Todos los diseños referentes a la temática con énfasis en estudios cualitativos de familias y, en especial, niños sobrevivientes de tortura	11 estudios específicos	Víctimas de conflicto/ refugiados
43	Bohleber W (2012)	Narrativa	Todos los diseños enfocados a la temática	No reportado, tomaron 18 referencias en total	Víctimas de conflicto
44	Werner, E. E. (2012)	Sistemática	Todos los diseños enfocados a la temática con énfasis en los de corte transversal	No se menciona el número de estudios incluidos.	Víctimas de conflicto énfasis en II Guerra Mundial
45	Masten AS, Narayan AJ (2012)	Narrativa	Todos los diseños enfocados a la temática	No se menciona el número de estudios incluidos.	Víctimas de conflicto
46	Drury J, Williams R. (2012)	Narrativa	Todos los diseños enfocados a la temática entre 2009 y 2012	No reportado, tomaron 46 referencias en total.	Víctimas de conflicto
47	Dimitry L (2012)	sistemática	Todos los diseños enfocados a la temática con énfasis en edades de 0 a 19 años	No reportado, tomaron 71 referencias en total.	Víctimas de conflicto
48	Reed R V, Fazel M, Jones L, Panter-Brick C, Stein A (2012)	Sistemática	Todos los diseños referentes a la temática	27 incluidos	Víctimas de conflicto
49	Fazel M, Reed R V, Panter-Brick C, Stein A (2012)	Sistemática	Todos los diseños referentes a la temática entre 1980 y 2010	44 incluidos	Víctimas de conflicto/ desplazados
50	Betancourt TS, Meyers-Ohki SE, Charrow AP, Tol WA (2013)	Sistemática	Todos los diseños referentes a la temática	40 incluidos	Víctimas de conflicto
51	Forman-Hoffman VL, Zolotor AJ, McKeeman JL, Blanco R, Knauer SR, Lloyd SW, <i>et al.</i> (2013)	Sistemática	Diseños referentes a la temática con énfasis en ensayos clínicos aleatorizados controlados y estudios de cohorte	22 incluidos	Víctimas de conflicto entre 0 y 17 años
52	Betancourt TS, McBain R, Newnham EA, Brennan RT (2013)	Sistemática	Diseños referentes a la temática con énfasis en estudios de antes y después, estudios longitudinales, estudios observacionales, ensayos clínicos aleatorizados	22 incluidos	Víctimas de conflicto asociados con las fuerzas y grupos armados
53	Rousseau C, Jamil U, Bhui K, Boudjarane M (2013)	Sistemática con métodos mixtos	Diseños referentes a la temática con énfasis en estudios cuantitativos y cualitativos	21 revisiones, 73 estudios cuantitativos, 13 estudios cualitativos, 122 estudios de intervención	Víctimas de conflicto entre los 0 y 20 años
54	Tol WA, Song S, Jordans MJD (2013)	Sistemática	Diseños referentes a la temática con énfasis en estudios de métodos cualitativos, cuantitativos y mixtos	53 incluidos	Víctimas de conflicto
55	Shaar KH (2013)	Sistemática	Diseños referentes a la temática con énfasis en estudios transversales, validación de escalas y una intervención	11 incluidos	Víctimas de conflicto
56	Pacione L, Measham T, Rousseau C (2013)	Narrativa	Todos los diseños referentes a la temática	No referenciado, tomaron 100 referencias en total.	Refugiados
57	Agazio J, Goodman P, Padden DL (2014)	Narrativa	Diseños referentes a la temática con énfasis en estudios investigativos, teóricos, programáticos y documentos gubernamentales	No reportado, tomaron 100 referencias en total.	Víctimas de conflicto
58	Fu C, Underwood C (2015)	Sistemática	Todos los diseños referentes a la temática	11 incluidos	Víctimas de conflicto
59	Foster H, Brooks-Gunn J (2015)	Narrativa	Todos los diseños enfocados a la temática	20 incluidos	Víctimas de conflicto
60	Rosshandler Y, Hall BJ, Canetti D (2016)	Sistemática	Todos los diseños referentes a la temática	20 incluidos	Víctimas de conflicto con énfasis en adolescentes
61	Miller KE, Jordans MJD (2016)	Narrativa	Todos los diseños enfocados a la temática	46 referencias	Víctimas de conflicto

62	Slone M, Mann S (2016)	Sistemática	Todos los diseños referentes a la temática. Se excluyeron capítulos de libro al evidenciar que la información se solapaba con la registrada en artículos publicados	35 incluidos (34 cualitativos y 1 cuantitativo)	Víctimas de conflicto
63	Jordans MJD, Pigott H, Tol WA (2016)	Sistemática	Diseños referentes a la temática con énfasis en estudios de ensayos controlados aleatorios individuales (ECA), controlados aleatorios grupales, controlados, no controlados y de caso	24 incluidos	Víctimas de conflicto
64	Sleijpen M, Boeije HR, Kleber RJ, Mooren T (2016)	Sistemática	Diseños referentes a la temática con énfasis en estudios cualitativos o de métodos mixtos	26 incluidos	Víctimas de conflicto énfasis en edad (10-20 años)
65	Hassan G, Ventevogel P, Jefee-Bahloul H, Barkil-Oteo A, Kirmayer LJ (2016)	Narrativa	Todos los diseños enfocados a la temática	No reportado, tomaron 111 referencias en total.	Refugiados/desplazados
66	Neal S, Stone N, Ingham R (2016)	Sistemática	Todos los diseños enfocados a la temática	19 incluidos	Víctimas de conflicto, énfasis en mujeres
67	Saltzman LY, Solomyak L, Pat-Horenczyk R (2017)	Narrativa	Todos los diseños enfocados a la temática	No reportado, tomaron 89 referencias en total.	Víctimas de conflicto
68	Stough LM, Ducey EM, Kang D (2017)	Narrativa	Todos los diseños enfocados a la temática	92 referencias	Víctimas de conflicto con discapacidad
69	Anagnostopoulos DC, Giannakopoulos G, Christodoulou NG (2017)	Narrativa	Todos los diseños enfocados a la temática	No reportado, tomaron 45 referencias en total.	Víctimas de conflicto
70	Brown FL, de Graaff AM, Annan J, Betancourt TS (2017)	Sistemática	Diseños referentes a la temática con énfasis en estudios de ensayos controlados aleatorios y ensayos controlados	28 incluidos	Víctimas de conflicto
71	Kadir A, Shenoda S, Goldhagen J (2018)	Narrativa	Todos los diseños enfocados a la temática	No reportado, tomaron 172 referencias en total.	Víctimas de conflicto
72	Fajardo-Mayo MA, Ramírez-Lozano MP, Suescún V, Isabel M, Ospina-Alvarado MC (2018)	Sistemática	Todos los diseños enfocados a la temática con énfasis en primera infancia	15 incluidos, 35 descartados	Víctimas de conflicto

TEPT: trastorno de estrés postraumático

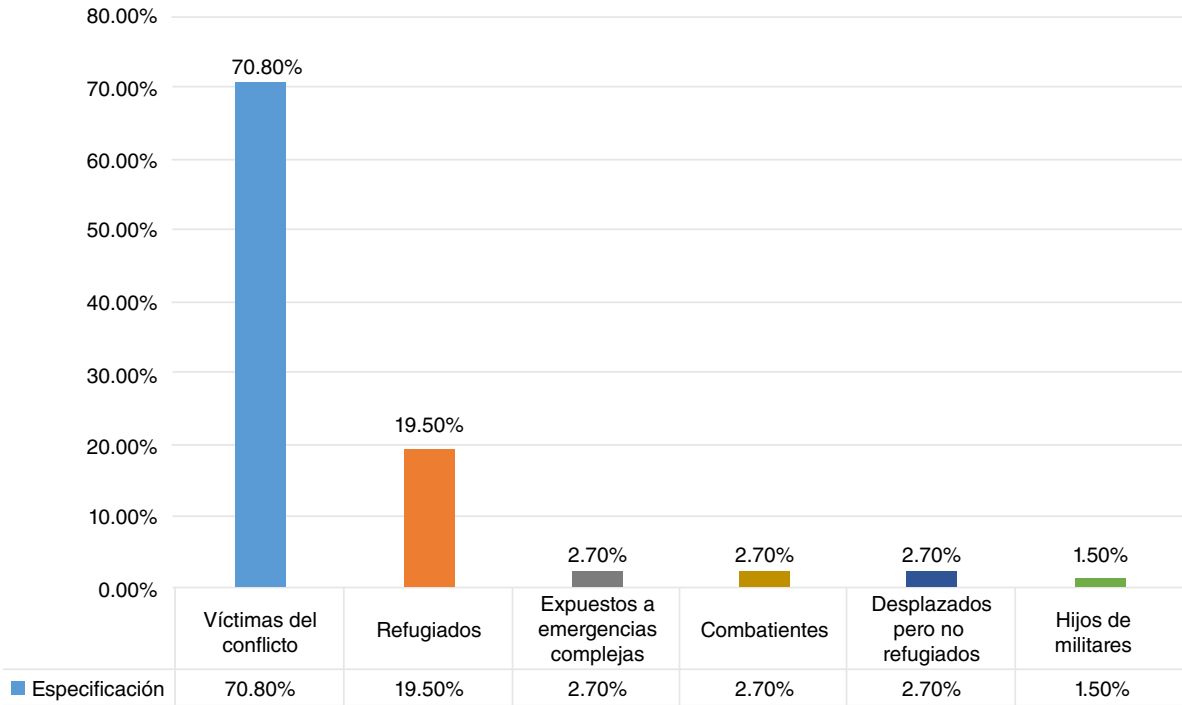


Figura 2. Especificidades de la población

Cuadro 2. Descripciones y detalles de los estudios.

Autor y referencia	Objetivo del estudio	Desenlace o consecuencia en salud mental	Conclusiones
1 Gibson K (1989)	Evaluar la utilidad de la literatura sobre niños en situaciones de guerra y desastres	Existe una distinción entre reacciones crónicas y agudas; las crónicas caracterizadas por síntomas debilitantes y persistentes, las agudas por reacciones normales frente a la exposición a eventos altamente estresantes	El contexto social y familiar es importante en el afrontamiento de situaciones derivadas del conflicto, se requiere que desde todos los sectores se brinden espacios seguros de diálogo y solución de problemas.
2 Elbedour S, ten Bensele R, Bastien DT (1993)	Revisión de la investigación sobre los niños de la guerra	Algunas de las expresiones que se manifiestan después de la experiencia de guerra son el miedo, la ansiedad, el terror o nerviosismo, la depresión, tristeza, ira, vergüenza y culpa. Entre los problemas comportamentales se encuentran agresión, violencia y hostilidad.	Los niños de la guerra pasan por una serie de reacciones emocionales a la situación y sus cambios emocionales no pueden entenderse por fuera de la dinámica familiar y social, y comprenderlo es necesario para el adecuado curso de la terapia.
3 Jensen PS, Shaw J (1993)	Evaluar los efectos de los factores estresantes relacionados con la guerra en niños y adolescentes	Los niños y niñas de la guerra manifiestan comportamientos regresivos, agresión episódica, trastornos psicofisiológicos, cambios en el rendimiento escolar, cambios de personalidad y diversos tipos de depresión y ansiedad.	Las intervenciones deben guiarse de manera individual (ventilación, canalización de la agresión, exposición gradual in vivo a situaciones temidas y reevaluación cognitiva, comunitaria y familiar).
4 Fox PG, Cowell JM, Montgomery AC (1994)	Aclarar la investigación centrada en las necesidades de un grupo de refugiados del sudeste asiático	El estrés y la depresión de los padres puede tener un impacto negativo en el ajuste psicosocial de los niños y en su logro académico.	La discriminación y un ambiente inadecuado en la posguerra pueden intensificar eventos traumáticos, por el contrario, un ambiente de apoyo puede mitigarlo.
5 Rousseau C (1995)	Resumir el conocimiento de las manifestaciones del trastorno emocional entre los niños refugiados	La sintomatología relacionada con el conflicto incluye ansiedad, pesadillas, insomnio, enuresis, introversión, depresión, problemas de comportamiento, dificultades académicas, anorexia y problemas somáticos.	Los niños refugiados están en alto riesgo de desarrollar problemas de salud mental debido a los estresores extremos que experimentan en los períodos previos y posteriores a la migración.
6 Davis L, Siegel LJ (2000)	Revisar la presencia de TEPT en relación con niños y adolescentes en situaciones que incluyen el conflicto armado	Los principales síntomas de TEPT fueron pesadillas, respuesta de sobresalto exagerada, conducta de evitación, dificultad para dormir y concentrarse, así como síntomas depresivos como apetito y cambios de peso.	Después del trauma, los niños volvieron a experimentar el evento a través del juego repetitivo, a menudo participando en juegos de secuestro en un esfuerzo por reducir su ansiedad.
7 Summerfield D (2000)	Proporcionar un telón de fondo para encuentros potenciales o reales entre un niño refugiado y profesionales de la salud mental en países occidentales	Es necesario reconocer el peligro de reducir las experiencias de los niños a una cuestión de salud mental y ver los problemas de vulnerabilidad únicamente en términos psicológicos más que sociales.	Al analizar o intervenir es importante tener una visión tan sofisticada como sea posible de las realidades complejas y cambiantes en las que el niño está enmarcado actualmente.
8 Berman H (2001)	Examinar críticamente el énfasis generalizado en la literatura sobre el trastorno de estrés postraumático (TEPT)	Condiciones deplorables de vida, separación de cuidadores, hermanos y padres es más estresante que los bombardeos. A pesar de la protección de sus padres, se presenta una serie de dificultades emocionales y de comportamiento.	Los niños refugiados se ven afectados de múltiples maneras por el conflicto. Para algunos niños y niñas la violencia representa una amenaza directa para su salud y bienestar.
9 Mandalakas AM (2001)	Evaluar la vulnerabilidad del desarrollo a largo plazo encontrados en niños expuestos a emergencias humanitarias complejas	La vulnerabilidad de los niños y niñas puede ser atribuida a un gran número de factores, incluyendo las reservas limitadas de alimentos, lo que incrementa el riesgo de disminuir las funciones cognitivas, comportamentales y psicológicas.	Los síntomas de trauma psicológico en niños y niñas suelen tener una naturaleza diferente a los de los adultos, por lo que se hace preciso prestar atención profesional con recomendaciones ajustadas a la cultura.
10 Fazel M, Stein A (2002)	Revisar la evidencia sobre el impacto del desplazamiento en la salud mental de los niños	Se reportan niveles elevados de morbilidad psicológica entre los niños refugiados, especialmente el trastorno de estrés postraumático, depresión y trastornos de ansiedad. Los estudios de niños refugiados recién llegados muestran tasas de ansiedad del 49 al 69 %.	Los estudios establecieron factores protectores como: (1) un entorno familiar de apoyo; (2) una agencia social externa y (3) una disposición de personalidad positiva. La prevención primaria puede llevarse a cabo en el contexto escolar.
11 Hoven CW, Duarte CS, Mandell DJ (2003)	Resumir los resultados de estudios sistemáticos sobre las reacciones de estrés postraumático en niños después de desastres masivos	Se reportan niveles elevados de síntomas de estrés postraumático con prevalencias de hasta 87 %. La literatura muestra que las reacciones de estrés postraumático no son temporales, sino que persisten en el tiempo.	Se observó de manera consistente en todos los estudios el mayor riesgo de reacciones de estrés postraumático después de un desastre masivo para niñas y niños más pequeños.
12 van Ijzendoorn MH, Bakermans-Kranenburg MJ, Sagi-Schwartz A (2003)	Probar la hipótesis de "traumatización secundaria" en familias sobrevivientes del Holocausto	Estudios clínicos han reportado alteraciones en las relaciones familiares y en el comportamiento por parte de los sobrevivientes del holocausto y de su descendencia.	Posiblemente la "traumatización secundaria" es transmitida de manera no verbal a los niños por madres que sufrieron pérdidas no resueltas de familiares cercanos.
13 Pfefferbaum B, Pfefferbaum RL, Gurwitsch RH, Nagumalli S, Brandt EN, Robertson MJ, et al. (2003)	Resumir los estudios que abordan el impacto de los incidentes terroristas en los niños y niñas	Después del ataque del 11/09/2001 se evidenció que el 10,5 % de los niños desarrollaron desórdenes de estrés postraumático y al menos la cuarta parte tenía alteraciones en salud mental. A nivel general los niños presentaron agorafobia (15 %), ansiedad (12 %), desórdenes de conducta (11 %), ansiedad generalizada (10 %) y pánico (9 %).	La relación entre la exposición y los síntomas de estrés postraumático deben ser interpretados con cautela; la exposición, la muestra y otras variables podrían alterar los resultados.

- | | | | | |
|----|---|---|--|---|
| 14 | DeRanieri JT, Clements PT, Clark K, Kuhn DW, Manno MS (2004) | Explorar el impacto potencial de la guerra y el terrorismo en niños e identificar métodos para la educación familiar | Al proporcionar un entorno terapéutico, se debe recordar que los niños atravesarán dos etapas de afrontamiento de eventos traumáticos: aceptación y la formulación de más preguntas, las cuales deben responder de manera asertiva. | Se debe hacer todo lo posible para explicar a los niños lo que ha ocurrido de la manera más directa. Los niños y niñas necesitan garantías sobre su seguridad y la seguridad de los demás durante toda su infancia, incluso en tiempos difíciles. |
| 15 | Barenbaum J, Ruchkin V, Schwab-Stone M. (2004) | Revisar la literatura existente sobre enfoques para ayudar a los niños afectados por la guerra | En casos como los niños israelíes el TEPT se presentó en el 22 %, en la guerra libanesa en el 27 %, en el conflicto de Camboya en el 48 %, en niños refugiados de América Central en el 52 %, en Kuwait en el 70 % después de 5 meses de ocupación militar y hasta el 93,8 % en niños desplazados en la guerra de Bosnia. | La guerra produce conflictos mentales en los niños, ya que puede forzarlos a tomar posiciones o actitudes que van en contra de sus principios. Estos pueden ir desde lo que es bueno o malo, el no aceptar la escuela y aceptar la guerra, los héroes y el contexto. |
| 16 | Lustig SL, Kia-Keating M, Knight WG, Geltman P, Ellis H, Kinzie JD, et al. (2004) | Revisar las experiencias estresantes y las reacciones al estrés entre los niños y adolescentes refugiados | Los niños nacidos en la fase de vuelo tienden a tener alteraciones importantes en el desarrollo psicológico. En la fase de reasentamiento, los sentimientos de pérdida de su hogar, familiares, amigos y posesiones materiales, hacen que se cree un nuevo lenguaje y cultura que impacta con las culturas y lógicas de otros sitios. | El impacto de la guerra en niños refugiados se manifiesta empíricamente en modelos de enfermedad e incluyen múltiples traumas, retos de aculturación, resiliencia y las formas de vida con la sintomatología. |
| 17 | Pine DS, Costello J, Masten A (2005) | Resumir la literatura relevante sobre los efectos del terrorismo en la salud mental de los niños | Un predictor clave y potencialmente modificable de los resultados de los niños parece ser cómo se comportan los adultos; se ha encontrado que las ansiedades de los padres median los efectos del trauma distante en los temores de los niños. | En el trauma masivo, todos los aspectos de la vida de un niño o niña pueden haber colapsado. |
| 18 | Ehnholt KA, Yule W (2006) | Identificar y revisar los estudios publicados sobre las dificultades de salud mental de los niños y adolescentes refugiados | Aunque los refugiados jóvenes a menudo son resilientes, muchos experimentan dificultades de salud mental, como TEPT, depresión, ansiedad y dolor, además de aspectos como quejas somáticas, problemas de sueño, trastorno de conducta, retraimiento social, problemas de atención, miedo generalizado, dependencia exagerada, inquietud e irritabilidad. | Las personas que atienden a niños, niñas y adolescentes deben ser conscientes de que, aunque el TEPT se diagnostica con frecuencia, otras dificultades de salud mental, como la depresión, la ansiedad, el dolor, problemas de sueño y escolares, suelen coexistir y no deben pasarse por alto. |
| 19 | Moss WJ, Ramakrishnan M, Storms D, Siegle AH, Weiss WM, Lejnev I, et al. (2006) | Identificar las necesidades de investigación y mejorar las pautas para el cuidado de los niños | Los niños expuestos a conflictos armados o duras condiciones de vida de los campos de refugiados tienen altas tasas de problemas psiquiátricos graves. Aunque la mayoría de los estudios informan altas tasas de TEPT, la depresión y la ansiedad pueden afectar a un mayor número de niños y contribuir más a la carga psicológica a largo plazo. | Las necesidades de salud de los niños refugiados no son las mismas que las de los niños desplazados internos, y pueden diferir entre entornos agudos, crónicos y posteriores a emergencias. |
| 20 | Williams R (2006) | Identificar los temas de la investigación sobre políticas, prácticas y gobierno corporativo y clínico después de los conflictos | Los impactos directos pueden resultar en el desarrollo de una gama de problemas psicológicos o psiquiátricos. Los diagnósticos incluyen: respuestas de estrés agudo y estrés crónico; trastornos psiquiátricos como conducta, ansiedad y trastornos fóbicos, depresión, abuso de sustancias y TEPT. | Los civiles comprenden el 80–90 % de todos los que mueren o son heridos en conflictos, en su mayoría niños y sus madres. Se necesitan enfoques de diagnóstico culturalmente sensibles para evaluar los síntomas del trauma y el deterioro asociado. |
| 21 | Williams R (2007) | Resumir la literatura sobre los impactos psicosociales en menores de edad | Un resumen de efectos psicológicos en niños enmarcados en la guerra incluye soledad, miseria, llanto y tristeza; ansiedad; depresión; dificultades para concentrarse, problemas de aprendizaje, entre otros. | El trauma psicológico del evento y sus secuelas pueden dar un golpe a la sensación de seguridad y personalidad, incluidas las fantasías organizativas centrales y las estructuras de significado. |
| 22 | Morris J, van Ommeren M, Belfer M, Saxena S, Saraceno B (2007) | Revisar evidencia para la intervención en aspectos mentales y sociales de la salud | Los niños expuestos a eventos catastróficos tienen un mayor riesgo de síntomas de depresión y ansiedad, y TEPT, problemas de comportamiento, disminución del funcionamiento cognitivo y otros signos no clínicos de angustia mental, física y social. | La escuela y otras actividades pueden ser intervenciones en sí mismas, sin necesidad de programas especializados, pues ayudan a reducir la humillación y el estigma, enriqueciendo socialmente las redes de apoyo y proporcionando un espacio seguro. |
| 23 | Betancourt TS, Khan KT (2008) | Evaluar la interacción entre el riesgo y los procesos de protección en la salud mental de los niños afectados por la guerra | Algunos mecanismos usados por los "niños resistentes" fueron: el sentido de agencia; inteligencia social, empatía y regulación del afecto; experiencia compartida, características de cuidado y comunidad y conexión; un sentido de futuro, esperanza y crecimiento; una conexión con la espiritualidad. | Se debe prestar especial atención a la capacidad de afrontamiento y la creación de significado en el nivel individual, el papel del apego, la salud del cuidador, los recursos y la conexión en la familia, y el apoyo social disponible en redes sociales pares y extendidas. |
| 24 | Neuner F, Catani C, Ruf M, Schauer E, Schauer M, Elbert T (2008) | Describir los fundamentos y el uso de la terapia de exposición narrativa en niños: KidNET (terapia de exposición narrativa) | Reducción clínicamente significativa en los síntomas de TEPT y una mayor efectividad que el asesoramiento de apoyo y la psicoeducación solamente. | KidNET reduce significativamente los síntomas de TEPT incluso en niños gravemente traumatizados por la guerra. También tiene efecto significativo sobre los síntomas de depresión y sobre la ideación suicida. |
| 25 | Lustig SL, Tennakoon L (2008) | Resumir la literatura sobre terapias de creación de historias, como la terapia narrativa y las terapias testimoniales | Los niños pequeños, al trabajar en las luchas típicas del desarrollo infantil, usan las historias para trabajar y reelaborar los conflictos psíquicos de manera regular, a menudo pidiendo una y otra vez la misma historia para dormir. | La psicoterapia testimonial, terapia de exposición narrativa, libros de cuentos y dibujos, son posibles en el contexto de los refugiados. La reducción de los síntomas se observó en algunos de los estudios. |

- | | | | | |
|----|---|--|---|---|
| 26 | Dekel R, Goldblatt H (2008) | Revisar la transmisión intergeneracional del TEPT de padres a hijos en familias de veteranos de guerra | Se ha encontrado que algunas características violentas derivadas del padre hacia los niños producto de algún síntoma de TEPT pueden afectar o tener consecuencias para el desarrollo de sintomatología en el niño. | Hay diferencias en el funcionamiento de la familia y la relación niño-padre si el padre desarrolló síntomas de TETP producto de la violencia o conflicto armado. |
| 27 | Qouta S, Punamäki R-L, El Sarraj E (2008) | Asociación entre la exposición a eventos traumáticos y salud mental de los niños, su desarrollo cognitivo y socioemocional | Se encontró un nivel inusualmente alto de TEPT entre los niños que experimentaron violencia y atrocidades en cuanto al impacto a largo plazo del estrés. | Los niños expuestos a traumas graves tienen problemas de concentración y baja capacidad cognitiva, por lo cual tienen dificultades para procesar nueva información y retener los viejos conocimientos. |
| 28 | Prasad AN, Prasad PL (2009) | Evaluar el impacto profundo y duradero en el funcionamiento emocional, cognitivo, conductual y fisiológico de un individuo | El trauma durante la infancia puede tener un efecto devastador sobre el desarrollo del cerebro y todas las funciones mediadas por este órgano complejo. | Los niños que viven en zonas de guerra pueden expresar angustia por varios eventos traumáticos a través de problemas emocionales tales como TEPT, trastornos disociativos, ansiedad y consumo de sustancias psicoactivas. |
| 29 | Jordans MJD, Tol WA, Komproe IH, De Jong JVTM (2009) | Evaluar intervenciones de bienestar psicosocial y salud mental de niños afectados por violencia en países de bajos y medianos ingresos | Los estudios de efectos están sesgados geográficamente y apuntan a los síntomas del TEPT. Consenso a favor de enfoques basados en la comunidad multinivel, adaptaciones culturales y evaluaciones | Los modelos de rehabilitación basados en la comunidad tienen un costo más bajo. Hay una brecha entre las necesidades de salud mental y la disponibilidad de intervenciones comprobadas. |
| 30 | Persson TJ, Rousseau C (2009) | Describir las intervenciones escolares específicas y generales para niños y adolescentes en países expuestos a la guerra | Los programas de acompañamiento psicológico en niños, niñas y adolescentes en los colegios reducen los síntomas de TEPT, mantienen la esperanza, reducen la depresión y los síntomas de intrusión. | Las intervenciones de salud mental en las escuelas pueden facilitar la detección y el tratamiento de niños refugiados cuya salud mental y discapacidad funcional requieren mayor atención. |
| 31 | Sullivan PM (2009) | Revisar investigaciones sobre los tipos de victimización por violencia abordados entre niños con discapacidades | La identificación del perpetrador de la violencia también tiene relevancia para los modos y objetivos de intervención de los efectos psicológicos y de salud mental de la victimización. | Las niñas, niños y jóvenes con algún tipo de discapacidad tienen un mayor riesgo de ser víctimas de algún tipo de violencia durante su infancia, años escolares o adolescencia. |
| 32 | Attanayake V, McKay R, Joffres M, Singh S, Burkle F, Mills E (2009) | Determinar la prevalencia de trastornos mentales en niños afectados por la guerra | La infancia es un período crítico del desarrollo cognitivo, emocional y físico. Es necesaria la creación de programas para la primera infancia que garanticen el bienestar emocional, psicológico y físico de los niños en situaciones de guerra. | Los programas deben brindar apoyo a los cuidadores y abordar las necesidades básicas de los niños: la seguridad alimentaria y la nutrición, y promover el apoyo social para un desarrollo adecuado. |
| 33 | Torrado M, Camargo M, Pineda N, Bejarano D (2009) | Señalar la importancia de los impactos diferenciales del conflicto armado en la primera infancia | Las experiencias de la niñez que afectan sus emociones, pensamientos, comportamientos y capacidad de aprendizaje están asociadas con la forma en que los niños, perciben, asumen, asimilan, comprenden y reconstruyen tales eventos. | El conflicto afecta la construcción de la identidad y subjetividad, así como las posibilidades de reconocerse como miembro de una sociedad, de la familia, y de percibir que se es titular de derechos. |
| 34 | Steel Z, Chey T, Silove D, Marnane C, Bryant RA, van Ommeren M (2009) | Evaluar el TEPT y depresión en el campo de la salud mental de refugiados y posconflicto | La tortura surgió como el factor sustantivo más fuerte asociado con el TEPT y la exposición acumulada fue el factor sustantivo más fuerte asociado con la depresión | Aunque muchas otras variables de salud mental son importantes, la revisión se centró solo en la depresión y el TEPT, porque estas son los índices de resultado que se han estudiado suficientemente. |
| 35 | Crowley C (2009) | Evaluar las necesidades de salud mental de los niños refugiados reasentados en los Estados Unidos | Los niños refugiados exhiben una enorme cantidad de resiliencia durante todas las fases de la migración. | Los niños refugiados son un grupo de alto funcionamiento, y su rendimiento escolar y nivel de rendimiento académico a menudo no se ven afectados. |
| 36 | Peltonen K, Punamäki RL (2010) | Evaluar la efectividad de las intervenciones psicosociales entre niños traumatizados en el contexto de conflictos armados | Se encontró disminución de los síntomas de TEPT, aumento de autoestima, actitudes positivas, aceptación de resolución no violenta, rendimiento cognitivo de los niños, problemas psicológicos, síntomas de trauma y apoyo social percibido. | El metaanálisis mostró que las intervenciones basadas en las "técnicas basadas en síntomas" y "ensayos corporales" surgieron como las intervenciones más efectivas para aliviar el TEPT |
| 37 | Hernández-Barrera A, Restrepo-Espinosa M (2011) | Describir la situación actual de las condiciones de salud mental en el TEPT de la primera infancia en condiciones de desplazamiento | La exposición directa y no directa a la guerra, la clase de eventos traumáticos y la presencia de factores especiales y culturales aumentan el riesgo de problemas emocionales y comportamentales en niños. | Las experiencias traumáticas en edad temprana están asociadas a un mayor riesgo y síntomas más graves de TEPT. |
| 38 | White CJ, De Burgh HT, Fear NT, Iversen AC (2011) | Evaluar lo que se sabe sobre el impacto en los niños del despliegue parental en Irak o Afganistán | Los hijos de militares en guerra tienen la presión mucho más alta que lo normal y esto podría relacionarse con ansiedad o estrés. El primer llamado de atención para el cambio de actitud son las expresiones de estrés en niños. | Las alteraciones a nivel psicológico se evidencian en mayor medida en adolescentes que en niños por su proceso de desarrollo y las relaciones con sus figuras paternas. |
| 39 | Bronstein I, Montgomery P (2011) | Sintetizar la investigación epidemiológica sobre la salud mental de los niños refugiados que residen en los países occidentales | La edad avanzada se asoció significativamente con niveles más altos de problemas de internalización y externalización y mayores niveles de TEPT. La muerte violenta de un familiar parece estar relacionada con puntuaciones más altas de TEPT. | Los niños refugiados experimentan altos niveles de angustia psicológica, depresión y problemas emocionales y conductuales. |
| 40 | Henley J, Robinson J (2011) | Resumir el conocimiento respecto a la salud mental de los niños y adolescentes refugiados | Los niños y adolescentes refugiados corren un mayor riesgo de desarrollar problemas de salud mental, incluido el estrés posttraumático y una variedad de dificultades emocionales, conductuales y educativas. | Los diversos contextos en los que los niños refugiados pueden entrar en contacto con los médicos de salud mental incluyen los servicios de salud escolar, servicios de protección infantil y hospitales. |

41	Yahav R (2011)	Revisar el impacto de la exposición directa e indirecta a la guerra y el terrorismo en la salud mental de los niños	Los niños pueden sufrir de trastorno por estrés postraumático (TEPT), así como otros tipos de psicopatología que no son específicos de la experiencia de trauma, como ansiedad y depresión generales.	La exposición directa e indirecta al conflicto pone al niño en riesgo de problemas de salud mental a corto y largo plazo. La duración y el alcance de la exposición determinan la intensidad de las respuestas de los niños.
42	Montgomery E (2011)	Revisar la evidencia de trauma y salud mental relacionada con el exilio en jóvenes refugiados de Medio Oriente	Los niños presentan principalmente ansiedad, el 67 % fue clasificado con ansiedad clínica, el 34 % estaba triste o deprimido, y 238 de los 311 niños (77 %) sufrían al menos una de estas condiciones.	El tipo de evento traumático o estresante puede ser un indicador de interrupción en los sistemas ecológicos mutuos, revelando que cualquiera de esos puede afectar sistemas adaptativos fundamentales.
43	Bohleber W (2012)	Evaluar los efectos del estrés traumático en el niño en desarrollo, discutir el papel de la memoria y el recuerdo al aceptar el pasado	La realidad traumática abruma la defensa del ego y sus recursos adaptativos, trayendo siempre una sensación de impotencia, ansiedad automática y una regresión a las funciones primitivas del ego.	Las funciones integradoras de la memoria se cierran y surge un estado disociado del yo, combinado con una despersonalización y una "desrealización".
44	Werner EE (2012)	Revisar y reflexionar sobre estudios que han explorado los efectos de la guerra en los niños de todo el mundo	En relación con los efectos de los escenarios de conflicto se identifican síntomas de trastorno de estrés postraumático (TEPT), depresión y trastornos de ansiedad, y discapacidad cognitiva.	Cuanto más reciente es la exposición a la guerra, y cuanto mayor es el niño, mayor es la probabilidad de presentar síntomas de trastorno de estrés postraumático.
45	Masten AS, Narayan AJ (2012)	Analizar los modelos plausibles para la inclusión biológica del estrés extremo	Las habilidades cognitivas (inteligencia general y flexibilidad cognitiva) y las habilidades de autorregulación están ampliamente implicadas como factores protectores para los niños en una variedad de circunstancias peligrosas.	La inclusión biológica del estrés extremo en el desarrollo humano provee explicaciones cada vez más plausibles de procesos mediadores que explican sus efectos en la salud y el bienestar.
46	Drury J, Williams R. (2012)	Evaluar aspectos psicosociales de respuestas de niños y jóvenes a su exposición a la guerra, la violencia colectiva y el terrorismo	Diferentes tipos de alteraciones psicosociales como acercamiento a la muerte, soñar con la muerte de otros, etc. Se ha evidenciado que la separación de padres o de su cultura influye en la aparición de alteraciones mentales.	El daño en la salud mental de los niños está relacionado directamente con la pérdida de soporte parental.
47	Dimitry L (2012)	Revisar la salud mental de los niños y adolescentes que viven en áreas de conflicto armado en el Medio Oriente	En Israel la prevalencia del síndrome de estrés postraumático fue de 5-8 %, el 25-35 % reportó depresión leve, el 3,3 %, depresión mayor, el 3 %, déficit de atención e hiperactividad, el 2,5 %, fobias específicas, el 1,8 %, desorden desafiante, el 1,4 %, ansiedad y el 1,2 %, desorden compulsivo-obsesivo.	Entre los factores de riesgo hay asociaciones positivas de los síntomas de síndrome de estrés postraumático, depresión, ansiedad, problemas de conducta, de atención y emocionales con las exposiciones a acciones violentas.
48	Reed R V, Fazel M, Jones L, Panter-Brick C, Stein A (2012)	Evaluar factores de protección y riesgo para la salud mental de niños y adolescentes	Los niños desplazados pueden tener más problemas psicológicos que sus pares no reubicados, a pesar de cierta exposición a conflictos compartidos.	Los problemas de salud mental no son el resultado de una sola causa, sino de cadenas causales complejas. Comprender cómo interactúan los diferentes factores requiere una atención cuidadosa.
49	Fazel M, Reed R V, Panter-Brick C, Stein A (2012)	Sintetizar la evidencia de factores de riesgo y protección para la salud mental en niños y adolescentes que son desplazados por la fuerza	La experiencia de eventos adversos se asocia con una mayor probabilidad de trastornos psicológicos, el grado de TEPT se asoció con experiencias personales de eventos traumáticos, especialmente aquellos que ocurren cuando se está lejos de casa.	La exposición a la violencia fue fuertemente predictiva de trastornos psicológicos. Las adversidades acumulativas empeoran los resultados de salud, con mayores efectos que cualquier factor solo.
50	Betancourt TS, Meyers-Ohki SE, Charrow AP, Tol WA (2013)	Describir intervenciones psicosociales y de salud mental para abordar las necesidades de salud mental de los niños afectados por conflictos	Entre los niños y jóvenes expuestos a conflictos, los resultados adversos de salud mental provocados por la exposición a eventos horribles se ven agravados por el daño relacionado con la guerra a los sistemas de apoyo extendidos (familiares, sociales, económicos, políticos).	En las estrategias interdisciplinarias deben seleccionarse los sectores de salud, negocios y administración para guiar los futuros análisis de políticas y la evaluación de su implementación en la salud mental global.
51	Forman-Hoffman VL, Zolotor AJ, McKeeman JL, Blanco R, Knauer SR, Lloyd SW, et al. (2013)	Evaluar la efectividad de las intervenciones dirigidas al estrés traumático entre los niños expuestos a eventos traumáticos	Algunas intervenciones de psicoterapia dirigidas a niños expuestos a eventos traumáticos parecen prometedoras en función de la magnitud y precisión de los efectos.	Estas intervenciones fueron tratamientos escolares con elementos de terapia cognitivo-conductual.
52	Betancourt T S, McBain R, Newnham EA, Brennan RT (2013)	Investigar factores de riesgo y protección asociados con el cambio de síntomas de TEPT entre los niños exsoldados en Sierra Leona	Síntomas relacionados con el trastorno por estrés postraumático (TEPT), trastorno de depresión, trastorno de ansiedad, y discapacidad funcional	La aceptación familiar, el apoyo social y las oportunidades educativas y económicas se asociaron con un mejor ajuste psicosocial.
53	Rousseau C, Jamil U, Bhui K, Boudjarane M (2013)	Evaluar el efecto del 11/09 y la guerra contra el terrorismo en niños y jóvenes mayoritarios y minoritarios en USA	Las consecuencias en preescolares y niños dependen de las reacciones familiares y la habilidad emocional del cuidador principal para afrontar lo sucedido	La familia tiene un rol protector en la modulación y los efectos del terrorismo en la reacción de los niños y un papel importante en las asociaciones y consecuencias del evento.
54	Tol WA, Song S, Jordans MJD (2013)	Evaluar la resiliencia y la salud mental en niños y adolescentes víctimas de conflictos en países de bajos y medianos ingresos	Los conflictos armados afectan seriamente los determinantes sociales de la salud mental y el bienestar, incluyendo redes de cuidado familiar y comunitario, atención a necesidades básicas y educación; moralidad y espiritualidad.	El estudio de la resiliencia en niños afectados por conflictos armados puede proporcionar información crucial para el desarrollo de la salud mental y las intervenciones psicosociales.
55	Shaar KH (2013)	Evaluar prevalencia del TEPT en la población adolescente del Líbano	El TEPT en adolescentes ha sido implicado en problemas en el desarrollo, problemas mentales y escolares, abuso de drogas y alcohol, comportamiento antisocial, entre otros.	Adolescentes con TEPT mostraron mayor deterioro escolar, además de niveles más bajos de "autoeficacia".

56	Pacione L, Measham T, Rousseau C (2013)	Describir la salud mental de los niños refugiados que han huido de la guerra	Los problemas de externalización, incluidos los comportamientos de oposición, agresivos, impulsivos, hiperactivos y antisociales, se informan en niños refugiados.	Los factores posteriores a la migración en los países de altos ingresos y las experiencias escolares positivas confieren un efecto protector, mientras que la discriminación percibida y la exposición a la violencia elevan el riesgo.
57	Agazio J, Goodman P, Padden DL (2014)	Analizar el impacto de los despliegues de apoyo en miembros de la familia del servicio activo y el personal de reserva/guardia	Los niños tienden a reaccionar con más irritabilidad y son poco comunicativos; también se han identificado alteraciones de sueño, alimentación y periodos de sensibilidad. Los adolescentes toman aún más responsabilidades del hogar resultando en una mayor interrupción de sus rutinas normales.	Los niños escolares pueden tener más problemas en el desarrollo educativo o dificultades de aprendizaje producto de las separaciones con la figura parental, el contexto de guerra, las relaciones de responsabilidad que asume y la influencia de los padres.
58	Fu C, Underwood C (2015)	Revisar los programas de intervención dirigidos a niños y adolescentes expuestos a desastres o conflictos	La mala salud mental en la infancia se asocia con una mayor prevalencia de mala salud física, conductas de riesgo y lesiones no intencionales, suicidio y menor calidad de vida.	Las evaluaciones de las intervenciones de salud mental y apoyo psicosocial dirigidas a niños y adolescentes son relativamente limitadas.
59	Foster H, Brooks-Gunn J (2015)	Revisar las consecuencias para la salud mental de la exposición de los niños a la violencia comunitaria y de guerra	El estigma en la comunidad y la seguridad percibida transmiten efectos a los niños y la exposición a la violencia de guerra afecta su salud. Los recursos de protección incluyen la aceptación de la familia y la comunidad, el apoyo escolar y la participación en programas extracurriculares.	El proceso de estrés comienza fundamentalmente con las condiciones sociales y se articula con factores mediadores y moderadores para discernir cómo la violencia afecta la salud mental.
60	Rosshandler Y, Hall BJ, Canetti D (2016)	Examinar los factores de riesgo psicosocial para el TEPT organizado en un marco ecológico	La exposición crónica a la violencia política puede interrumpir el desarrollo normativo y conducir a consecuencias neurocognitivas, psicosociales y psiquiátricas duraderas, por lo que la exposición es perjudicial para los adolescentes.	La violencia política que tuvo lugar durante este período tuvo profundos efectos psicológicos en los adolescentes, con consecuencias negativas a nivel comunitario, individual y micro y macroecológico.
61	Miller KE, Jordans MJD (2016)	Establecer las razones para la priorización de intervenciones centradas en el niño en comunidades de conflicto	La exclusión social de niños excombatientes y jóvenes sobrevivientes de violencia sexual aumenta, y las oportunidades de juego y amistad disminuyen a medida que las familias son desplazadas y los espacios seguros desaparecen.	Las intervenciones grupales basadas en la escuela tienen potencial para aumentar el apoyo de los compañeros y reducir el aislamiento social entre los niños.
62	Slone M, Mann S (2016)	Examinar los efectos de la exposición a la guerra y el conflicto en niños pequeños	Se evidenció alta prevalencia de stress postraumático en niños expuestos en el conflicto palestino-israelí. Se reporta el incremento de la ansiedad en niños reflejados en actitudes como nerviosismo, reacciones fuertes y miedos inexplicables.	Se evidenció que el funcionamiento de la familia y de los padres es un factor promotor de la estabilidad del niño, pues reduce la presentación de síntomas relacionados con el conflicto o la guerra.
63	Jordans MJD, Pigott H, Tol WA (2016)	Proporcionar una actualización integral en las intervenciones para niños afectados por conflictos armados	La intervención implementada por la comunidad utilizando la terapia de exposición narrativa demostró resultados positivos en niños excombatiente, incluso después de un período de seguimiento de 1 año.	Invitar a líderes de la comunidad a que ayuden a diseñar programas para darles voz en el diseño de las intervenciones que coincidan con las necesidades de las comunidades.
64	Sleijpen M, Boeije HR, Kleber RJ, Mooren T (2016)	Revisar estudios sobre las formas en que los jóvenes refugiados enfrentan la adversidad para abordar sus fuentes de resiliencia	Las fuentes de resiliencia ayudaron a lidiar con recuerdos traumáticos y a hacer frente a sus vidas turbulentas: apoyo social, estrategias de aculturación, educación, religión, evitación y esperanza.	Es necesario enfatizar en la importancia de considerar el contexto social, político y cultural más amplio en el que está incrustada la vida de los jóvenes refugiados, con el fin de no enfatizar excesivamente el TEPT en jóvenes refugiados.
65	Hassan G, Ventevogel P, Jefe-Bahloul H, Barkil-Oteo A, Kirmayer LJ (2016)	Proporcionar información sobre aspectos culturales de la salud mental y el bienestar psicosocial relevantes para la atención y el apoyo a los sirios afectados por la crisis	Los estudios de niños refugiados sirios han documentado una amplia gama de problemas psicosociales que incluyen: temores y ansiedad persistente, dificultades para dormir, tristeza, dolor y depresión, agresión o rabietas, nerviosismo, hiperactividad y tensión, problemas del habla o mutismo, entre otros.	Las intervenciones psicosociales deben estar enmarcadas en una atención mental y en la posibilidad de proveer diferentes oportunidades educativas, laborales, ocupacionales y estar enmarcadas en centros comunitarios, puntos de reunión popular, centros deportivos, culturales, entre otros.
66	Neal S, Stone N, Ingham R (2016)	Describir los resultados de salud sexual y reproductiva entre mujeres jóvenes afectadas por la exposición a conflictos armados	Ante el conflicto armado en Uganda hubo un cambio completo en los valores culturales, incremento de las relaciones sexuales y el matrimonio transaccional, la violencia y los comportamientos sexuales de alto riesgo, y múltiples parejas.	El aumento del matrimonio precoz en Siria parece haber ocurrido como una convergencia de preocupaciones sobre el honor y la seguridad de las mujeres solteras en tiempos de agitación y violencia.
67	Saltzman LY, Solomyak L, Pat-Horenczyk R (2017)	Revisar la literatura reciente sobre las necesidades de salud mental de los jóvenes en el contexto de la guerra y el terrorismo	Existen varios enfoques para tratar a las personas y familias expuestas a eventos potencialmente traumáticos: (1) terapia cognitiva conductual, (2) desensibilización y reprocesamiento del movimiento ocular, (3) terapia dialéctica comportamental, (4) terapias alternativas.	Se deben implementar programas a partir del uso del internet como medio de intervenir a jóvenes de todas partes, usando una variedad de plataformas multimedia.
68	Stough LM, Ducey EM, Kang D (2017)	Revisar la literatura sobre factores psicosociales relacionados con los niños con discapacidades en el contexto de desastres o terrorismo	Las personas con discapacidad intelectual también tienen un mayor riesgo de TEPT debido a la exposición previa a traumas de varios tipos.	Los niños con discapacidades experimentan una exposición amplificada a los conflictos debido al aumento de las vulnerabilidades psicológicas, físicas y educativas.

69	Anagnostopoulos DC, Giannakopoulos G, Christodoulou NG (2017)	Discutir los contextos que configuran las crisis económica y migratoria y sugerir posibles efectos de esta intersección sobre los riesgos para la salud mental	Consecuencias perjudiciales de estas crisis en el bienestar psicológico, la depresión, los trastornos de ansiedad, el insomnio, el abuso del alcohol y el comportamiento suicida. Los defectos sociales externos interactúan con déficits individuales internos y comportamientos de actuación.	Se encontraron condiciones de trabajo precarias, desigualdades, inseguridad, falta de conexión social, pérdida de apoyo social, e inestabilidad de la vivienda.
70	Brown FL, de Graaff AM, Annan J, Betancourt TS (2017)	Evaluar intervenciones psicosociales para niños y jóvenes afectados por conflictos que viven en países de bajos y medianos ingresos.	Se identificaron elementos comunes en intervenciones efectivas para niños afectados por conflictos: promoción del acceso, psicoeducación, construcción de ideas, técnicas de construcción de una buena relación, estrategias cognitivas, uso de narrativas, técnicas de exposición y prevención de recaídas.	Existen varias consideraciones únicas al desarrollar intervenciones para niños en entornos afectados por conflictos, donde la disponibilidad de especialistas para la implementación, capacitación y supervisión es extremadamente limitada.
71	Kadir A, Shenoda S, Goldhagen J (2018)	Revisar evidencia sobre los efectos del conflicto armado en los niños apoyados en la Declaración de política sobre conflictos armados	Los niños afectados por la guerra tienen una mayor prevalencia de TEPT, depresión, ansiedad y quejas conductuales y psicosomáticas. Los que se asociaron con grupos armados experimentan riesgos particulares de salud física y del desarrollo mental; barreras en el acceso a los servicios de salud y obstáculos importantes para la reintegración social.	El conflicto armado es un determinante social descuidado de la salud infantil, y los efectos agudos y crónicos del conflicto armado en la salud infantil y el bienestar se encuentran entre las mayores violaciones de los derechos del niño en el siglo 21.
72	Fajardo-Mayo MA, Ramírez-Lozano MP, Suescún V, Isabel M, Ospina-Alvarado MC (2018)	Revisar estudios sobre estado del arte del conocimiento producido en Colombia entre 2002 y 2012 sobre la identidad y subjetividad de niños y niñas en torno a la paz y la democracia en contextos de conflicto armado	Existe afectación en la salud mental de niños y niñas que han sufrido desplazamiento forzado o reclutamiento que les dificulta o impide su adaptación a nuevos entornos socioculturales o a la vida civil. Los niños y las niñas, a pesar de haber vivido de manera directa o indirecta el contexto de conflicto armado, tienen en sí mismos y en sus relaciones, potencias y recursos que aportan a la construcción de subjetividades alternativas a la violencia y a la victimización.	Se considera a los niños y niñas con capacidades diversas de acción, orientadas por sus propias capacidades de sentir, expresar, crear y actuar, en diálogo con lo que sucede en sus relaciones en diferentes contextos como la vida en la escuela, en la familia y en la comunidad.

TEPT: trastorno de estrés postraumático

En el periodo previo a la consolidación del conflicto, se reportaron con mayor frecuencia reacciones somáticas, como cefalea (25-29) y dolor físico y emocional (26,27,30,31). Asimismo, se mencionaron fenómenos relacionados con la desintegración familiar progresiva (32) y el estrés previo a la migración, con un incremento de los síntomas de dolor y desesperanza ante la necesidad de salir de los territorios, el miedo de ser atacados y enfrentarse a lo desconocido (30,33,34), reacciones que se veían intensificadas en el inicio del conflicto (35).

Durante el conflicto propiamente dicho, se describen reacciones agudas y crónicas en función de su duración. Entre las agudas, predominaron los problemas en la relación con los padres y la disminución de las actividades sociales (27,36,37). Otras reacciones agudas señaladas fueron miedo, terror o nerviosismo (38-42), retroceso en habilidades adquiridas (enuresis) e hiperactividad o déficit de atención (23,42-44), así como tristeza, ira, vergüenza y culpa (41-43,45-47). En cuanto a las consecuencias que se extienden en el tiempo, diferentes investigaciones reportan conductas agresivas (40-42,48-50) que, conjuntamente con la hostilidad y otras formas de violencia, tienden a incrementarse (51,52). Incluso con supervisión de los padres, la conducta agresiva permanece años después de finalizado el conflicto (8,33,42).

Los síntomas del espectro de la depresión se superponen con las manifestaciones del espectro de ansiedad y alteraciones de la conducta. Se describen reacciones emocionales de irritabilidad y llanto, pensamientos de miseria y soledad, así como conductas oposicionistas y antisociales (23,53-58). En diversos estudios, la tendencia a presentar síntomas depresivos fue mayor en quienes experimentaron la separación forzada de sus padres (33,58).

En cuanto al espectro de ansiedad, los síntomas eran inespecíficos y algunos de ellos se interrelacionaban con los propios del estrés

postraumático, siendo frecuentes los temores de separación, alteraciones de sueño, quejas somáticas e hipersensibilidad (56,57,59-63). En el estudio de Montgomery, *et al.*, los niños refugiados de Oriente Medio durante 1991 y 1992 mostraban diversos síntomas psicológicos (64): el 67 % fueron clasificados con ansiedad clínica y el 34% con depresión; en tanto que 238 de los 311 niños bajo tratamiento (el 77 %) sufrieron por lo menos una de estas condiciones (64).

Los síntomas del espectro postraumático (TEPT) se describen desde temprana edad. En niños entre los 2 y los 7 años, se mencionan temores secundarios a la separación familiar, reacción exagerada al ruido, estados nerviosos, agresividad y agitación, llanto excesivo, pesadillas o activación ansiosa (17). En la niñez media y la adolescencia, otros estudios reportaron conductas de evitación, pérdida del apetito y de energía, y sentimientos de culpa (65-71). Berman, *et al.*, encontraron una correlación entre los síntomas, el número y tipo de exposiciones traumáticas (33). Además, varios autores coincidieron en que el estrés postraumático se relacionaba estrechamente con la alteración del proceso cognitivo-emocional de la experiencia dolorosa y la poca capacidad para asimilar el trauma (33,69,72,73).

Por otra parte, los estudios evidenciaron que las particularidades de cada conflicto y la exposición específica de los niños o los adolescentes a ciertos actos de guerra determinaban la mayor o menor emergencia de síntomas enmarcados en el espectro de síndromes o trastornos mentales. Así, en el conflicto palestino-israelí, la prevalencia de estrés postraumático en niños y adolescentes varió entre 23 y 70 %, la ansiedad, entre 40 y 100 %, y la depresión aquejaba al 11,3 % de esta población en Palestina. En Israel, la prevalencia de estrés postraumático fue de 5 a 8 %, la de depresión leve, de 25 a 35 %, y la de depresión mayor, de 3,3 % (17). En otros estudios relacionados la segunda *intifada* o levantamiento de la mezquita Al-Aqsa, en Israel y Palestina, durante y después del conflicto como tal, se reportó una prevalencia de TEPT de 58 a 65 % (42). Por otro lado, entre los niños refugiados en países europeos provenientes de Somalia, Sudán, Etiopía, Kosovo, Bosnia y Albania, la prevalencia osciló entre 19 y 54 % (55). En otro estudio de niños y adolescentes refugiados en Suecia procedentes de Israel, el 19 % presentaba algún tipo de síntoma o afectación postraumática (16).

En cuanto al curso clínico, los estudios consultados evidenciaron variaciones en la psicopatología a lo largo del tiempo. Algunos indicaron una aparición tardía de los síntomas de estrés postraumático y, una disminución, cuando las situaciones contextuales cambiaron, con un margen de tiempo indeterminado (35,42,58,71). Según Barenbaum, *et al.*, los síntomas diferían según la duración, la exposición o el recrudescimiento del conflicto. Es así como solo el 22 % de los infantes israelíes presentó algún síntoma posterior a un ataque con misiles, en tanto que, en el conflicto con Kuwait después de cinco meses de conflicto, el 70 % de los niños y niñas todavía manifestaba estos síntomas (74). Otros datos adicionales sobre conflictos armados en diferentes contextos geopolíticos ilustran las variaciones en el inicio y la duración de los síntomas postraumáticos y afectivos.

Después de la *intifada* de Al-Aqsa en Israel y Palestina en el 2000, se reportó el TEPT como un efecto a largo plazo, especialmente en adolescentes, que disminuyó solo con el tiempo (42). Por otra parte, el tiempo de disminución de los síntomas en el primer ataque terrorista al *World Trade Center* en el 2009 fue de 9 meses (45); en el segundo ataque del 2011, disminuyeron 6 meses después, el 10,5 % de los infantes desarrollaron estrés postraumático y menos

del 25 %, alguna alteración mental (45,60). En el 2010, una vez finalizó el conflicto armado en Gulu, norte de Uganda, 205 adolescentes presentaron diferentes tipos de alteraciones cognitivas: pensamiento recurrente de acercamiento a la muerte, soñar con la muerte de otros, inseguridad frente a los ataques y represalias, entre otros. El 57 % de ellos reportaba síntomas incluso cuatro años después de finalizado el conflicto (58). Entre los infantes refugiados, se reportaron tasas de ansiedad del 35 al 87 % cuando ya habían sido alejados del conflicto (73). Se observó que la prevalencia de síntomas aumentaba si las experiencias se relacionaban con hechos de violencia contra sus padres o familias (58,75).

Por último, en el posconflicto inmediato, se ha podido establecer que el sufrimiento producto de la guerra no se detiene al trasladarse a un sitio más favorable (65) y que, además, hay una probable transmisión de padres a hijos (25,48,65,76,77). En ese sentido, en el estudio de van Ijzendoorn, *et al.*, en los descendientes infantes y adolescentes de personas que participaron en la II Guerra Mundial, se encontró una menor adaptación al trauma, y psicopatologías producto de las relaciones con los padres y con factores histórico-contextuales (48). La persistencia de los efectos negativos se observa asimismo en un estudio en África en el cual se evidenció que, una vez cesaron los conflictos, los excombatientes, especialmente adolescentes, eran más proclives a experiencias extremas de hostilidad y ansiedad, y mostraban un deterioro progresivo de la resiliencia (58).

En consonancia con las variaciones en el curso clínico, en diferentes estudios consultados se detectaron procesos de afrontamiento, como resolución de problemas, descarga emocional y búsqueda de apoyo social, relacionados con la disminución de la sintomatología y la resiliencia, definida esta como el mecanismo para amortiguar los efectos del trauma mediante el sentido de agencia, el ajuste emocional, la inteligencia social y la empatía (35,49,59,78,79). Los factores protectores sumados a la resiliencia, como la disposición individual y de la familia (apoyo y acompañamiento) y el soporte social (pares, escuela y comunidad), facilitaron a los infantes y adolescentes sobreponerse rápidamente (35,49).

En el posconflicto también se ha observado que, conforme pasa el tiempo, la población tiende a experimentar estrés por los prejuicios sociales derivados del conflicto armado (76). En algunos estudios esto se correlacionó con adversidades adicionales producto de un ambiente inadecuado y propiciador de otros eventos traumáticos con la consecuente disminución de la capacidad para mitigarlos (65,76). Davis, *et al.*, mencionan que los niños inmersos en un ambiente protector, especialmente quienes logran reestablecer lazos afectivos con algún miembro de su familia, tienen mejores resultados en el tratamiento de las consecuencias mentales y sociales (69).

Consecuencias psicosociales

Entre las consecuencias psicosociales, las dificultades en la construcción de la identidad y subjetividad fueron las más relevantes en los estudios revisados, por su papel en el proceso de identificación como miembro de una sociedad y el cumplimiento de una serie de normas sociales (39,49,56).

En diversos estudios se evidenció una mayor vulnerabilidad en niños y adolescentes con exposición a la explotación sexual y el consumo de sustancias psicoactivas (11,38,49,78,80). Esta vulnerabilidad se asoció con la tendencia a asumir roles adultos prematuros de tipo laboral, administración

del dinero y adopción de decisiones (26,32,56,75,81). Dichas actividades se asociaron con particularidades del desarrollo de la moralidad en niños de 6 a 11 años, específicamente con la posibilidad de tomar decisiones que justifiquen o no el conflicto armado (9,21,74). Además, se plantea que una moralidad favorable a los conflictos armados entraña el peligro real de que estas personas conformen o se unan a pandillas o grupos delincuenciales, con el fin de justificar comportamientos violentos (49,77).

Otros resultados psicosociales relevantes son los asociados con la educación y los procesos cognitivos. En el aspecto educativo, se encontraron problemáticas en el rendimiento escolar y dificultades de aprendizaje (47,51,60,61,80). Entre las consecuencias graves de tipo cognitivo, se resaltan las relacionadas con la malnutrición (38,44,47,49,61,82), y el compromiso de las funciones cognitivas básicas (memoria, atención y concentración, sensación y percepción) y las superiores (pensamiento, conciencia y razonamiento) (42,60,61,80,82).

Por último, se encontró que el entorno social y familiar tuvo un efecto mediador en el proceso de afrontamiento de las experiencias traumáticas en los infantes, en su capacidad de sobreponerse a ellas y en algunos resultados psicosociales (31-33,57,60,68,83). También, se señalaron adversidades como la pobreza, la separación familiar y las actitudes de racismo, las cuales favorecieron la permanencia de la sintomatología (33,40,52). Por otro lado, los problemas relativos al apoyo y la estructura social parecen influir en el aumento de los intentos de suicidio, los comportamientos perturbadores y los episodios disociativos en adolescentes (31,40). Anagnostopoulos, *et al.*, señalaron que el desarrollo personal y social se veía afectado por la exposición a los conflictos armados y a inseguridades internas que obstaculizan la conexión social (40). Por último, Neal, *et al.*, registraron un aumento de los matrimonios precoces producto del conflicto armado, así como de prácticas culturales en respuesta al colapso de la cohesión comunitaria (62).

Discusión

Esta revisión proporciona una síntesis de la evidencia en torno a las consecuencias de los conflictos armados en la salud mental de la población infantil y adolescente a lo largo de sus distintos momentos, así como de procesos y contextos mediadores de los efectos negativos y mecanismos de resiliencia que revisten importancia en el campo de las intervenciones individuales y colectivas en este tipo de población.

Los estudios incluidos en esta revisión coinciden en que las consecuencias en la salud mental se derivan de la interacción de un conjunto de variables y afectaciones que pueden enmarcarse en un síndrome o trastorno específico según las alteraciones afectivas, cognitivas o conductuales predominantes en un momento dado.

Cabe resaltar que predominó la descripción de consecuencias negativas del espectro de la depresión, la ansiedad y los trastornos postraumáticos a lo largo de los distintos momentos del periodo previo al conflicto, el conflicto como tal y el posconflicto, independientemente de que los estudios consultados se llevaron a cabo en contextos y temporalidades tan disímiles como los conflictos armados vividos en Oriente Medio durante la década de 1990 (69), el conflicto palestino-israelí (16), los conflictos de Somalia, Sudán, Etiopía, Kosovo, Bosnia y Albania (55), el conflicto de Kuwait (74), la Segunda

Guerra Mundial (84), o el de Sierra Leona (85), entre otros, pues a pesar de las particularidades de cada conflicto y la exposición específica de los niños o adolescentes a ciertos actos de guerra, son determinantes de la mayor o menor incidencia de cierto tipo de sintomatologías.

Hoy se sabe que la intensidad, la brusquedad y la duración de los conflictos armados están asociadas con la aparición de la psicopatología (14,25,46). Estos hallazgos son consistentes con revisiones previas que han señalado la relación entre una exposición mayor a eventos traumáticos durante las etapas tempranas del ciclo vital y la presencia de síntomas más graves, especialmente de tipo afectivo (86,87).

La superposición de espectros sintomáticos de condiciones de salud mental evidenciada en esta revisión, concuerda con la amplitud y la diversidad de los problemas de salud mental en infantes y adolescentes dadas las particularidades evolutivas de esta población, las cuales pueden abordarse a partir de su manifestación externa (oposicionismo, agresividad, hiperactividad, consumo de sustancias psicoactivas, comportamiento delictivo) o interna (ausencia de motivación, tristeza, ideación suicida, desesperanza, temores) (87).

En cuanto al momento temporal del conflicto, las primeras afectaciones se relacionan principalmente con la salud física, tanto por las limitaciones funcionales que resultan de la incapacidad de cuidarse por sí mismos (87), como por la somatización de la ansiedad asociada con la percepción de amenaza y la exposición a escenarios de violencia (88), en tanto que las consecuencias a largo plazo, una vez finalizado el conflicto, se relacionan más con depresión, dificultades de regulación emocional y problemas de conducta (23,87). Los síntomas agudos del espectro postraumático y de ansiedad descritos en los estudios revisados, se relacionaron con alteraciones en la reactividad al estrés mediadas por reacciones hormonales del eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal, evaluadas mediante la medición del cortisol basal y otras hormonas (89). Estas alteraciones, documentadas en una cohorte de infantes expuestos a experiencias de guerra y en adultos separados de sus padres en la infancia durante la Segunda Guerra Mundial, podrían explicar la asociación entre el desarrollo de problemas afectivos y las experiencias de separación forzada de los padres que se reporta en los estudios incluidos en la presente revisión (90,91).

Ante la heterogeneidad de problemas de salud mental y biopsicosocial encontrada, vale la pena profundizar en otros factores potencialmente causales, como el grado de participación y el tipo de victimización en el conflicto armado, así como la pérdida de la estabilidad de la red comunitaria (46). En este sentido, en la presente revisión se evidencian las complejidades de infantes y adolescentes refugiados, un grupo con mayor riesgo de afectación debido a los extremos de estrés a los cuales se enfrentan en todos los momentos de un conflicto armado (41,75), así como la necesidad de abandonar el país de origen, desplazarse a otro y tener que adaptarse en él (30,34,75).

En cuanto a los niños y adolescentes combatientes, se destacan las condiciones de explotación y adoctrinamiento basadas en dimensiones económicas, sociales y políticas (23,49,58,74). Las situaciones de violencia sexual y otras consecuencias negativas en salud sexual y reproductiva, se documentan en los estudios sobre conflictos armados en algunas regiones geográficas, los cuales señalan cómo las afectaciones en la salud mental de los cuidadores aumentan el riesgo de este tipo de victimización que, como es

sabido, también incrementa el riesgo de desarrollar psicopatologías a corto y largo plazo (89), sin contar con las consecuencias de estas experiencias en el desarrollo psicosocial, moral y en la construcción de identidad (27,29,49).

En Colombia, un estudio del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar (ICBF) sobre el estado psicosocial de niños y adolescentes afectados por diferentes hechos de violencia en el marco del conflicto armado, guarda relación con los hallazgos de la presente revisión, ya que, entre los niños desmovilizados o excombatientes, se encontró una afectación significativa en la autoestima y el bienestar subjetivo acompañada por la incapacidad de sentir alegría y felicidad, la aparición de conductas agresivas y un comportamiento transgresor de la normatividad, en tanto que en los desplazados, es decir, quienes han sido obligados a dejar su hogar y su red de apoyo debido a los enfrentamientos armados, se encontraron problemas sociales, preocupaciones por la muerte y dificultad en el manejo de las emociones (88).

Una limitación de este estudio fue la amplitud y la cantidad de la información revisada. Sin embargo, constituye un aporte relevante y actualizado que ilustra la necesidad de sintetizar los resultados obtenidos en diferentes estudios a lo largo del tiempo. Otra limitación es que la mayoría de las revisiones incluidas eran de tipo narrativo, lo que resta validez a los hallazgos. Los estudios primarios de las revisiones sistemáticas fueron, en un porcentaje importante, series de casos o estudios de corte transversal, diseños que no permiten establecer una relación de causalidad entre las experiencias de trauma directo debidas a los conflictos armados, y el desarrollo de las alteraciones psicológicas y los trastornos psiquiátricos detectados, ya que no se puede establecer la presencia de factores de riesgo previos a la exposición al conflicto armado, como malnutrición y otras complicaciones perinatales que inciden en el desarrollo cerebral. En muchos países, una proporción importante de los niños y adolescentes que se vinculan a los grupos armados en un conflicto han vivido previamente en condiciones de precariedad relacionadas con complicaciones en la salud perinatal, o han experimentado situaciones traumáticas en sus hogares (89). En el estudio del ICBF realizado en Colombia, se reportaron factores previos al hecho de que los victimiza, como violencia intrafamiliar, maltrato infantil, abuso sexual, desigualdad, inequidad, discriminación y exclusión social (88).

Es importante señalar la variedad de escalas y criterios diagnósticos empleados en la literatura revisada (25,45,46,50). Si bien el objetivo del presente estudio no consistía en evaluar los instrumentos y criterios diagnósticos, Jensen, *et al.*, mencionan la necesidad de contemplar la naturaleza de los factores estresantes, daños reales y particularidades de los contextos culturales y geopolíticos para poder llegar a un diagnóstico válido (50). Asimismo, Elbedour, *et al.*, describen la cultura como el macrosistema influyente en las respuestas individuales (25). Todos estos criterios y evaluaciones son muy diferentes unos de otros, lo cual aumenta la heterogeneidad de los resultados y dificulta su reproducibilidad (15,92).

Pese a lo anterior, se evidencia un avance en los estudios en cuanto a la evaluación de problemas de salud mental diferentes al trastorno de estrés postraumático (15), lo que se articula con el enfoque de otras revisiones de la literatura sobre infantes y adolescentes víctimas de conflictos armados (23,87,93). Sin embargo, llama la atención la escasez de estudios enfocados en otros trastornos mentales, como los del espectro psicótico (15,31).

En cuanto al curso clínico, la información es diversa (8,15,75). La duración de los síntomas es controversial, ya que depende de las oportunidades en el medio, la cultura y otros factores contextuales (74). En conclusión, existe una limitación para la generalización de los resultados debida a los aspectos geopolíticos de las poblaciones estudiadas. Por ejemplo, en el caso de la población de refugiados, los estudios se referían en su mayoría al conflicto armado en Oriente Medio (34,56,73).

Los resultados de los estudios en población infantil se relacionan estrechamente con las investigaciones sobre los efectos en la salud mental de los adultos, tanto de quienes fueron víctimas de conflictos en su vida adulta, como de quienes lo fueron durante su niñez y adolescencia, y cuyo malestar se mantiene. En este sentido, algunas revisiones del tema evidencian que los adultos expuestos a contextos de guerra durante etapas tempranas de su vida son más propensos a resolver disputas familiares con violencia, y son más proclives al abuso y la negligencia infantil (94). Asimismo, se observó una correlación entre el estado de salud mental de los adultos y el de niños y adolescentes, es decir, el entorno familiar y la respuesta de los padres a las situaciones traumáticas influyen de manera significativa en las estrategias de afrontamiento de sus hijos y, en general, en su bienestar (16).

Por otro lado, entre los resultados más relevantes se encuentran las consecuencias relacionadas con el desarrollo psicosocial, que se manifiestan en diferentes áreas, como roles forzados (56,75,81), bajo desempeño educativo (51,61,80), problemas cognitivos a largo plazo (47,49,61,82) e influencias de los contextos de pobreza y discriminación, entre otros (33,40,52). Las consecuencias psicosociales se han descrito en diversos estudios, sin embargo, no se ha examinado el cambio en el tiempo y la posible relación con afectaciones en otras áreas del desarrollo.

Una de las fortalezas de esta investigación fue la revisión extensa y detallada de los estudios en diferentes bases de datos para recoger la mayor cantidad de información posible, así como la eventual aplicación de esta síntesis en el campo de la prevención y la mitigación de las afectaciones. Del abanico de consecuencias potenciales de los conflictos armados en la salud mental de infantes y adolescentes, se desprende la necesidad de una aproximación integral, con enfoques complementarios de intervención, que confluyan en el recurso a diferentes profesiones de la salud y las ciencias sociales. Uno de los enfoques que enriquece la comprensión de los conflictos armados y sus consecuencias en la salud mental en este tipo de población, son las intervenciones socioculturales y comunitarias (33,40,52). En este sentido, otras investigaciones han hecho énfasis en la necesidad de que los programas de prevención y el acceso a profesionales de salud mental se gestionen según los grados y tipos de exposición al conflicto armado (93), y que la atención psicosocial esté focalizada en las necesidades específicas de la población teniendo en cuenta variables como etnia, edad y origen (88).

Debe resaltarse también que la salud mental de los cuidadores es un factor de suma importancia, debido a su relación con el posible desarrollo de problemas en infantes y adolescentes (94), lo que resalta el efecto sistémico de los conflictos armados en la salud mental y el desarrollo biopsicosocial, es decir, con los efectos individuales y la ruptura de las redes de apoyo social, lo que se agrava con la falta de acceso a los servicios de salud esenciales. De ello se desprende la necesidad de implementar intervenciones con un enfoque sistémico que trascienda la dimensión clínica y psicopatológica, y den

respuesta a los problemas de salud individual y a la diversidad de problemas sociales, educativos y económicos causados por los conflictos armados (95,96).

En futuros estudios se recomienda usar el diseño longitudinal y hacer evaluaciones confiables con metodología cualitativa y cuantitativa que permitan superar las limitaciones en la recolección de la información y conocer las magnitudes del efecto en el tiempo (8), así como examinar la relación entre determinado tipo de experiencias de violencia y el riesgo de desarrollar afectaciones específicas en la salud mental. Dada la complejidad del tema, es necesario un mayor rigor metodológico en los estudios para obtener resultados válidos, no solo en términos de psicopatología, sino también, en los factores protectores y de resiliencia (15,92).

Referencias

1. Heidelberg Institute for International Conflict Research. Conflict Barometer 2019. Fecha de consulta: 8 de febrero de 2020. Disponible en: <https://hiik.de/conflict-barometer/current-version/?lang=en>
2. English J. World has failed to protect children in conflict in 2018: UNICEF. Fecha de consulta: 5 de enero de 2020. Disponible en: <https://www.unicef.org/press-releases/world-has-failed-protect-children-conflict-2018-unicef>
3. Inter-Agency Standing Committee. Guía del IASC sobre salud mental y apoyo psicosocial en situaciones de emergencia humanitarias y catástrofes. Ginebra: IASC; 2007.
4. Rodríguez J, De La Torre A, Miranda CT. La salud mental en situaciones de conflicto armado. Biomédica. 2002;22:337-46. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v22iSupp2.1183>
5. Miller KE, Rasmussen A. War exposure, daily stressors, and mental health in conflict and post-conflict settings: Bridging the divide between trauma-focused and psychosocial frameworks. Soc Sci Med. 2010;70:7-16. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2009.09.029>
6. Betancourt TS, Khan KT. The mental health of children affected by armed conflict: Protective processes and pathways to resilience. Int Rev Psychiatry. 2008;20:317-28. <https://doi.org/10.1080/09540260802090363>
7. Galderisi S, Heinz A, Kastrup M, Beezhold J, Sartorius N. Toward a new definition of mental health. World Psychiatry. 2015;14:231-3. <https://doi.org/10.1002/wps.20231>
8. Tol WA, Song S, Jordans MJD. Annual research review: Resilience and mental health in children and adolescents living in areas of armed conflict – a systematic review of findings in low-and middle-income countries. J Child Psychol Psychiatry. 2013;54:445-60. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12053>
9. Brown FL, de Graaff AM, Annan J, Betancourt TS. Annual research review: Breaking cycles of violence – a systematic review and common practice elements analysis of psychosocial interventions for children and youth affected by armed conflict. J Child Psychol Psychiatry. 2017;58:507-24. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12671>
10. Masten AS. Global perspectives on resilience in children and youth. Child Dev. 2014;85:6-20. <https://doi.org/10.1111/cdev.12205>
11. Lustig SL, Kia-Keating M, Knight WG, Geltman P, Ellis H, Kinzie JD, *et al.* Review of child and adolescent refugee mental health. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. 2004;43:24-36. <https://doi.org/10.1097/00004583-200401000-00012>
12. Uprooted U. The growing crisis for refugee and migrant children. New York: UNICEF; 2016. p. 17-36.
13. UNHCR. Trends at a glance, 2018 review. Fecha de consulta: 10 de enero de 2020. Disponible en: <https://reliefweb.int/report/world/trends-glance-2018-review>
14. Reed R V, Fazel M, Jones L, Panter-Brick C, Stein A. Mental health of displaced and refugee children resettled in low-income and middle-income countries: Risk and protective factors. Lancet. 2012;379:250-65. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60050-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60050-0)
15. Attanayake V, McKay R, Joffres M, Singh S, Burkle F, Mills E. Prevalence of mental disorders among children exposed to war: A systematic review of 7,920 children. Med Confl Surviv. 2009;25:4-19. <https://doi.org/10.1080/13623690802568913>

16. Slone M, Mann S. Effects of war, terrorism and armed conflict on young children: A systematic review. *Child Psychiatry Hum Dev.* 2016;47:950-65. <https://doi.org/10.1007/s10578-016-0626-7>
17. Dimitry L. A systematic review on the mental health of children and adolescents in areas of armed conflict in the Middle East. *Child Care Health Dev.* 2012;38:153-61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2214.2011.01246.x>
18. Fazel M, Wheeler J, Danesh J. Prevalence of serious mental disorder in 7000 refugees resettled in western countries: A systematic review. *Lancet.* 2005;365:1309-14. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)61027-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)61027-6)
19. Higgins JPT, Green S. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* Version 5.1.0 (updated March 2011). The Cochrane Collaboration, 2011. Fecha de consulta: 11 de diciembre de 2019. Disponible en: www.cochrane-handbook.org
20. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Group P. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *PLoS Med.* 2009;6:e1000097. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097>
21. Gibson K. Children in political violence. *Soc Sci Med.* 1989;28:659-67. [https://doi.org/10.1016/0277-9536\(89\)90213-x](https://doi.org/10.1016/0277-9536(89)90213-x)
22. Fajardo-Mayo MA, Ramírez-Lozano MP, Suescún V, Isabel M, Ospina-Alvarado MC. Más allá de la victimización de niñas y niños en contextos de conflicto armado: potenciales para la construcción de paz. *Univ Psychol.* 2018;17:90-103. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.upsy17-1.mavn>
23. Shenoda S, Kadir A, Pitterman S, Goldhagen J, Section on International Child Health. The effects of armed conflict on children. *Pediatrics.* 2018;142: e20182585. <https://doi.org/10.1542/peds.2018-2585>
24. Morris J, van Ommeren M, Belfer M, Saxena S, Saraceno B. Children and the Sphere standard on mental and social aspects of health. *Disasters.* 2007;31:71-90. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7717.2007.00341.x>
25. Elbedour S, ten Bonsel R, Bastien DT. Ecological integrated model of children of war: Individual and social psychology. *Child Abus Negl.* 1993;17:805-19. [https://doi.org/10.1016/s0145-2134\(08\)80011-7](https://doi.org/10.1016/s0145-2134(08)80011-7)
26. Hernández-Barrera A, Restrepo-Espinosa M. Salud mental en niños en condición de desplazamiento en Colombia y su incidencia en políticas públicas. Bogotá, D.C.: Universidad del Rosario; 2011. p. 1-40. Fecha de consulta: 8 de febrero de 2020. Disponible en: <http://repository.urosario.edu.co/bitstream/handle/10336/2693/1026259749-2011.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
27. Yahav R. Exposure of children to war and terrorism: A review. *J Child Adolesc Trauma.* 2011;4:90-108. <https://doi.org/10.1080/19361521.2011.577395>
28. Werner EE. Children and war: Risk, resilience, and recovery. *Dev Psychopathol.* 2012;24:553-8. <https://doi.org/10.1017/S0954579412000156>
29. Hassan G, Ventevogel P, Jefee-Bahloul H, Barkil-Oteo A, Kirmayer LJ. Mental health and psychosocial wellbeing of Syrians affected by armed conflict. *Epidemiol Psychiatr Sci.* 2016;25:129-41. <https://doi.org/10.1017/S2045796016000044>
30. Pacione L, Measham T, Rousseau C. Refugee children: Mental health and effective interventions. *Curr Psychiatry Rep.* 2013;15:341. <https://doi.org/10.1007/s11920-012-0341-4>
31. Rousseau C. The mental health of refugee children. *Transcult Psychiatry.* 1995;32:299-331. <https://doi.org/10.1177/136346159503200304>
32. Agazio J, Goodman P, Padden DL. Impact of deployment on military families. *Annu Rev Nurs Res.* 2014;32:109-33. <https://doi.org/10.1891/0739-6686.32.109>
33. Berman H. Children and war: Current understandings and future directions. *Public Health Nurs.* 2001;18:243-52. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1446.2001.00243.x>
34. Henley J, Robinson J. Mental health issues among refugee children and adolescents. *Clin Psychol.* 2011;15:51-62. <https://doi.org/10.1111/j.1742-9552.2011.00024.x>
35. Sleijpen M, Boeije HR, Kleber RJ, Mooren T. Between power and powerlessness: A meta-ethnography of sources of resilience in young refugees. *Ethn Health.* 2016;21:158-80. <https://doi.org/10.1080/13557858.2015.1044946>

36. Bohleber W. Remembrance and historicization: The transformation of individual and collective trauma and its transgenerational consequences. *Adolesc Psychiatry*. 2012;2:363-8. <https://doi.org/10.2174/2210676611202040363>
37. Betancourt TS, Meyers-Ohki SE, Charrow AP, Tol WA. Interventions for children affected by war: An ecological perspective on psychosocial support and mental health care. *Harv Rev Psychiatry*. 2013;21:70-91. <https://doi.org/10.1097/HRP.0b013e318283b8f>
38. Prasad AN, Prasad PL. Children in conflict zones. *Med J Armed Forces India*. 2009;65:166-9. [https://doi.org/10.1016/S0377-1237\(09\)80134-2](https://doi.org/10.1016/S0377-1237(09)80134-2)
39. Torrado M, Camargo M, Pineda N, Bejarano D. Estado del arte sobre primera infancia en el conflicto. En: Mejía A, editor. Colombia: huellas del conflicto en la primera infancia. Bogotá: Revista Número Ediciones. 2009. p. 31-53.
40. Anagnostopoulos DC, Giannakopoulos G, Christodoulou NG. The synergy of the refugee crisis and the financial crisis in Greece: Impact on mental health. *Int J Soc Psychiatry*. 2017;63:352-8. <https://doi.org/10.1177/0020764017700444>
41. Ehntholt KA, Yule W. Practitioner review: Assessment and treatment of refugee children and adolescents who have experienced war-related trauma. *J Child Psychol Psychiatry Allied Discip*. 2006;47:1197-210. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2006.01638.x>
42. Qouta S, Punamäki R-L, El Sarraj E. Child development and family mental health in war and military violence: The Palestinian experience. *Int J Behav Dev*. 2008;32:310-21. <https://doi.org/10.1177/0165025408090973>
43. DeRanieri JT, Clements PT, Clark K, Kuhn DW, Manno MS. War, terrorism, and children. *J Sch Nurs*. 2004;20:69-75. <https://doi.org/10.1177/10598405040200020301>
44. Mandalakas A. The greatest impact of war and conflict. *Ambul Child Heal*. 2001;7:97-103.
45. Pfefferbaum B, Pfefferbaum RL, Gurwitch RH, Nagumalli S, Brandt EN, Robertson MJ, et al. Children's response to terrorism: A critical review of the literature. *Curr Psychiatry Rep*. 2003;5:95-100. <https://doi.org/10.1007/s11920-003-0025-1>
46. Williams R. The psychosocial consequences for children and young people who are exposed to terrorism, war, conflict and natural disasters. *Curr Opin Psychiatry*. 2006;19:337-49. <https://doi.org/10.1097/01.yco.0000228751.85828.c1>
47. Williams R. The psychosocial consequences for children of mass violence, terrorism and disasters. *Int Rev Psychiatry*. 2007;19:263-77. <https://doi.org/10.1080/09540260701349480>
48. van Ijzendoorn MH, Bakermans-Kranenburg MJ, Sagi-Schwartz A. Are children of holocaust survivors less well-adapted? A meta-analytic investigation of secondary traumatization. *J Trauma Stress*. 2003;16:459-69. <https://doi.org/10.1023/A:1025706427300>
49. Crowley C. The mental health needs of refugee children: A review of literature and implications for nurse practitioners. *J Am Acad Nurse Pract*. 2009;21:322-31. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7599.2009.00413.x>
50. Jensen PS, Shaw J. Children as victims of war: Current knowledge and future research needs. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1993;32:697-708. <https://doi.org/10.1097/00004583-199307000-00001>
51. Foster H, Brooks-Gunn J. Children's exposure to community and war violence and mental health in four African countries. *Soc Sci Med*. 2015;146:292-9. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2015.10.020>
52. Miller KE, Jordans MJD. Determinants of children's mental health in war-torn settings: Translating research into action. *Curr Psychiatry Rep*. 2016;18:58. <https://doi.org/10.1007/s11920-016-0692-3>
53. Persson TJ, Rousseau C. School-based interventions for minors in war-exposed countries: A review of targeted and general programmes. *Torture*. 2009;19:88-101.
54. Steel Z, Chey T, Silove D, Marnane C, Bryant RA, van Ommeren M. Association of torture and other potentially traumatic events with mental health outcomes among populations exposed to mass conflict and displacement: A systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2009;302:537-49. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1132>
55. Bronstein I, Montgomery P. Psychological distress in refugee children: A systematic review. *Clin Child Fam Psychol Rev*. 2011;14:44-56. Review and meta-analysis. *JAMA*. 2009;302:537-49. <https://doi.org/10.1007/s10567-010-0081-0>

56. Fazel M, Reed R V, Panter-Brick C, Stein A. Mental health of displaced and refugee children resettled in high-income countries: Risk and protective factors. *Lancet*. 2012;379:266-82. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60051-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60051-2)
57. Betancourt TS, Borisova I, Williams TP, Meyers-Ohki SE, Rubin-Smith JE, Annan J, *et al.* Psychosocial adjustment and mental health in former child soldiers--systematic review of the literature and recommendations for future research. *J Child Psychol Psychiatry*. 2013;54:17-36. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2012.02620.x>
58. Drury J, Williams R. Children and young people who are refugees, internally displaced persons or survivors or perpetrators of war, mass violence and terrorism. *Curr Opin Psychiatry*. 2012;25:277-84. <https://doi.org/10.1097/YCO.0b013e328353eeae6>
59. Saltzman LY, Solomyak L, Pat-Horenczyk R. Addressing the needs of children and youth in the context of war and terrorism: The technological frontier. *Curr Psychiatry Rep*. 2017;19:30. <https://doi.org/10.1007/s11920-017-0786-6>
60. Rousseau C, Jamil U, Bhui K, Boudjarane M. Consequences of 9/11 and the war on terror on children's and young adult's mental health: A systematic review of the past 10 years. *Clin Child Psychol Psychiatry*. 2013;20:173-93. <https://doi.org/10.1177/1359104513503354>
61. Rosshandler Y, Hall BJ, Canetti D. An application of an ecological framework to understand risk factors of PTSD due to prolonged conflict exposure: Israeli and Palestinian adolescents in the line of fire. *Psychol Trauma*. 2016;8:641-8. <https://doi.org/10.1037/tra0000124>
62. Neal S, Stone N, Ingham R. The impact of armed conflict on adolescent transitions: A systematic review of quantitative research on age of sexual debut, first marriage and first birth in young women under the age of 20 years. *BMC Public Health*. 2016;16:225. <https://doi.org/10.1186/s12889-016-2868-5>
63. Lustig SL, Tennakoon L. Testimonials, narratives, stories, and drawings: Child refugees as witnesses. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*. 2008;17:569-84. <https://doi.org/10.1016/j.chc.2008.02.001>
64. Montgomery E. Trauma, exile and mental health in young refugees. *Acta Psychiatr Scand*. 2011;124:1-46. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.2011.01740.x>
65. Hoven CW, Duarte CS, Mandell DJ. Children's mental health after disasters: The impact of the World Trade Center attack. *Curr Psychiatry Rep*. 2003;5:101-7. <https://doi.org/10.1007/s11920-003-0026-0>
66. Fu C, Underwood C. A meta-review of school-based disaster interventions for child and adolescent survivors. *J Child Adolesc Ment Health*. 2015;27:161-71. <https://doi.org/10.2989/17280583.2015.1117978>
67. Forman-Hoffman VL, Zolotor AJ, McKeeman JL, Blanco R, Knauer SR, Lloyd SW, *et al.* Comparative effectiveness of interventions for children exposed to nonrelational traumatic events. *Pediatrics*. 2013;131:526-39. <https://doi.org/10.1542/peds.2012-3846>
68. Dekel R, Goldblatt H. Is there intergenerational transmission of trauma? The case of combat veterans' children. *Am J Orthopsychiatry*. 2008;78:281-9. <https://doi.org/110.1037/a0013955>
69. Davis L, Siegel LJ. Posttraumatic stress disorder in children and adolescents: A review and analysis. *Clin Child Fam Psychol Rev*. 2000;3:135-54. <https://doi.org/10.1023/a:1009564724720>
70. Jordans MJD, Tol WA, Komproe IH, De Jong JVTM. Systematic review of evidence and treatment approaches: Psychosocial and mental health care for children in war. *Child Adolesc Ment Health*. 2009;14:2-14. <https://doi.org/10.1111/j.1475-3588.2008.00515.x>
71. Neuner F, Catani C, Ruf M, Schauer E, Schauer M, Elbert T. Narrative exposure therapy for the treatment of traumatized children and adolescents (KidNET): From neurocognitive theory to field intervention. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*. 2008;17:641-64. <https://doi.org/10.1016/j.chc.2008.03.001>
72. Moss WJ, Ramakrishnan M, Storms D, Siegle AH, Weiss WM, Lejnev I, *et al.* Child health in complex emergencies. *Bull World Health Organ*. 2006;84:58-64. <https://doi.org/10.2471/blt.04.019570>
73. Masten AS, Narayan AJ. Child development in the context of disaster, war, and terrorism: Pathways of risk and resilience. *Ann Rev Psychol*. 2012;63:227-57.
74. Barenbaum J, Ruchkin V, Schwab-Stone M. The psychosocial aspects of children exposed to war: Practice and policy initiatives. *J Child Psychol Psychiatry Allied Discip*. 2004;45:41-62. <https://doi.org/10.1046/j.0021-9630.2003.00304.x>

75. Fazel M, Stein A. The mental health of refugee children. *Arch Dis Child*. 2002;87:366-70. <https://doi.org/10.1136/adsc.87.5.366>
76. Fox PG, Cowell JM, Montgomery AC. The effects of violence on health and adjustment of Southeast Asian refugee children: An integrative review. *Public Health Nurs*. 1994;11:195-201. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1446.1994.tb00401.x>
77. Pine DS, Costello J, Masten A. Trauma, proximity, and developmental psychopathology: The effects of war and terrorism on children. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30:1781-92. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300814>
78. Summerfield D. Childhood, war, refugeedom and 'trauma': Three core questions for mental health professionals. *Transcult Psychiatry*. 2000;37:417-33. <https://doi.org/10.1177/136346150003700308>
79. Peltonen K, Punamäki RL. Preventive interventions among children exposed to trauma of armed conflict: A literature review. *Aggress Behav*. 2010;36:95-116. <https://doi.org/10.1002/ab.20334>
80. Shaar KH. Post-traumatic stress disorder in adolescents in Lebanon as wars gained in ferocity: A systematic review. *J Public Health Res*. 2013;2:e17. <https://doi.org/10.4081/jphr.2013.e17>
81. White CJ, De Burgh HT, Fear NT, Iversen AC. The impact of deployment to Iraq or Afghanistan on military children: A review of the literature. *Int Rev Psychiatry*. 2011;23:210-7. <https://doi.org/10.3109/09540261.2011.560143>
82. Stough LM, Ducey EM, Kang D. Addressing the needs of children with disabilities experiencing disaster or terrorism. *Curr Psychiatry Rep*. 2017;19:24. <https://doi.org/10.1007/s11920-017-0776-8>
83. Sullivan PM. Violence exposure among children with disabilities. *Clin Child Fam Psychol Rev*. 2009;12:196-216. <https://doi.org/10.1007/s10567-009-0056-1>
84. Shaw JA. Children exposed to war/terrorism. *Clin Child Fam Psychol Rev*. 2003;6:237-46.
85. Betancourt TS, Newnham EA, McBain R, Brennan RT. Post-traumatic stress symptoms among former child soldiers in Sierra Leone: follow-up study. *Br J Psychiatry*. 2013;203:196-202.
86. Singhal S. Early life shocks and mental health: The long-term effect of war. *J Dev Econ*. 2018;141:102244. <https://doi.org/10.1016/j.jdevco.2018.06.002>
87. Ornnert A. Implications of not addressing mental health and psychosocial support (MHPSS) needs in conflict situations. Brighton, UK: Institute of Development Studies; 2019. p. 1-20.
88. Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. Estado psicosocial de los niños, niñas y adolescentes: una investigación de consecuencias, impactos y afectaciones por hecho victimizante con enfoque diferencial en el contexto del conflicto armado colombiano. Bogotá: ICBF; 2014. p. 15-28.
89. Shenoda S, Kadir A, Pitterman S, Goldhagen J, Section on International Child Health. The effects of armed conflict on children. *Pediatrics*. 2018;142:e20182585. <https://doi.org/10.1542/peds.2018-2585>
90. Pesonen A-K, Räikkönen K, Feldt K, Heinonen K, Osmond C, Phillips DIW, *et al*. Childhood separation experience predicts HPA axis hormonal responses in late adulthood: A natural experiment of World War II. *Psychoneuroendocrinology*. 2010;35:758-67. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.10.017>
91. Feldman R, Vengrober A, Eidelman-Rothman M, Zagoory-Sharon O. Stress reactivity in war-exposed young children with and without posttraumatic stress disorder: Relations to maternal stress hormones, parenting, and child emotionality and regulation. *Dev Psychopathol*. 2013;25:943-55. <https://doi.org/10.1017/S0954579413000291>
92. Jordans MJD, Pigott H, Tol WA. Interventions for children affected by armed conflict: A systematic review of mental health and psychosocial support in low- and middle-income countries. *Curr Psychiatry Rep*. 2016;18:9. <https://doi.org/10.1007/s11920-015-0648-z>
93. Puentes RC, Morad IS, Puentes SRC, Puentes WIC, Badillo CC, Contreras GP De, *et al*. Depression, anxiety and somatic complaints in Colombian children living in rural communities. *Rev Univ Ind Santander Salud*. 2013;45:9-19.
94. Kadir A, Shenoda S, Goldhagen J. Effects of armed conflict on child health and development: A systematic review. *PLoS ONE*. 2019;14:1-37. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210071>

95. Bell V, Méndez F, Martínez C, Palma PP, Bosch M. Characteristics of the Colombian armed conflict and the mental health of civilians living in active conflict zones. *Confl Health*. 2012;6:1-8. <https://doi.org/10.1186/1752-1505-6-10>
96. Panter-Brick C, Grimon MP, Eggerman M. Caregiver - Child mental health: A prospective study in conflict and refugee settings. *J Child Psychol Psychiatry Allied Discip*. 2014;55:313-27. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12167>

Archivos suplementarios

Anexo 1. Estrategia de búsqueda

Reporte de búsqueda electrónica No. 1	
Base de datos	MEDLINE(R) and Epub Ahead of Print, In-Process & Other Non-Indexed Citations, Daily and Versions(R)
Plataforma	Ovid
Fecha de búsqueda	01-07-2019
Rango de fecha de búsqueda	Sin restricción
Restricciones de lenguaje	Sin restricción
Otros límites	Revisiones, máxima sensibilidad
Estrategia de búsqueda (resultados)	1. exp Child/ (1834590) 2. child*.ab,ti.(1167918) 3. preschool.ab,ti. (19899) 4. adolescent.ab,ti. (91883) 5. 1 OR 2 OR 3 OR 4 (2194211) 6. exp Armed Conflicts/ (9711) 7. war.ab,ti. (30580) 8. (War and (conflict or crimen)).ab,ti. (1486) 9. 6 OR 7 OR 8 (36638) 10. 5 AND 9 (4302) 11. limit 10 to "reviews (best balance of sensitivity and specificity)" (412)
Referencias identificadas	412
Reporte de búsqueda electrónica No. 2	
Base de datos	Embase
Plataforma	Elsevier
Fecha de búsqueda	09-06-2019
Rango de fecha de búsqueda	Sin restricción
Restricciones de lenguaje	Sin restricción
Otros límites	Revisión
Estrategia de búsqueda (resultados)	1. 'child'/exp (2729007) 2. child*:ab,ti (1701964) 3. 'adolescent'/exp (1576994) 4. 'adolescence'/exp (89544) 5. teenager:ab,ti (3793) 6. 1 OR 2 OR 3 OR 4 OR 5 (3956107) 7. 'war'/exp (31055) 8. 'armed conflict':ab,ti (1159) 9. 'crimean war':ab,ti (112) 10. 4 OR 5 OR 6 (31609) 11. 6 AND 10 (3982) 12. 8 AND 'Review'/it (360) 13. 9 AND 'Review'/it AND [embase]/lim NOT ([embase]/lim AND [medline]/lim) (85)
Referencias identificadas	85
Reporte de búsqueda electrónica No. 3	
Tipo de búsqueda	Nueva
Base de datos	Cochrane Database of Systematic Reviews
Plataforma	Ovid
Fecha de búsqueda	01-07-2019
Rango de fecha de búsqueda	Sin restricción
Restricciones de lenguaje	Sin restricción
Otros límites	Revisión
Estrategia de búsqueda (resultados)	1. child.mp. [mp=title, short title, abstract, full text, keywords, caption text] (3180) 2. child*.mp. [mp=title, short title, abstract, full text, keywords, caption text] (5195) 3. preschool.mp. [mp=title, short title, abstract, full text, keywords, caption text] (576) 4. adolescent.mp. [mp=title, short title, abstract, full text, keywords, caption text] (954) 5. 1 OR 2 OR 3 OR 4 (5269) 6. armed conflicts.mp. [mp=title, short title, abstract, full text, keywords, caption text] (5) 7. war.mp. [mp=title, short title, abstract, full text, keywords, caption text] (85) 8. (War and (conflict or crimen)).mp. [mp=title, short title, abstract, full text, keywords, caption text] (22) 9. 6 OR 7 OR 8 (86) 10. 5 AND 9 (60)
Referencias identificadas	60

Reporte de búsqueda electrónica No. 5

Tipo de búsqueda	Nueva
Base de datos	LILACS
Plataforma	Biblioteca Virtual de la Salud
Fecha de búsqueda	01-07-2019
Rango de fecha de búsqueda	Sin restricción
Restricciones de lenguaje	Sin restricción
Otros límites	LILACS Revisión
Estrategia de búsqueda (resultados)	1. tw:(((child OR child* OR preschool OR adolescent) AND (armed conflict OR war OR (war (conflict OR crimen)))) AND (review)) AND (instance:"regional") AND (db:"LILACS")) (12)
Referencias identificadas	12

Anexo 2. Estudios excluidos y razones

N°	Autores	Título	Razón de exclusión
1	Häfner, H., Veiel, H. O., Welz, R. (1988)	The epidemiology of suicide and attempted suicide	No enfocado en la población
2	Ursano, R. J., Holloway, H. C., Jones, D. R., Rodríguez, A. R., Belenky, G. L. (1989)	Psychiatric care in the military community: family and military stressors	No enfocado en el objetivo
3	Bar-On, D. (1990).	Children of perpetrators of the Holocaust: working through one's own moral self	No es una revisión.
4	Garbarino, J., Kostelny, K., Dubrow, N. (1991)	What children can tell us about living in danger	No enfocado en el objetivo
5	Grillo, T. (1991)	Violence among women and children	No enfocado en la población
6	Hobfoll, S. E., Spielberger, C. D., Breznitz, S., Figley, C., Folkman, S., Lepper-Green, B., ... van der Kolk, B. (1991)	War-related stress. Addressing the stress of war and other traumatic events	No enfocado en la población
7	Krell, R. (1993)	Child survivors of the Holocaust--strategies of adaptation	No es una revisión.
8	Putnam, F. W., Trickett, P. K. (1993)	Child sexual abuse: a model of chronic trauma	No enfocado en el objetivo
9	Schwarz, E. D., Perry, B. D. (1994)	The post-traumatic response in children and adolescents	No enfocado en el objetivo
10	Aboutanos, M. B., Baker, S. P. (1997)	War-time civilian injuries: epidemiology and intervention strategies	No enfocado en el objetivo
11	Shearar, A. (1997)	Dying to go to school	No es una revisión.
12	Hodgins, S. (1998)	Epidemiological investigations of the associations between major mental disorders and crime: methodological limitations and validity of the conclusions	No enfocado en la población
13	Joshi, P. T. (1998)	Guidelines for international trauma work	No es una revisión.
14	Sack, W. H. (1998)	Multiple forms of stress in refugee and immigrant children	No es una revisión.
15	van der Hart, O., Brown, P., Graafland, M. (1999)	Trauma-induced dissociative amnesia in World War I combat soldiers.	No enfocado en la población
16	Kaminer, D., Seedat, S., Lockhat, R., Stein, D. J. (2000)	Violent trauma among child and adolescent girls: current knowledge and implications for clinicians.	Artículo no encontrado y no hay respuesta de autores.
17	Nakatani, Y. (2000).	[Dissociative disorders: from Janet to DSM-IV].	No enfocado en el objetivo ni la población
18	Ng, V., Norwood, A. (2000)	Psychological trauma, physical health and somatization.	No enfocado en el objetivo
19	Solomon, Z. (2000)	The psychological consequences of war: The Israeli experience	No es una revisión.
20	Buskila, D. (2001)	Fibromyalgia, chronic fatigue syndrome, and myofascial pain syndrome.	No enfocado en el objetivo

21	O'Shea, B. (2001)	Post-traumatic stress disorder: A review for the general psychiatrist	No enfocado en la población
22	Porter, M., Haslam, N. (2001)	Forced displacement in Yugoslavia: a meta-analysis of psychological consequences and their moderators.	No enfocado en la población
23	Dickson-Gómez, J. (2002)	The sound of barking dogs: violence and terror among Salvadoran families in the postwar.	No es una revisión.
24	Veenema, T. G., Schroeder-Bruce, K. (2002)	The aftermath of violence: children, disaster, and posttraumatic stress disorder.	No es una revisión.
25	Albertyn, R., Bickler, S. W., Van As, A. B., Millar, A. J. W., Rode, H. (2003)	The effects of war on children in Africa.	No enfocado en el o.bjetivo
26	Caffo, E., Belaise, C. (2003)	Psychological aspects of traumatic injury in children and adolescents.	No enfocado en el objetivo
27	Laor, N., Wolmer, L., Spirman, S., Wiener, Z. E. (2003)	Facing war, terrorism, and disaster: toward a child-oriented comprehensive emergency care system.	No es una revisión
28	Miller, L. (2003)	Family therapy of terroristic trauma: Psychological syndromes and treatment strategies	No enfocado en la población
29	Pearn, J. (2003)	Children and war	No enfocado en el objetivo
30	Ermann, M (2004)	Children of World War II - 60 Year after	No enfocado en el objetivo
31	Myers-Walls, J. A. (2004)	Children as victims of war and terrorism	No enfocado en el objetivo
32	Nagao, K. (2004)	War and trauma in children: (II) trauma and its characteristics	No es una revisión.
33	Nagao, K. (2004)	War and trauma in children: (I) war and its victims	No es una revisión.
34	Caffo, E., Forresi, B., Lievers, L. S. (2005)	Impact, psychological sequelae and management of trauma affecting children and adolescents	No enfocado en el objetivo
35	Fazel, M., Wheeler, J., Danesh, J. (2005)	Prevalence of serious mental disorder in 7000 refugees resettled in western countries: A systematic review	No enfocado en el objetivo (revisión de encuestas)
36	Vickers, B. (2005)	Cognitive model of the maintenance and treatment of post-traumatic stress disorder applied to children and adolescents	No es una revisión.
37	Bader, K., Schäfer, V. (2007)	Sleep disturbances following traumatic experiences in childhood and adolescence: A review	No enfocado en el objetivo
38	Kanji, Z., Drummond, J., Cameron, B. (2007)	Resilience in Afghan children and their families: a review	Artículo no encontrado y no hay respuesta de autores.
39	Kanji, Z., Drummond, J., Cameron, B. (2007)	Clinical characteristics and efficacious treatment of post-traumatic stress disorder in children and adolescents	No es una revisión.
40	Lüscher, K., Heuft, G. (2007)	Ambivalence - strain - trauma	No enfocado en la población
41	Bonanno, G. A., Mancini, A. D. (2008)	The human capacity to thrive in the face of potential trauma	No enfocado en el objetivo
42	Castellanos-Obregón, J. M., Torres Silva, W. F. (2008)	A review of academic production on political violence in Colombia to trace the place of youths	No enfocado en el objetivo
43	Cummings, E. M., Goeke-Morey, M. C., Schermerhorn, A. C., Merrilees, C. E., Cairns, E. (2009)	Children and political violence from a social ecological perspective: implications from research on children and families in Northern Ireland	No enfocado en el objetivo
44	Ermann, M., Pflithofer, D., Kamm, H. (2009, December)	Children of Nazi Germany 60 years on	No enfocado en el objetivo
45	Quiroga, J. (2009)	Torture in children	No enfocado en el objetivo
46	Tufnell, G., DeJong, M. (2009)	Stress and post-traumatic stress disorder	No enfocado en el objetivo

47	Benjet, C. (2010)	Childhood adversities of populations living in low-income countries: prevalence, characteristics, and mental health consequences	No enfocado en el objetivo
48	Robjant, K., Fazel, M. (2010)	The emerging evidence for Narrative Exposure Therapy: a review	No enfocado en el objetivo
49	Mundt, A., Wünsche, P., Heinz, A., Pross, C. (2011)	Trauma therapy in crisis and disaster areas--a critical review of standardized interventions such as narrative exposure therapy	No es una revisión.
50	M Rothe, E., J Pumariaga, A., Sabagh, D. (2011)	Identity and acculturation in immigrant and second generation adolescents	No enfocado en el objetivo
51	De Burgh HT, White CJ, Fear NT, Iversen AC. The impact of deployment to Iraq or Afghanistan on partners and wives of military personnel. (2011).	The impact of deployment to Iraq or Afghanistan on military children: a review of the literature	No enfocado en el objetivo
52	Carlson, B. E., Cacciatore, J., Klimek, B. (2012)	A risk and resilience perspective on unaccompanied refugee minors	No es una revisión.
53	Ermann, M. (2012)	Germans reporting about their childhood in the WWII and the Nazi era	No es una revisión.
54	Coren, E., Hossain, R., Pardo, J. P., Veras, M. M., Chakraborty, K., Harris, H., Martin, A. J. (2013)	Interventions for promoting reintegration and reducing harmful behaviour and lifestyles in street-connected children and young people	No enfocado en el objetivo
55	Danieli, Y. (2013)	Sharing knowledge and shared care	No enfocado en el objetivo
56	Gillies, D., Taylor, F., Gray, C., O'Brien, L., D'Abrew, N. (2013)	Psychological therapies for the treatment of post-traumatic stress disorder in children and adolescents	No enfocado en el objetivo
57	Harendra de Silva, D. G. (2013)	The use of child soldiers in war with special reference to Sri Lanka	No enfocado en el objetivo
58	Lieberman, A. F., Van Horn, P. (2013)	Infants and young children in military families: a conceptual model for intervention	No enfocado en el objetivo
59	Musisi, S., Akena, D., Nakimuli-Mpungu, E., Abbo, C., Okello, J. (2013)	Neuropsychiatric perspectives on nodding syndrome in northern Uganda: a case series study and a review of the literature	No enfocado en el objetivo
60	Orlowski, H. V., Klauer, T., Freyberger, H. J., Seidler, G. H., Kuwert, P. (2013)	The psychology of being unaccounted for, based on the example of children of missing German soldiers from World War II	Artículo no encontrado y no hay respuesta de autores.
61	Smith, R. C., Chun, R. S., Michael, R. L., Schneider, B. J. (2013)	Operation BRAVE families: A preventive approach to lessening the impact of war on military families through preclinical engagement	No enfocado en el objetivo
62	Wadsworth, S. M. (2013)	Understanding and supporting the resilience of a new generation of combat-exposed military families and their children	No enfocado en el objetivo
63	Erdheim, M. (2014)	Adolescence and migration	No es una revisión.
64	Gewirtz, A. H., Zamir, O. (2014)	The impact of parental deployment to war on children: the crucial role of parenting	No enfocado en el objetivo
65	Lambert, J. E., Holzer, J., Hasbun, A. (2014)	Association between parents' PTSD severity and children's psychological distress: a meta-analysis	No enfocado en el objetivo
66	Klin, A., Wetherby, A. M., Woods, J., Saulnier, C., Stapel-Wax, J., Klaiman, C., Bearss, K. (2015)	Toward innovative, cost-effective, and systemic solutions to improve outcomes and well-being of military families affected by autism spectrum disorder	No enfocado en el objetivo
67	Pietraszewski, D., Shaw, A. (2015)	Not by strength alone: children's conflict expectations follow the logic of the asymmetric war of attrition	No enfocado en el objetivo

68	Pfefferbaum B, Jacobs AK, Nitiéma P, Everly GS (2015)	Child debriefing: a review of the evidence base	No enfocado en el objetivo
69	Gillies, D., Maiocchi, L., Bhandari, A. P., Taylor, F., Gray, C., O'Brien, L. (2016)	Psychological therapies for children and adolescents exposed to trauma	No enfocado en el objetivo
70	McAlpine, A., Hossain, M., Zimmerman, C. (2016)	Sex trafficking and sexual exploitation in settings affected by armed conflicts in Africa, Asia and the Middle East: systematic review	No enfocado en la población
71	Masodkar, K., Johnson, J., Peterson, M. J. (2016)	A review of posttraumatic stress disorder and obesity: Exploring the link	No enfocado en la población
72	Pfefferbaum B, Nitiéma P, Jacobs AK, Noffsinger MA, Wind LH, Allen SF (2016)	Review of coping in children exposed to mass trauma: Measurement tools, coping styles, and clinical implications	No enfocado en el objetivo
73	Slone, M., Shur, L., Gilady, A. (2016)	Youth exposed to terrorism: The moderating role of ideology	No enfocado en el objetivo
74	Tierney, D., Bolton, P., Matanu, B., Garasu, L., Barnabas, E., Silove, D. (2016)	The mental health and psychosocial impact of the Bougainville Crisis: A synthesis of available information	No enfocado en la población
75	Wainryb, C., Bourne, S. (2016)	And I Shot Her: On War, and the Creation of Inequities in the Development of Youths' Moral Capacities	No es una revisión.
76	Ba, I., Bhopal, R. S. (2017)	Physical, mental and social consequences in civilians who have experienced war-related sexual violence: a systematic review (1981-2014)	No enfocado en la población
77	Frost, A., Boyle, P., Autier, P., King, C., Zwiijnenburg, W., Hewitson, D., Sullivan, R. (2017)	The effect of explosive remnants of war on global public health: a systematic mixed-studies review using narrative synthesis	No enfocado en la población
78	Meiser-Stedman, R., Allen, L. R. (2017)	Start as you mean to carry on: the emerging evidence base for the treatment of conflict-related mental health difficulties in children and adolescents	No es una revisión.
79	ISSOP Migration Working Group. (2018)	ISSOP position statement on migrant child health	No enfocado en el objetivo
80	Purgato, M., Gastaldon, C., Papola, D., Van Ommeren, M., Barbui, C., Tol, W. A. (2018)	Psychological therapies for the treatment of mental disorders in low- and middle-income countries affected by humanitarian crises	No enfocado en el objetivo
81	Sepahvand, H., Hashtjini, M. M., Salesi, M., Sahraei, H., Jahromi, G. P. (2019)	Prevalence of post-traumatic stress disorder (PTSD) in Iranian population following disasters and wars: A systematic review and meta-analysis	No enfocado en la población
82	Tabares, G., Stiths, A. (2019)	Prosociality. Current status of research in colombia	No enfocado en el objetivo

Original article

A novel activity on thymocytes cells exerted by the rattlesnake (*Crotalus durissus cumanensis*) venom

María M. Pulido-Méndez¹, Elvia Azuaje¹, Alexis Rodríguez-Acosta²

¹ Laboratorio de Inmunología, Instituto de Medicina Experimental, Universidad Central de Venezuela, Caracas, República Bolivariana de Venezuela

² Laboratorio de Inmunoquímica y Ultraestructura, Instituto Anatómico, Universidad Central de Venezuela, Caracas, República Bolivariana de Venezuela

Introduction: The thymus is active mainly during the neonatal and pre-adolescent periods.

Objective: To test naïve thymocytes proliferation and monocytes stimulation.

Materials and methods: We collected fresh thymus tissue from neonate mice after surgery. Suspension cells were coated onto Ficoll-Hypaque support. The obtained cells (thymocytes) were cultured measuring the proliferation of naïve T cells stimulated by *Crotalus durissus cumanensis* (Cdc) venom at sub-lethal doses (20 ng). Then, we supplemented the wells with AlamarBlue™ and incubated them for 5 h to test their proliferation. Mononuclear cells from mice peripheral blood were collected and layered onto the support of the Ficoll-Hypaque solution. We added the thymocytes actively dividing (25×10^5 cells) from cultures stimulated with Cdc venom at 20 ng/well to cultured monocytes freshly obtained from the Ficoll-Hypaque separation. Both cell populations were incubated for 36 h until monocytes matured to macrophages.

Results: The naïve thymocytes rapidly proliferated after stimulation with the Cdc venom (NTCdc) and these successively induced the maturation and function of monocytes progenitor cells to mature macrophages, which ingested Chinese ink.

Conclusions: The naïve thymocytes proliferated by stimulation with the Cdc venom and subsequently the NT/Cdc induced the rapid maturation and function of monocytes progenitor cells becoming mature macrophages with their phenotypic characteristics.

Keywords: *Crotalus*; crotalid venoms; thymocytes; monocytes; macrophages; venom.

Nueva actividad de los timocitos estimulada por el veneno de la serpiente de cascabel (*Crotalus durissus cumanensis*)

Introducción. El timo es activo principalmente durante los períodos neonatal y preadolescente.

Objetivo. Probar la proliferación de los timocitos tempranos y la estimulación de monocitos que producen.

Materiales y métodos. Se recogió tejido de timo fresco después de la cirugía de ratones recién nacidos. La suspensión de células se colocó sobre un soporte de Ficoll-Hypaque. Las células obtenidas (timocitos) se cultivaron y se midió la proliferación de células T vírgenes estimuladas por el veneno de *Crotalus durissus cumanensis* (Cdc) en dosis subletales (20 ng). A continuación, se agregó AlamarBlue™ a los pocillos y se incubaron durante 5 horas para evaluar la proliferación. Se recogieron células mononucleares de sangre periférica de ratones y se colocaron sobre un soporte de solución de Ficoll-Hypaque. Los timocitos que se dividieron activamente (25×10^5 células) a partir de los cultivos estimulados con veneno de Cdc (20 ng/pocillo) y se agregaron a los cultivos de monocitos recién obtenidos de la separación en la solución de Ficoll-Hypaque. Ambas poblaciones celulares se incubaron durante 36 horas hasta que los monocitos maduraron a macrófagos.

Resultados Los timocitos tempranos experimentaron una rápida proliferación estimulada por el veneno de Cdc (NTCdc) y, posteriormente, indujeron la maduración y la función de las células progenitoras de monocitos, los cuales maduraron a macrófagos, que se tiñeron con tinta china.

Conclusiones. Los timocitos tempranos proliferaron con la estimulación del veneno de Cdc y, posteriormente, el NT/Cdc indujo la maduración rápida y la función de las células progenitoras de monocitos, transformándose en macrófagos con sus características fenotípicas.

Palabras clave: *Crotalus*; venenos de crotalidos; timocitos; monocitos; macrófagos.

The thymus gland is located in the mediastinum, at the back of the sternum bone. It is structured by two lobes, which are divided into a central medulla and a peripheral cortex. The thymus is active mainly during the neonatal and pre-adolescent periods (1). During adolescence, the organ practically ceases to

Received: 20/05/2020

Accepted: 01/03/2021

Published: 02/03/2021

Citation:

Pulido-Méndez MM, Azuaje E, Rodríguez-Acosta A. A novel activity on thymocytes cells exerted by the rattlesnake (*Crotalus durissus cumanensis*) venom. Biomédica. 2021;41:449-57.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.5599>

Corresponding author:

Alexis Rodríguez-Acosta, Laboratorio de Inmunoquímica y Ultraestructura, Instituto Anatómico, Universidad Central de Venezuela, Ciudad Universitaria de Caracas, Caracas 1041, República Bolivariana de Venezuela
rodriguezacosta1946@yahoo.es

Author contributions:

María M. Pulido-Méndez and Alexis Rodríguez-Acosta: designed the study.
All authors carried out the experiments; analysed and interpreted the data and wrote the manuscript.

Funding:

Research grant (PG: 09-8760-2013) from the Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela, República Bolivariana de Venezuela

Conflicts of interest:

The authors have no conflict of interests.

exist until it weighs around 5 g and is substituted by fat tissue. Subsequently, naïve T cells output is reduced harshly declining the immune response to freshly met antigens, which renders thymus involution a major cause of age-related deterioration in the immune system activity. The thymus is a crucial organ for the maintenance of the immune system. It controls and regularizes the total immune system and its organization in mammals. Together with bone marrow, the thymus is the primary donor of cells for the lymphatic system (2). In its interior, progenitor cells are formed maturing and differentiating into mature T cells (3). A naïve T cell is a pre-T cell that has been differentiated into bone marrow and effectively suffered the positive and negative routes of central selection in the thymus, among which we find the naïve forms of cytotoxic T cells (CD8+) and helper T cells (CD4+) (4).

The possibility of enhancing the thymus function may prove important in a wide variety of immunological diseases and, therefore, the development of new approaches to regenerate the matured thymus is very valuable (1,5). In the past, several authors (6) demonstrated that thymus epithelial cells released humoral factors granting T cell precursors (thymus-dependent lymphocytes) the ability to differentiate and mature into rather mature T cells. They showed that acetylcholine (ACh) boosted the proliferation of thymus epithelial cells, but this finding was totally surpassed by the pre-treatment of alpha-bungarotoxin (alpha-BTx), one of the components of the Taiwanese krait snake (*Bungarus multicinctus*) venom (7).

In this context, we wanted to explore the autochthonous *Crotalus durissus cumanensis* (Cdc) snake venom to see if it stimulated α -bungarotoxin-like activities. We proposed that dividing Cdc-venom-stimulated naïve thymocytes (NTCdc) would regulate the maturation and function of monocytes progenitor cells increasing their differentiation and then rapidly developing into mature macrophages. Our aim, then, was to test the Cdc venom capability to stimulate the division of naïve thymus cells, which, in their turn, would be able to induce T-lymphocytes and monocytes maturation.

Materials and methods

Reagents

Ficoll 400 was purchased from Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden, and Hypaque (50% w/v) from Winthrop-Breon Laboratories, MO, USA; minimum essential media (MEM) and fetal calf serum, from GIBCO (Thermo-Fisher Scientific, USA), and alamarBlue™ (resazurin:7-hydroxy-3H-phenoxazine-3-one-10-oxide sodium salt), from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Mice

We obtained the congenic C57BL/6c-strain female mice (6 weeks) from the laboratory animal center at *Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas* (IVIC). The animals were sacrificed by intraperitoneal injection of Pentothal™ following norms and international procedures for the use of laboratory animals (8).

Venom

The Cdc venom was obtained from snake specimens kept at the immunochemistry and ultrastructural laboratory at *Instituto Anatómico, Universidad Central de Venezuela*, Caracas, originated at Santa Teresa del Tuy,

Miranda State, República Bolivariana de Venezuela. *Cdc* expected dilutions in 0.5 mg/ml concentrations were preserved in aliquots at - 30° C until use.

Thymus tissue isolation

Fresh thymus tissue was collected from neonate mice after surgery and the cells were isolated immediately. After eliminating the blood vessels and the capsule, the thymus was washed thoroughly with MEM but no fetal calf serum (FCS). The organ was then cut into 1 mm³ fragments and then broken up in cold in Petri dishes on slush ice to free the cells; all cell suspensions were moved to a sterile 50-ml centrifuge tube by passing it through a wire mesh filter to remove the remains of tissue and undisintegrated cells. Next, we added 5 ml of MEM (without FCS) to recover the top number of cells and relocate them in the 50-ml tube. The volume was taken to 30 ml with MEM solution to continue the washing by centrifugation (1,800g for 10 min) at 10°C and get the cell pellet with the thymocytes.

Thymocytes isolation

The suspension of cells previously isolated was diluted with an equal volume of 0.9% (w/v) NaCl, then coated onto Ficoll-Hypaque support (1.077 g/ml) and centrifuged at room temperature for 30 min at 400g. The cells were collected from the interface and washed twice with 20 mM phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4.

We used a hemocytometer for the counting of the cells obtained while their viability was verified by trypan blue dye exclusion (Sigma, Mo, USA). The cell counting tubes contained 20 µl of cell suspension diluted in 30 µl of MEM (without FCS) solution to which 50 µl of exclusion dye were added (dilution factor = 5). After 5 to 15 min, we conducted the counting and checked cell viability assumed to be acceptable above 95%. Subsequently, we added 200 µl (6 x 10⁶ cells) of cell suspension in MEM with 10% FCS complemented with antibiotics (streptomycin 100 µg/ml; penicillin 100 IU/ml) per well and incubated at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator.

Naïve-thymocytes stimulated with Cdc venom (NTCdc)

We cultured thymocytes (1 x 10⁶ cells/well) and measure the proliferation of naïve T cells stimulated with *Cdc* venom at sub-lethal doses (20 ng). The counts mean was estimated and plotted against culture time producing a growth curve using the AlamarBlue™ (resazurin) proliferation assay.

AlamarBlue™ (resazurin) proliferation assay

For this assay, we poured 1 x 10⁴ thymocytes per well into 96-microtitre plates to determine cell proliferation with 200 µl of MEM. After adaptation, cells were treated with *Cdc* venom (20 ng/well). After 36 h of exposure, the medium was extracted and the cells were washed with 300 µl of PBS (-Mg/-Ca). Then, 200 µl of fresh MEM having 2 mM AlamarBlue™ were supplemented to the wells and then wrapped in aluminum foil and incubated for 5 h at 37°C, 5% CO₂, and 95% humidity. We included cells without venom as controls. Afterwards, 160 µl aliquots of each sample and controls were relocated into white fluorescence measurement plates (Falcon™, Corning, NY, USA). The amount of reduced AlamarBlue™ (fluorescence signals) was proportional to the proliferative activity of the cells and expressed as a percentage. To calculate the reduction percentage, we read cultures' absorbance at λ_{ex} = 570 and λ_{em} = 600 nm wavelengths where the absorption peaks of the reduced

and oxidized forms occurred. After subtracting the values of the blanks from the medium, we calculated the average of the triplicates, the oxide-reduction correction factor (Ro), and the percentage of reduced AlamarBlue™ in each experimental condition.

Monocytes isolation

We diluted mice peripheral blood collected by using sodium citrate as anti-coagulant with an equal volume of 0.9% (w/v) NaCl layered onto a Ficoll-Hypaque support (1.077 g/ml) and centrifuged at room temperature for 30 min at 400g. Monocytes were purified from mononuclear cells, which were collected from 25 ml of mice peripheral blood (up to 12×10^7 cells) by means of sodium citrate (used as anti-coagulant) diluted with an equal volume of 0.9% (w/v) NaCl, layered onto Ficoll-Hypaque support (1.077 g/ml). We obtained a continuous density gradient by centrifugation where cells were settled into two close-fitting bands, one at the top of the tube and the other at the bottom, separated by a distance of 5 cm. Thus, the collection of the different groups of cells without cross-contamination was easy. The top band contained most of the monocytes while the lymphocytes and some monocytes were present in the bottom band. The mononuclear cells were then collected from the interface and washed twice with 20 mM PBS, pH 7.4. The cells were resuspended in a small volume of PBS. Final cell preparations enclosed regularly monocytes containing an insignificant number of granulocytes namely eosinophils or basophils cells as the main contaminating cells. The monocytes were identified by nonspecific esterase (NSE) staining (9). Finally, cells with constant viability > 99% were coated in tissue culture plates (Nunc® Delta, 24 wells, Denmark) and 10^6 cells per well in 1 ml MEM complemented with antibiotics (streptomycin 100 µg/mL; penicillin 100 IU/ml) and 10% FCS and then incubated at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator.

Thymocytes stimulated with Cdc venom and monocytes experimental culture

Thymocytes actively dividing (25×10^5 cells) from cultures stimulated with Cdc venom (20 ng/well) were added to cultured monocytes freshly obtained from Ficoll-Hypaque separation (1×10^5 cells/ 200 µl per well) in a plate. Both cell populations were incubated with MEM 10% FCS at 37°C and 5% CO₂ for 36 h until monocytes matured to macrophages.

Monocyte/macrophage function assay for uptake of Chinese ink

Monocyte/macrophage cultures stimulated with NTCdc and medium with Chinese ink (10 µl/ml) were included on the culture plate, which was then incubated for another 6 h. The cells were observed under the light microscope and then the cells cultured were tested.

Ethical statement

Experienced staff prepared all the experimental assays involving the use of live animals, which were authorized by the Institute of Anatomy Ethical Committee at *Universidad Central de Venezuela* on March 17, 2019 (minutes 17-03-19). The assays followed the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the U.S. National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) (8).

Proliferative effect of *Cdc* venom on naïve Thymocytes cells

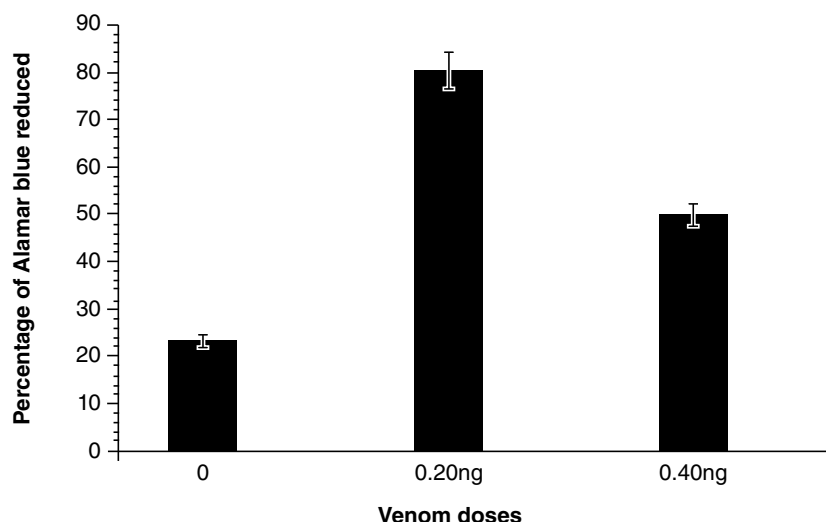


Figure 1. Naïve thymocytes were cultured at 1×10^6 cells with and without *Crotalus durissus cumanensis* venom using 0.20 and 0.40 ng doses. *Crotalus durissus cumanensis* venom (0.20 ng and 0.40 ng)** caused a significant increase in the proportion of naïve t-cells when compared to the control group (0).

** $p < 0.01$

Table 1. *Crotalus durissus cumanensis* venom effect on thymus cells proliferation

Venom (ng/well)	<i>C. d. cumanensis</i>
	% of AlamarBlue™ reduced $\pm$ SD
0	23.3 $\pm$ 1.6
0.2	80.3 $\pm$ 2.4
0.4	49.6 $\pm$ 2.7

SD: Standard deviation

Results

The *Cdc* venom effects on the proliferation of thymus naïve cells

Naïve thymus cells exposed for 1 h to sub-lethal doses (20 ng) of *Cdc* venom generated a significant cellular increase of 248.67% compared to the control. This increase using a 40 ng dose decreased to 112.8% compared to the control (figure 1 and table 1); nevertheless, a proliferative effect at 40 ng dose was still observed compared to the control, which suggests that when the dose of *Cdc* venom is increased, the proliferative effect in thymocytes tends to decrease.

A substantial proportion of the monocytes cells stimulated by *Cdc* venom (NT*Cdc*) promoted the differentiation to mature macrophages. When cultured in medium solo (normal controls) for 36 h, <18% of monocytes stayed alive, and of those <20% differentiated into macrophages (figure 2). Survival was significantly improved by the addition of naïve thymus cells stimulated by *Cdc* venom ($p < 0.01$) (figure 1 and table 1). The activity of *Cdc*-venom stimulated naïve thymus cells induced monocytes to differentiate into macrophages characterized by initial morphological and functional changes towards stellate cells adhered to the plastic of the culture plate. Some cells fused and transformed into multinucleated cells (giant cells) with a high capacity to

phagocyte particles of Chinese ink (figure 2). Roughly 95% of cell cultures were identified morphologically as monocytes by Wright-Giemsa staining. These cells were also specially stained with markers for nonspecific esterases, markers which were engaged in the monocytes and then differentiated into macrophages subsequently utilized in fresh and mature monocytes for the recognition of monocyte-macrophage cell populations. Morphologically, monocytes began to mature into macrophages soon after they were placed in culture with NTCdc. The analysis of monocytes sections in the plates showed that cell suspensions exhibited some big significant central nuclei bordered by a fine layer of cytoplasm. When the NTCdc cells were added to the cultures, they changed rapidly in the culture (12 h) while nuclei adopted no central location in the cell and cytoplasm augmented in dimensions. Multiple cytoplasm extensions appeared on cell surfaces and subcellular structures such as lysosomes, mitochondria, smooth endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus became conspicuous. At 36 h, the macrophages had increased ~6-fold and several phagocytic vesicles were noticed; also, many of these cells had fused to become multinucleated (giant) cells.

Monocyte/macrophage function assay for uptake of Chinese ink

We carried out the Chinese ink uptake test on day 2 of culture. Most of the cells were positive for Chinese ink uptake demonstrating that they preserved their monocyte/macrophage function during the course of the *in vitro* culture (9) (figure 2).

Discussion

The thymus gland is a supplier of immunocompetent cells mainly during the neonatal period (10,11). Naïve thymocytes change their character and develop the ability to transform in T-lymphocytes. T cells migrate to the periphery and enter the naïve T cell compartment after being selected as positive and negative in the thymus. In the circulatory system, naïve T cells uninterruptedly recirculate between secondary lymphoid organs and plasma via the lymphatic system. When these cells come across and interact with related antigens in the circulatory system, naïve T cells multiply and differentiate into dissimilar types of effector and memory T cells. The naïve T cell section must preserve a large number of cells with unique T cell receptors (TCRs) in a restricted location (4). It is in this space that the *Cdc* venom presumably acts in its mitotic stimulation effect.

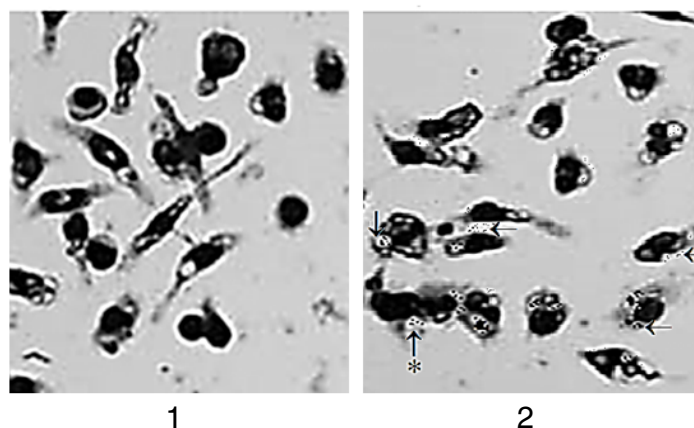


Figure 2. Macrophage cultures. (1) Normal control cells. (2) Macrophage with Chinese ink phagocytized (arrows); multinucleated (giant) cell with Chinese ink phagocytized (arrows + asterik). 100X

Previous histopathological studies of mice thymus have exhibited a patent deficiency of lymphocytes in lymphoid organs (12) developing a defective immune reactivity. Therefore, the thymus is in charge of the maturation and selection of immunologically competent small lymphocytes (13). These thymus cells are involved in the general immune responses (10). It is known that small lymphocytes are the cells responsible for protecting the animal organism against extraneous antigens circulating in the circulatory system (14). Contact with the *Cdc* venom stimulated a strong NTCdc mitotic activity resulting in an increased cell division in the *in vitro* cultures. It has been demonstrated *in vivo* that the contact with some antigens causes an increase in lymphopoiesis in the peripheral lymphoid organs (11,15) resulting in the mitosis and unexpected reproduction of naïve thymocytes, which later were able to stimulate monocytes maturation into macrophages.

The proportion of macrophages can influence the host's response to tumors, infections, and immune diseases (16,17). In this sense, we describe here the NT/*Cdc*-mediated maturation of mice monocytes into mature and activated macrophages. The resulting cells were characterized phenotypically by their morphological changes ranging from monocytes rounded cells to stellate macrophage cells with multiple extensions and the functional capacity to mediate augmented endocytosis and phagocytizing particles of Chinese ink. We compared the phenotype and function of macrophages generated by the NTCdc action and found that the populations of normal monocytes and activated macrophages had dissimilar morphologies and generated macrophages with greater endocytic activity.

It is known that the Chinese ink uptake assay is used to estimate the phagocytic function of leukocytes/monocytes (18). But as it does not only express the phagocytic function of cells, it may similarly be used to validate the presence of "true macrophages" exhibiting monocyte/macrophage characteristics. Our results showed that the cells were positive for Chinese ink uptake and we observed that the stimulated macrophages kept their monocyte/macrophage performance throughout the time of the *in vitro* culture (18).

We think that NTCdcs have played an important role in the general process of monocyte differentiating into macrophages. The similarity between monocytes stimulated by T-cell immune responses and NTCdc-stimulated macrophages suggests that there must be various regulatory pathways mediating the differentiation of monocytes into macrophages. Some of these pathways have been previously identified in studies of murine monocytes cell lines (19-22).

Thymus involution is the main causal factor of the reduction of the immune response with age since aging produces a gradual decrease in the structural integrity of the thymus (1) finally taking to a stable deterioration of undifferentiated T-cell production and an incomplete range of T-cell receptor (TCR) cells. Many of these cells turn into immune memory cells producing an augmented risk of severe immune deficiency due to the lack of naïve T-cells.

Thymocyte cell transplant could represent an applicable way to overhaul the immune system and re-establish its performing actions. However, the central impediment is an absence of supplies for these specific cells (1). Thymus deprivation results in serious diseases due to the absence of a suitably operating immune system. Cells resulting from adult thymus contributors do not have similar results, as the gland expires with age. We propose, therefore, that the purification of the *Cdc* venom fraction (s) may have the potential to stimulate the small population of naïve thymocytes left in

the adult thymus and induce their proliferation, which, in its turn, would induce the rescue of undifferentiated T-cells the production leading to a normalization of the TCR cells repertoire. The use of this method would be promising to aid newborn infants lacking the thymus, as well as aged individuals.

In conclusion, we propose here that naïve thymocytes rapidly proliferate when stimulated with *Cdc* venom and, subsequently, the NTCdc regulates the rapid maturation and function of monocytes progenitor cells.

References

1. Markert ML, Devlin BH, Chinn IK, McCarthy EA. Thymus transplantation in complete DiGeorge anomaly. *Immunol Res*. 2009;44:61-70. <https://doi.org/10.1007/s12026-008-8082-5>
2. Hernández-Cruz S, García-Jiménez R, Zucatelli-Mendonça A, Petricevich VL. Pro- and anti-inflammatory cytokines release in mice injected with *Crotalus durissus terrificus* venom. *Mediators Inflamm*. 2008;2008:874962. <https://doi.org/10.1155/2008/874962>
3. Holland AM, van den Brink MR. Rejuvenation of the aging T cell compartment. *Curr Opin Immunol*. 2009;21:454-9. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.06.002>
4. van den Broek T, Borghans JAM, van Wijk F. The full spectrum of human naive T cells. *Nat Rev Immunol*. 2018;18:363-73. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0001-y>
5. van den Brink MR, Velardi E, Perales MA. Immune reconstitution following stem cell transplantation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2015;2015:215-9. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2015.1.215>
6. Tominaga K, Kinoshita Y, Hato F, Masudá A, Matsuyama M. Effects of cholinergic agonists on the proliferation and protein synthesis in a cultured thymic epithelial cell line. *Cell Mol Biol*. 1989;35:679-86.
7. Chang C. Looking back on the discovery of alpha-bungarotoxin. *J Biomed Sci*. 1999;6:368-75. <https://doi.org/10.1007/BF02253668>
8. National Research Council (US) Institute for Laboratory Animal Research. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, D.C.: National Academies Press; 1996.
9. Stadnyk AW, Befus AD, Gauldie J. Characterization of nonspecific esterase activity in macrophages and intestinal epithelium of the rat. *J Histochem Cytochem*. 1990;38:1-6. <https://doi.org/10.1177/38.1.1688447>
10. Nakul-Aquarone D, Bayle J, Frelin C. Coexpression of endothelial markers and CD14 by cytokine mobilized CD34+ cells under angiogenic stimulation. *Cardiovasc Res*. 2003;57:816-23. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(02\)00776-9](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(02)00776-9)
11. Gowans JL, Gesner BM, McGregor DD. The immunological activity of lymphocytes. In: Wolstenholme GEW, O'Connor M, editors. *Biological activity of the leucocyte*. London, England: Ciba Foundation Study Group; 1961. p. 32.
12. Miller JFAP. Effect of neonatal thymectomy on the immunological responsiveness of the mouse. *Proc Roy Soc London*. 1962;156B:410-28.
13. Miller JFAP. Immunological function of the thymus. *Lancet*. 1961;2:748-9. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(61\)90693-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(61)90693-6)
14. Miller JFAP. Aetiology and pathogenesis of mouse leukaemia. *Adv Cancer Res* 1961;6:291-368. [https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(08\)60623-5](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60623-5)
15. Beard J. The source of leucocytes and the true function of the thymus. *Anat Anz*. 1990;18:550-60.
16. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:953-64. <https://doi.org/10.1038/nri1733>
17. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:723-37. <https://doi.org/10.1038/nri3073>
18. Muftuoglu TM, Koksall N, Ozkutlu D. Evaluation of phagocytic function of macrophages in rats after partial splenectomy. *J Am Coll Surg*. 2000;191:668-71. [https://doi.org/10.1016/s1072-7515\(00\)00739-0](https://doi.org/10.1016/s1072-7515(00)00739-0)
19. Bredenkamp N, Nowell CS, Blackburn CC. Regeneration of the aged thymus by a single transcription factor. *Development*. 2014;141:1627. <https://doi.org/10.1242/dev.103614>

20. Rosenblum MD, Gratz IK, Paw JS, Abbas AK. Treating human autoimmunity: current practice and future prospects. *Sci Transl Med*. 2012;4:125sr1.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003504>
21. Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, *et al*. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasclogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:288-93.
<https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000114236.77009.06>
22. Vergadi E, Ieronymaki E, Lyroni K, Vaporidi K, Tsatsanis C. Akt signaling pathway in macrophage activation and M1/M2 polarization. *J Immunol*. 2017;198:1006-14.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601515>

Artículo original

Niveles de micronutrientes en niños escolares colombianos e inseguridad alimentaria

Constanza Marín¹, Henry Oliveros¹, Eduardo Villamor², Mercedes Mora³

¹ Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Chía, Colombia

² Escuela de Salud Pública, Departamento de Epidemiología, Universidad de Michigan, Ann Arbor, Estados Unidos

³ Fundación para investigación en Salud y Nutrición, Bogotá, Colombia

Introducción. La mitad de los hogares colombianos padecen inseguridad alimentaria. Esta se ha asociado con malnutrición, la que, según algunos estudios, podría reflejarse en un déficit de micronutrientes en los niños, aunque los datos no son concluyentes.

Objetivo. Establecer la asociación entre la inseguridad alimentaria y los niveles de hemoglobina, hierro, vitamina A, vitamina B12, folato y cinc, en escolares de Bogotá.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio de corte transversal. Se aplicó la escala del *Household Food Security Survey Module* (HFSSM) validada en español en una muestra de hogares de escolares de Bogotá, para establecer la prevalencia de inseguridad alimentaria. Utilizando el índice de propensión, se exploró la asociación entre la inseguridad alimentaria, el hambre grave y las concentraciones de hierro, vitamina A, folato, vitamina B12 y cinc, estimadas en muestras de suero provenientes de los escolares.

Resultados. Se incluyeron 2.660 escolares. En el 76 % de los hogares había inseguridad alimentaria, de los cuales el 11,6 % se clasificaba como inseguridad alimentaria con hambre grave. La deficiencia marginal de vitamina B12 fue del 17 % y las de vitamina A y cinc, de 14 y 1,4 %, respectivamente. Aunque se encontraron niveles promedios más bajos de vitamina A (-0,009 µmol/L; IC95% -0,13 - 0,03 µmol/L), vitamina B12 (-19,57 pmol/L; IC95% -72,55 - 29,94 pmol/L) y folato (-9,25 nmol/L; IC95% -29,55 - 18,66 nmol/L) en los niños expuestos a inseguridad alimentaria con hambre grave, al compararlos con los de los no expuestos, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Conclusiones. La inseguridad alimentaria con hambre grave no se asoció los valores de micronutrientes o sus deficiencias en los escolares. La escala del HFSSM mide adecuadamente la dificultad en la adquisición de alimentos por falta de recursos, pero no permite establecer una asociación con las concentraciones de micronutrientes.

Palabras clave: micronutrientes; seguridad alimentaria y nutricional; escolares; niño; Colombia.

Food Insecurity and micronutrient status biomarkers in school-age Colombian children

Introduction: Half of the Colombian households experience some degree of food insecurity. Food insecurity has been associated with malnutrition, which could result in micronutrient deficiencies in children; however, the evidence is not conclusive.

Objective: To examine the associations between food insecurity and blood concentrations of hemoglobin, ferritin, vitamin A, vitamin B12, folate, and zinc in school-age children from Bogotá, Colombia.

Materials and methods: We conducted a cross-sectional study among 2,660 children aged 5-12 from Bogotá's public schools. We assessed their household food insecurity level with the Spanish version of the Household Food Security Survey Module (HFSSM), a validated scale, and quantified blood biomarkers of iron, vitamin A, folate, vitamin B12, and zinc status. We examined the associations between food insecurity, severe hunger, and micronutrient status biomarkers using propensity scores.

Results: Three-quarters of households had some degree of food insecurity and 12 % had food insecurity and severe hunger. Prevalence of marginal vitamin B12 status and vitamin A and zinc deficiencies were, respectively, 17%, 14%, and 1.4%. Compared with children from households without severe hunger, those exposed to it had lower adjusted mean concentrations of vitamin A, vitamin B12, and folate, but these differences were not statistically significant.

Conclusion: Food insecurity with severe hunger was not associated with micronutrient status biomarkers in Colombian school-age children. The HFSSM may adequately measure hardship in food acquisition due to lack of resources, but it does not yield an index that is associated with micronutrient status biomarkers.

Keywords: Micronutrient; food and nutrition security; schoolchildren; child; Colombia.

Recibido: 30/10/2020

Aceptado: 08/04/2021

Publicado: 23/04/2021

Citación:

Marín C, Oliveros H, Villamor E, Mora M. Niveles de micronutrientes en niños escolares colombianos e inseguridad alimentaria. *Biomédica*. 2021;41:458-71. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5866>

Correspondencia:

Constanza Marín Lizarazo, Facultad de Medicina, Universidad de La Sabana, Campus del Puente del Común, Km 7 Autopista Norte de Bogotá, Chía, Colombia
Teléfono: (571) 861 5555, extensión 23205
constanza.marin@unisabana.edu.co

Contribución de los autores:

Eduardo Villamor: diseño y conducción del estudio
Henry Oliveros y Mercedes Mora: conducción del estudio
Constanza Marín y Henry Oliveros: análisis estadísticos y escritura del manuscrito.

Financiación:

Este trabajo fue apoyado por el Fondo de Investigación ASISA de la Universidad de Michigan.

Conflicto de intereses:

Los autores declaramos que no tenemos conflicto de intereses.

Existe seguridad alimentaria “cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico, social y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias en cuanto a los alimentos a fin de llevar una vida activa y sana” (1), por lo que la inseguridad alimentaria se define como la disponibilidad limitada de alimentos nutricionalmente adecuados e inocuos en formas socialmente aceptables o la capacidad incierta para adquirirlos (2). Esta se ve influenciada por factores de orden social y económico, como el desempleo, la inequidad social, el desplazamiento forzado, la infraestructura vial, el inadecuado uso de las tierras para fines diferentes a la agricultura y la publicidad que favorece el consumo de productos alimenticios de bajo perfil nutricional, especialmente en los países en vías de desarrollo (3-7). Algunos de los métodos para medir la inseguridad alimentaria son la evaluación antropométrica, las entrevistas sobre ingestión alimentaria individual (recordatorio de 24 horas y frecuencia de consumo de alimentos) y las escalas de percepción de la seguridad alimentaria en el hogar, siendo estas últimas el método más utilizado (2,8,9). La primera de estas escalas, la del módulo HFSSM (*Household Food Security Survey Module*) del *United States Department of Agriculture* (USDA), se originó en los años 90 en Estados Unidos; ha sido adaptada y validada en diferentes países, incluido Colombia, y ha demostrado caracterizar adecuadamente la inseguridad alimentaria en las poblaciones en las que se ha aplicado (2,10-15). Sin embargo, en algunos estudios realizados en el país se ha sugerido que debe tenerse cuidado al interpretar sus resultados, pues podrían dar lugar a subestimar el fenómeno cuando se compara con medidas objetivas que evalúan el consumo de energía y los nutrientes (16-18).

Con esta herramienta, según la Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia del 2015, se estimó que el 54,2 % de los hogares en Colombia estaba expuesto a algún grado de inseguridad alimentaria, lo que significa que más de la mitad de la población no tenía los suficientes recursos económicos para acceder a alimentos de buena calidad nutricional (son los más costosos del mercado), lo que puede aumentar las probabilidades de que se presenten problemas de malnutrición en los hogares donde hay niños, situación que ya se ha reportado en varios estudios mediante mediciones antropométricas que han evidenciado casos de desnutrición o sobrepeso tanto en niños como en adultos en situación de inseguridad alimentaria (3,11,19-23).

Frecuentemente, estos estados de malnutrición, especialmente en la población infantil, se han asociado con déficit de micronutrientes, lo que influye negativamente en su crecimiento y desarrollo, ya que muchos están relacionados con funciones estructurales, neurológicas e inmunológicas y como coadyuvantes en reacciones enzimáticas del organismo. Se ha determinado que micronutrientes como el hierro, la vitamina A, la vitamina B12 y el cinc son críticos en la infancia. Su medición ayuda a comprender el fenómeno denominado “hambre oculta” (déficit de vitaminas y minerales), que es el resultado de la ingestión inadecuada de los alimentos que los proveen (carnes, lácteos, frutas y verduras). Esto no solo se ve en casos de desnutrición, sino también en individuos con exceso de peso, en quienes hay un alto consumo calórico pero una baja ingestión de micronutrientes esenciales. Las deficiencias de micronutrientes desencadenan problemas de salud como trastornos de visión o de la piel y deterioro del sistema inmunitario (déficit de vitamina A), así como anemia ferropénica, disminución del rendimiento académico y deficiencias en el aprendizaje, y una mayor propensión a infecciones (déficit de hierro), anemia megaloblástica o alteraciones neurológicas (déficit de vitamina B12), alteraciones en la síntesis de ADN y ARN (déficit de folato) o retraso en el

crecimiento y la maduración sexual, y alteraciones del sistema inmunitario por deficiencia de cinc (19,24-27).

Aunque en Colombia se han diseñado políticas para reducir la prevalencia de las deficiencias de micronutrientes, como la fortificación de la harina de trigo con hierro y vitaminas del complejo B (28). Dichas deficiencias continúan siendo importantes debido a las desfavorables condiciones socioeconómicas de las familias y a la transición nutricional, lo cual, sumado a los estilos de vida que favorecen el sedentarismo, ha incrementado las prevalencias de sobrepeso y obesidad (5,19).

Se ha observado que las familias con inseguridad alimentaria tienen patrones de alimentación caracterizados por el bajo consumo de proteína animal (11,29), por lo que es probable que no se cubran en su totalidad las necesidades nutricionales de sus integrantes y ello se refleje en las concentraciones de micronutrientes en sangre. Por ello, en diversos estudios los esfuerzos se han enfocado en estudiar si la inseguridad alimentaria se asocia con los déficits de micronutrientes y en algunos se ha demostrado que tal asociación existe. Tal es el caso de dos estudios realizados en Estados Unidos con lactantes y niños de 12 a 15 años, otro en Nicaragua en niños de 3 a 11 años, y otro en México en mujeres de 20 a 49 años, en quienes se observó anemia cuando estaban expuestas a inseguridad alimentaria (29-32). En una revisión sistemática que analizó tres estudios en niños menores de 5 años en Etiopía, se obtuvieron resultados similares (33). Sin embargo, en otros estudios en niños y adolescentes menores de 19 años no se encontró esa asociación, aunque hay que tener en cuenta que en estos se analizaron otros micronutrientes (20,32,34-36).

Dadas las altas prevalencias de inseguridad alimentaria en Colombia y sus efectos deletéreos en el estado nutricional de la población infantil y el hecho de que los estudios previos no han sido muy concluyentes, el objetivo del presente estudio fue establecer la asociación entre la inseguridad alimentaria, evaluada mediante la escala del HFSSM, y los niveles de micronutrientes reconocidos como marcadores de malnutrición infantil, en una muestra representativa de escolares pertenecientes a los colegios públicos de Bogotá.

Materiales y métodos

Se hizo un estudio de corte transversal con componente analítico a partir de datos provenientes de la cohorte de escolares de Bogotá conformada en febrero del 2006 mediante el reclutamiento aleatorio de 3.202 niños de 5 a 12 años que estudiaban en las escuelas públicas de Bogotá y pertenecían a los estratos socioeconómicos medio y bajo. En el inicio del reclutamiento, se pidió a los padres responder un cuestionario en el que se recolectó información sobre las características sociodemográficas y la escala de seguridad alimentaria de los hogares; también, se tomaron las mediciones antropométricas y muestras de sangre a los niños, que fueron transportadas y almacenadas en el Instituto Nacional de Salud siguiendo los protocolos previamente establecidos. Los detalles sobre los procedimientos para la toma de la muestra y los métodos utilizados para la determinación de los micronutrientes pueden encontrarse en publicaciones previas referentes a esta cohorte (37,38). El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, en tanto que el Comité de Ética de la Universidad de Michigan aprobó el uso de los datos del estudio (11,37).

Evaluación de la inseguridad alimentaria

Se utilizó la escala del HFSSM en la versión validada en español (39). Esta escala se basa en la idea de que hay diferentes grados de seguridad alimentaria y una secuencia ordenada de condiciones y comportamientos, lo que resulta en patrones en los que la respuesta afirmativa a una pregunta particular tiende a condicionar a los encuestados para responder de la misma manera todas aquellas preguntas que dan una calificación en la escala; la suma de estas respuestas afirmativas permite caracterizar la inseguridad alimentaria. Según el grado de dicha inseguridad en el hogar, se puede establecer cuán afectada se ve la consecución de alimentos por falta de recursos y cómo ello genera modificaciones en el tipo, cantidad y calidad de la dieta, lo que en su fase más grave afecta no solamente a los adultos, sino también, a los niños (10).

La escala consta de 16 preguntas que se refieren a los 30 días previos a su aplicación y permite clasificar la inseguridad alimentaria en cuatro niveles: 1) seguridad alimentaria, es decir, hogares en que no la hay o esta es mínima (entre 0 y 2 respuestas afirmativas); 2) inseguridad alimentaria sin hambre, cuando esta es evidente y es posible observar reducción en la calidad de la dieta, acompañada o no de la reducción en la cantidad de alimentos ingeridos (entre 3 y 7 respuestas afirmativas); 3) inseguridad alimentaria con hambre moderada, cuando la ingestión de alimentos en los adultos se reduce y con frecuencia experimentan hambre debido a la falta de recursos para proveerse de alimentos, pero los niños, cuando los hay, aún no experimentan esta situación (entre 8 y 12 respuestas afirmativas), y 4) inseguridad alimentaria con hambre grave, es decir, cuando la ingestión de los niños también se ve reducida y llegan a experimentar hambre; en esta categoría, sea en hogares con o sin niños, los adultos experimentan en mayor medida la reducción en la ingestión de alimentos (con la omisión de alguna comida o varias durante el día) (entre 13 y 16 preguntas afirmativas) (10,11,40).

Análisis estadístico

Se consideraron como resultados positivos, la presencia de anemia y las deficiencias de micronutrientes (hierro, vitamina A, vitamina B12, folato y cinc). La concentración de hemoglobina para establecer la anemia fue por debajo de 12,7 mg/dl para este grupo de edad, es decir, 11,5 mg/dl más 1,2 mg/dl, correspondientes al ajuste por la altura de 2.500 m (41). El déficit de hierro se determinó a partir de valores de ferritina menores de 15 µg/L si la proteína C reactiva tenía valores de 10 µg/L o menos. Las concentraciones de retinol menores de 0,7 µmol/L se establecieron como deficiencia de vitamina A. La deficiencia marginal de vitamina B₁₂ correspondió a valores por debajo de 222 pmol/L y, como deficiencia de folato y cinc, los valores de referencia fueron menos de 305 nmol/L y menos de 65 µg/dl, respectivamente (3,36,42).

Después de explorar varios puntos de corte, se encontró que el que separaba la inseguridad alimentaria con hambre grave de los demás grados, correspondía al que mejor discriminaba esta exposición, por lo cual, de acuerdo con el puntaje obtenido en la escala HFSSM, se definió que el grupo no expuesto sería aquel que agrupaba las categorías de seguridad alimentaria, inseguridad alimentaria sin hambre e inseguridad alimentaria con hambre moderada, mientras que el grupo expuesto sería la categoría de inseguridad alimentaria con hambre grave, pues es en este nivel en donde los niños se ven más afectados y experimentan una reducción de la ingestión y de la sensación de hambre.

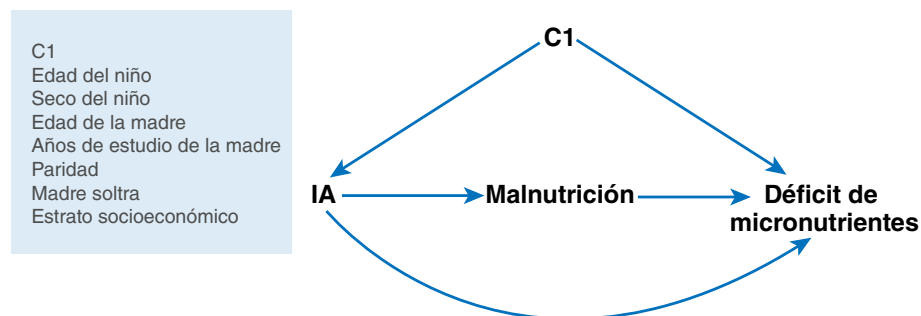


Figura 1. Gráfico acíclico dirigido (*Directed Acyclic Graph, DAG*) de la asociación entre inseguridad alimentaria y déficit de micronutrientes

Se recolectó la información sociodemográfica y antropométrica de todos los niños: edad y educación de la madre, condición de madre soltera, si la casa era propia y el estrato socioeconómico; edad del niño, sexo, indicador de la talla para la edad e índice de masa corporal (IMC). Estos últimos incluían como variables el cálculo de los puntajes Z del IMC y la talla para la edad, según la referencia para niños y adolescentes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (43). Según el IMC para la edad, el bajo peso correspondió a un puntaje Z por debajo de -1, el peso adecuado, a uno entre ≥ -1 y ≤ 1 , el sobrepeso, a uno entre >1 a ≤ 2 , y la obesidad, a uno $>$ de 2; el retraso en el crecimiento se definió como un puntaje z menor de -2 (44,45).

En la figura 1 se representa la relación de las variables sociodemográficas y antropométricas con la inseguridad alimentaria, el de déficit de micronutrientes y el probable efecto de confusión que ejercen en su asociación. Para comparar el grupo de expuestos y el de no expuestos con el déficit de micronutrientes, y dado el posible desequilibrio en las características basales de cada grupo, estas se equilibraron mediante el índice de propensión (46). Para controlar las variables de confusión, se determinó el índice de propensión de la probabilidad de estar expuesto a la inseguridad alimentaria con hambre grave a partir de las características sociodemográficas y antropométricas, con el fin de obtener el equilibrio de las características basales del grupo no expuesto (seguridad alimentaria, inseguridad alimentaria sin hambre y con hambre moderada) y del expuesto (inseguridad alimentaria con hambre grave).

A continuación, se determinó la zona de soporte común para establecer el rango de valores del índice de propensión en el cual coincidían los niños expuestos a la inseguridad alimentaria con hambre grave y los no expuestos (figura 2), con el fin de disminuir las diferencias de las características basales entre los dos grupos. En el paso siguiente, se hizo el emparejamiento utilizando el método de distancia máxima de calibración (0,005) para asignar los individuos no expuestos a cada uno de los individuos expuestos. Según el biomarcador analizado, el número total de niños seleccionados estuvo entre 2.268 y 2.357 de la muestra inicial de 2.660 niños (figura 3). A continuación, se evaluó el adecuado equilibrio entre las características de los dos grupos a partir de las diferencias estandarizadas y el índice de Rubin (47,48). Por último, se calculó el efecto del tratamiento en los tratados (*Average Treatment effect on the Treated, ATT*) mediante la prueba *t* de Student para variables continuas con un intervalo de confianza del 95 % y, así, determinar la diferencia de los niveles de micronutrientes entre los expuestos a inseguridad alimentaria con hambre grave y los no expuestos. Todos los análisis se hicieron con el programa estadístico Stata 14.

Resultados

El promedio de edad de los niños fue de 8,7 ($\pm 1,8$) años, el 49,6 % eran niñas, alrededor de la cuarta parte eran madres solteras y la mayoría no tenía casa propia (cuadro 1). En cuanto al estado nutricional de los niños, se encontró una mayor prevalencia de exceso de peso (cerca de 19 %) comparado con el bajo peso (12,5 %). Por otra parte, el retraso en la talla se presentó en el 9,7 % de la población. Como se observa en el cuadro 2, la deficiencia marginal de vitamina B12 fue la más prevalente en esta población (17 %), la deficiencia de vitamina A se encontró en un 14 %, en tanto que la de micronutrientes como el cinc y el folato registraron las menores prevalencias; de este último solo se registraron dos casos de niños con concentraciones menores de 305 nmol/L.

En el 75,9 % de las familias, se registraba algún nivel de inseguridad alimentaria: la más prevalente fue aquella sin hambre, con un 46,5 %, en tanto que con hambre moderada y grave se registró en el 17,8 y el 11,6 %, respectivamente.

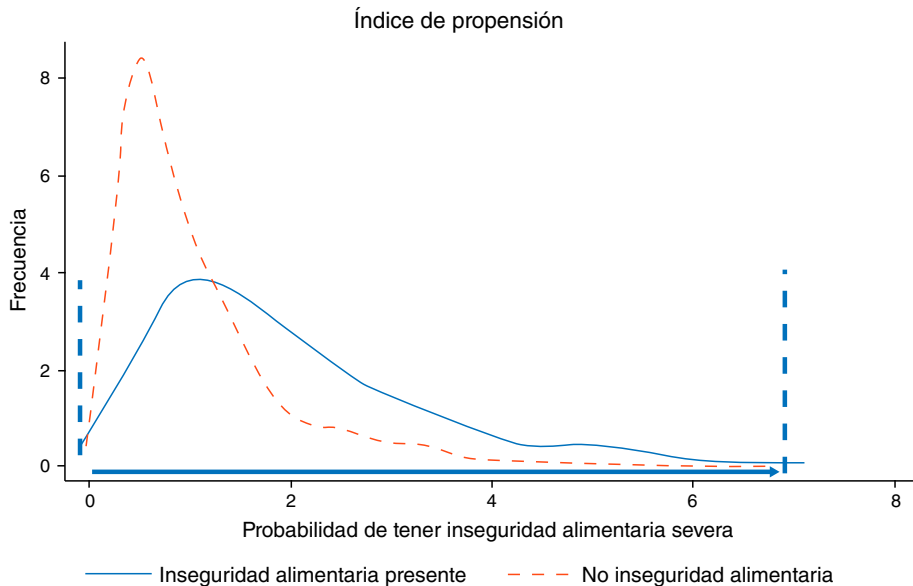


Figura 2. Zona de soporte común para garantizar probabilidades similares en el grupo de los expuestos (inseguridad alimentaria con hambre grave) y el de los no expuestos (seguridad alimentaria, inseguridad alimentaria sin hambre e inseguridad alimentaria con hambre moderada)

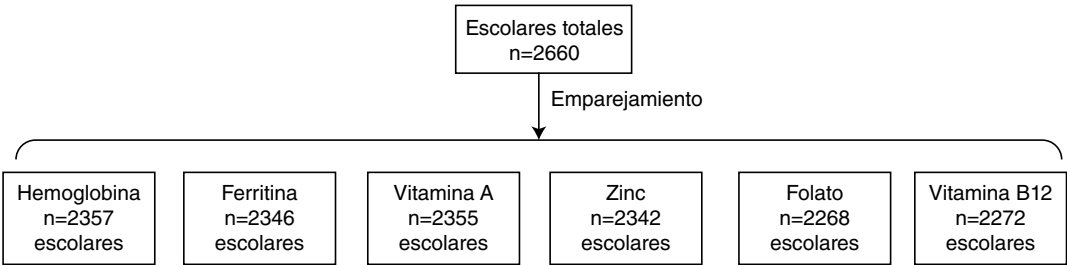


Figura 3. Reducción del número de la muestra después de emparejar

Cuadro 1. Características generales de los escolares participantes en el estudio en el 2006 según grupo de expuestos y no expuestos

Característica		Total	No expuestos	Expuestos	**p
Edad del niño, años	Media (ds)	8,7 (1,8)	8,7 (1,8)	9,0 (1,9)	0,99
Sexo, niña	% (n)	49,6 (1319)	49,2 (1157)	52,4 (162)	0,28
Retardo en talla, Talla/edad	% (n)	9,7 (250)	9,1 (207)	14,1 (43)	0,01
IMC niño, IMC/edad					0,04
Bajo peso	% (n)	12,4 (321)	12,0 (274)	15,5 (47)	
Adecuado	% (n)	68,9 (1778)	68,9 (1568)	69,3 (210)	
Sobrepeso	% (n)	14,5 (373)	14,9 (338)	11,6 (35)	
Obesidad	% (n)	4,1 (107)	4,2 (96)	3,6 (11)	
Hemoglobina g/dl	Media (ds)	14,5 (1,2)	14,5 (1,2)	14,5 (1,1)	0,32
Ferritina µg/L	Media (ds)	42,2 (23,1)	42,2 (23,0)	42,1 (24,1)	0,49
Vitamina A µmol/L	Media (ds)	1,04 (0,35)	1,04 (0,35)	1,02 (0,33)	0,22
Cinc µg/dl	Media (ds)	41,6 (140,5)	41,5 (140,4)	42,3 (141,0)	0,58
Folato nmol/L	Media (ds)	858,5 (258,5)	860 (262,3)	847,2 (228,9)	0,21
Vitamina B12 pmol/L	Media (ds)	327,6 (106,4)	329,9 (107,1)	310,5 (99,8)	<0,01
Proteína C reactiva mg/L	Media (ds)	1,5 (2,6)	1,5 (2,7)	1,3 (1,9)	0,08
Edad de la madre, años	Media (ds)	26,6 (6,5)	26,4 (6,4)	28,1 (6,7)	1,00
Años de estudio madre	Media (ds)	8,7 (3,3)	8,9 (3,3)	7,1 (3,4)	<0,01
Número de hijos					<0,01
1	% (n)	11,6 (290)	12,6 (277)	4,4 (13)	
2	% (n)	35,7 (893)	37,5 (827)	22,5 (66)	
3	% (n)	30,3 (758)	30,3 (668)	30,9 (90)	
4	% (n)	12,7 (317)	11,6 (255)	21,2 (62)	
5	% (n)	9,6 (240)	8,1 (178)	21,2 (62)	
Madre soltera	% (n)	27,1 (675)	25,5 (561)	39,2 (114)	<0,01
Casa propia, no	% (n)	66,6 (1762)	65,2 (1524)	77,5 (238)	<0,01
Estrato socioeconómico	% (n)				<0,01
1	% (n)	7,0 (186)	6,6 (154)	10,4 (32)	
2	% (n)	32,3 (858)	31,6 (741)	37,9 (117)	
3	% (n)	53 (1407)	53,8 (1261)	47,3 (146)	
4	% (n)	7,6 (202)	8,0 (188)	4,5 (14)	
Inseguridad alimentaria (IA)					
Sin IA % (n)		24 (640)	-	-	
IA sin hambre % (n)		46,5 (1237)	-	-	
IA con hambre moderada % (n)		17,8 (474)	-	-	
IA con hambre grave % (n)		11,6 (309)	-	-	

** Análisis sin ajustar

Cuadro 2. Prevalencia de anemia y déficit de micronutrientes en los escolares participantes en el estudio en el 2006

Característica	Total	No expuestos	Expuestos	**p
Anemia (Hb <12,7 g/dl *)				0,95
Sí % (n)	3,5 (93)	3,5 (82)	3,6 (11)	
No % (n)	96,5 (2564)	96,5 (2266)	96,4 (298)	
Deficiencia de hierro				0,85
Sí % (n)	3,2 (82)	3,2 (73)	3,0 (9)	
No % (n)	96,8 (2514)	96,8 (2223)	97,0 (291)	
Deficiencia de vitamina A				0,93
Sí % (n)	13,9 (369)	13,9 (326)	14,1 (43)	
No % (n)	86,1 (2287)	86,1 (2024)	86 (263)	
Deficiencia de cinc				0,84
Sí % (n)	1,4 (38)	1,5 (34)	1,3 (4)	
No % (n)	98,6 (2599)	98,5 (2298)	98,7 (301)	
Deficiencia de folato				-
No % (n)	100 (2560)	100 (2257)	100 (303)	
Deficiencia marginal de vitamina B12				0,18
Sí % (n)	16,7 (427)	16,3 (369)	16,7 (58)	
No % (n)	83,4 (2138)	83,7 (1896)	80,7n (242)	

* Punto de corte ajustado por altura (41)

** Análisis sin ajustar

Una vez dicotomizada la variable de exposición, se hicieron análisis bivariados sin ajustar y se encontró que el retraso en el crecimiento y el bajo peso se asociaban a la inseguridad alimentaria con hambre grave, así como a las variables sociodemográficas de años de estudio de la madre, número de hijos, si se trataba de madres solteras, si la casa no era propia, y estrato socioeconómico, con valores de $p < 0,05$ (cuadro 1). Para el caso de los micronutrientes, no se encontró asociación entre su deficiencia y la inseguridad alimentaria con hambre grave, pero sí se observaron menores niveles de vitamina B12 en los niños expuestos a esta con hambre grave comparados con los no expuestos (310,5 Vs. 329,9 pmol/L; $p < 0,01$), en tanto que los niveles de los otros biomarcadores registraron valores de $p > 0,05$ (cuadros 1 y 2).

Utilizando el índice de propensión, se estimaron las probabilidades de estar expuesto a inseguridad alimentaria con hambre grave y de no estar expuesto, y se determinó la zona de soporte común que, como se puede observar en la figura 2, es amplia e incluyó a la mayoría de los niños, lo que indica que tanto el grupo expuesto como el no expuesto tenían características basales parecidas.

Como se observa en los cuadros 3 y 4, antes del emparejamiento todas las características basales de la población, excepto el sexo, se encontraban desequilibradas, pero una vez se emparejaron, se garantizó el adecuado equilibrio de las variables de confusión en el grupo expuesto y en el no expuesto para cada uno de los biomarcadores. Esto resultó en diferencias de medias estandarizadas de $< 10\%$ y valores del índice de Rubin que pasaron de 91 a < 7 para cada biomarcador.

Al estimar el ATT, se encontró que los niños expuestos a inseguridad alimentaria con hambre grave tenían menores niveles de hemoglobina, vitamina A, folato y vitamina B12 que los no expuestos; sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas al contrastar con los valores de $p > 0,05$ y con los intervalos de confianza, los cuales denotaban una gran imprecisión al ser muy amplios e incluir el cero, lo que anula la asociación (cuadro 5).

Cuadro 3. Variables seleccionadas antes y después del emparejamiento para hemoglobina, ferritina y vitamina A en los escolares participantes en el estudio en el 2006

Variable	Hemoglobina						Ferritina						Vitamina A					
	Antes del emparejamiento			Después del emparejamiento			Antes del emparejamiento			Después del emparejamiento			Antes del emparejamiento			Después del emparejamiento		
	IA + hambre grave	No expuesto	% DE	IA + hambre grave	No expuesto	% DE	IA + hambre grave	No expuesto	% DE	IA + hambre grave	No expuesto	% DE	IA + hambre grave	No expuesto	% DE	IA + hambre grave	No expuesto	% DE
Edad de la madre	28,2	26,4	27,4	28,1	28,3	-2,8	28,2	26,4	27,3	28,2	28,2	-0,6	28,5	26,4	27,8	28,1	28,1	-0,3
Madre soltera	0,4	0,3	30,2	0,4	0,4	1,1	0,4	0,2	30,8	0,4	0,4	0,5	0,4	0,3	30,3	0,4	0,4	0,6
Años de estudio de la madre	7,1	8,9	-54,1	7,2	7,2	1,3	7,1	8,9	-53,1	7,2	7,2	2	7,1	8,9	-53,0	7,3	7,3	-0,6
Número de hijos	3,3	2,6	60,5	3,3	3,2	2,6	3,3	2,6	59,7	3,3	3,2	2,4	3,3	2,6	61,2	3,3	3,3	1,4
Casa propia	0,2	0,3	-24,8	0,2	0,2	2	0,2	0,3	-24,5	0,2	0,2	-0,3	0,2	0,3	-24,3	0,2	0,2	1,8
Estrato socioeconómico	2,4	2,6	-26,1	2,5	2,5	-0,5	2,4	2,6	-25,8	2,5	2,4	2,7	2,4	2,6	-25,9	2,5	2,5	0,1
Sexo del niño	0,5	0,5	-7,7	0,5	0,5	-2,2	0,5	0,5	-8,8	0,5	0,5	-2,8	0,5	0,5	-8,2	0,5	0,5	-2,6
Edad del niño	9,0	8,6	21,3	9,0	9,0	-2,2	9,0	8,6	21,4	9,0	9,0	-0,2	9,0	8,6	21,8	9,0	9,1	-4,0
IMC niño	-0,06	0,17	-22,9	-0,05	-0,06	0,6	-0,07	0,17	-23,3	-0,06	-0,07	1	-0,07	0,17	-23,7	-0,06	-0,07	1,40
Índice de Rubin	91,7			6,5			91,2			5,8			91,5			5,9		

IA: inseguridad alimentaria

% DE: porcentaje de diferencias estandarizadas

Cuadro 4. Variables seleccionadas antes y después del emparejamiento para cinc, folato y vitamina B12 en los escolares participantes en el estudio en el 2006

Variable	Cinc						Folato						Vitamina B12					
	Antes del emparejamiento			Después del emparejamiento			Antes del emparejamiento			Después del emparejamiento			Antes del emparejamiento			Después del emparejamiento		
	IA + hambre grave	No expuesto	% DE	IA + hambre grave	No expuesto	% DE	IA + hambre grave	No expuesto	% DE	IA + hambre grave	No expuesto	% DE	IA + hambre grave	No expuesto	% DE	IA + hambre grave	No expuesto	% DE
Edad de la madre	28,2	26,4	27,4	28,2	28,1	0,9	28,3	26,4	28,1	28,2	28,0	2,0	28,3	26,4	28,7	28,2	28,1	1,9
Madre soltera	0,4	0,2	30,7	0,4	0,4	0,3	0,4	0,2	31,6	0,4	0,4	-0,2	0,4	0,2	29,9	0,4	0,4	1,3
Años de estudio, madre	7,1	8,9	-53,8	7,2	7,2	-0,4	7,1	8,9	-53,1	7,2	7,2	1,4	7,1	8,9	-51,6	7,2	7,2	2,1
Número de hijos	3,3	2,6	60,4	3,3	3,3	0,8	3,3	2,6	59,2	3,3	3,2	1,5	3,3	2,6	60,6	3,3	3,3	0,4
Casa propia	0,2	0,3	-24,5	0,2	0,2	1,5	0,2	0,3	-22,4	0,2	0,2	-0,3	0,2	0,3	-24,0	0,2	0,2	-0,8
Estrato socioeconómico	2,4	2,6	-25,6	2,5	2,5	0	2,4	2,6	-26,4	2,4	2,4	2,0	2,5	2,6	-24,4	2,5	2,5	0,4
Sexo del niño	0,5	0,5	-8,2	0,5	0,5	-2,2	0,5	0,5	-8,2	0,5	0,5	-2,4	0,5	0,5	-7,5	0,5	0,5	-1,6
Edad del niño	9,0	8,6	22,3	9,0	9,1	-2	9,0	8,7	20,6	9,0	9,0	-0,8	9,1	8,7	21,9	9,1	9,1	-3,1
IMC del niño	-0,07	0,17	-23,4	-0,06	-0,08	1,3	-0,06	0,17	-22,5	-0,05	-0,06	0,8	-0,06	0,17	-22,4	-0,05	-0,06	0,8
Índice de Rubin	91,6			3,8			90,5			4,5			90,0			4,7		

IA: inseguridad alimentaria

*% DE: porcentaje de diferencias estandarizadas

Cuadro 5. Efecto del tratamiento en los tratados (ATT) para cada biomarcador en los escolares participantes en el estudio en el 2006

Biomarcador	Media expuestos a IA + hambre grave	Media no expuestos	Diferencia	p	IC _{95%}
Hemoglobina	14,51	14,55	-0,04	0,36	-0,29 - 0,11
Ferritina	42,56	41,67	0,89	0,76	-5,80 - 4,28
Vitamina A	1,011	1,020	-0,009	0,27	-0,13 - 0,03
Cinc	141,69	139,31	2,38	0,71	-7,74 - 11,33
Folato	839,02	858,60	-19,57	0,29	-72,55 - 29,94
Vitamina B12	311,22	320,47	-9,25	0,65	-29,55 - 18,66

Discusión

En este estudio se exploró la asociación entre la inseguridad alimentaria y los niveles de micronutrientes en niños escolares de estrato socioeconómico medio y bajo; se observaron niveles un poco menores de vitamina A, folato y vitamina B12 en los niños con inseguridad alimentaria y hambre grave, comparados con quienes no estaban expuestos a esta o lo estaban, pero sin hambre o con hambre moderada. Sin embargo, esas diferencias no fueron estadísticamente significativas, por lo que no se logró establecer una asociación entre la inseguridad alimentaria con hambre grave y las concentraciones de los biomarcadores estudiados ni su deficiencia. Estos resultados concuerdan con lo encontrado en Brasil por Figueroa, en un estudio de corte transversal en niños preescolares en condiciones socioeconómicas vulnerables asistentes a jardines infantiles públicos, en quienes se establecieron los niveles de inseguridad alimentaria y los niveles séricos de retinol, hemoglobina y cinc mediante la Escala Brasileña de Inseguridad Alimentaria (EBIA); sus hallazgos no demostraron la asociación con ninguno de los biomarcadores a pesar de la alta prevalencia de inseguridad alimentaria en esa población (64,2 %) (35).

Resultados similares se presentaron en un estudio realizado en México con los datos sobre mujeres y adolescentes en edad fértil (15 a 49 años) recogidos en la Encuesta de Salud y Nutrición de ese país en el 2012. El objetivo era determinar la asociación entre la inseguridad alimentaria y la concurrencia de sobrepeso, obesidad y anemia. En las adolescentes no se encontró dicha asociación, pero en las mujeres adultas sí fue positiva en los casos de

inseguridad alimentaria leve o moderada, lo que concurrió con la asociación entre la alta probabilidad (*odd*) de anemia en este grupo y los ítems de la escala de seguridad alimentaria usada (ELCSA) relacionados con la calidad deficiente de la dieta. En cuanto a los resultados del grupo de las adolescentes, debe señalarse que en algunos estudios se ha comprobado que los padres tienden a proteger a los niños de los efectos de la inseguridad alimentaria disminuyendo su propio consumo de alimentos en favor de ellos (32).

En otro estudio en niños de 6 a 14 años de escuelas de bajos recursos de dos condados de China, se evaluó la asociación entre la inseguridad alimentaria y cuatro signos de malnutrición (anemia, retraso en el crecimiento, emaciación y raquitismo) y, aunque se encontró asociación (*odds ratio*, OR, de 3,08), cuando los cuatro signos se agruparon en una sola variable denominada malnutrición grave y se incluyeron en un modelo, esta asociación no se evidenció al realizar el análisis ajustado por cada signo de manera individual (20). Por último, en estudios previos basados en datos de la misma cohorte estudiada aquí analizados con un modelo de ecuaciones estructurales generalizadas (GEE), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas cuando se ajustó por las variables de confusión, aunque en los análisis univariados se reportaron niveles más bajos de vitamina B₁₂ en los niños expuestos a inseguridad alimentaria (36).

En contraste, aunque en nuestro estudio se reportaron mayores prevalencias de anemia en el grupo de escolares en condiciones de inseguridad alimentaria, pero sin asociación, en otro realizado en Estados Unidos a partir de los datos sobre niños y adolescentes (3-19 años) de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (NHANES) del período 1999-2004, sí se encontró asociación entre la inseguridad alimentaria y la presencia de anemia en el grupo de edad de 12 a 15 años (OR=2,95). No sucedió lo mismo en el grupo de 6 a 11 años, pues, a pesar de registrar un OR de 8, el intervalo de confianza fue muy amplio (IC_{95%} 2,07-31,36) y el número de casos era escaso, lo que explicaría que el resultado en el grupo de adolescentes pudo deberse a la gran demanda de hierro propia del crecimiento, especialmente en las niñas por la menarquía, así como a la influencia de factores ambientales y psicosociales (29).

Según los datos reportados en la Encuesta Nacional de la Situación Nutricional, ENSIN 2015, la población aquí analizada registró prevalencias de inseguridad alimentaria 22 puntos porcentuales por encima de las cifras nacionales (76 Vs. 54,2 %), en tanto que el déficit marginal de vitamina B₁₂ fue de más del doble (16,7 Vs. 6,8 %). La prevalencia de deficiencia de vitamina A, en cambio, fue la mitad de la registrada para el país (13,9 Vs. 27,3%) (19). En este sentido, aunque la reducción en la prevalencia de anemia y el déficit de hierro y folato frente a lo encontrado a nivel nacional se pueda explicar por la política de fortificación de la harina de trigo establecida en 1996 y la implementación de programas de refrigerios escolares desde el 2004, que también proveen hierro adicional (36,49), debe señalarse que tales deficiencias en la población infantil continúan siendo importantes y propician la aparición de condiciones médicas que afectan el crecimiento y el desarrollo adecuado de los niños (problemas de visión o en la piel, anemia ferropénica o megaloblástica, retraso en el crecimiento y alteraciones inmunológicas, neurológicas y en la síntesis de ADN) (24).

Se podía esperar que las altas prevalencias de inseguridad alimentaria estimadas con la escala aquí empleada se reflejarían en porcentajes más

altos de desnutrición en esta población, pero, por el contrario, se encontró un porcentaje mayor de niños con exceso de peso, y de peso adecuado en la gran mayoría, lo que se explicaría por la transición nutricional caracterizada por el consumo de alimentos de baja calidad nutricional que favorece la aparición de malnutrición y el consecuente aumento del componente adiposo en la composición corporal del individuo (50). Por ello la interpretación de los resultados de la escala debe ser cuidadosa, en especial, al establecer políticas públicas encaminadas a mitigar esta problemática, pues no permite medir este tipo de aspectos específicos (17,18).

Entre las limitaciones del estudio, cabe mencionar que los resultados solo corresponden a la población escolar de estratos socioeconómicos medio y bajo, por lo que no puede generalizarse a otros estratos ni grupos etarios eventualmente expuestos a algún grado de inseguridad alimentaria. Asimismo, se trató de un estudio de corte transversal en el que no fue posible determinar la causalidad entre dicha inseguridad y los niveles de micronutrientes, además de que el tiempo de evaluación de la inseguridad alimentaria (30 días) no fue suficiente para detectar las deficiencias de micronutrientes. En el caso de la vitamina A, por ejemplo, es importante considerar los hábitos alimentarios que afectan sus niveles porque esta población no acostumbra a consumir los alimentos que proveen este micronutriente.

El estudio también tiene algunas fortalezas: la información analizada provino de una cohorte establecida mediante un método de muestreo que garantizó la representatividad de la población específica de escolares de ingresos bajos y medios, aunque los datos eran del 2006. Cabe anotar que, aunque hay estudios similares, en su gran mayoría su análisis se restringe a la asociación con la anemia, pero no al déficit de otros micronutrientes como sí lo hace el nuestro, lo que le añade valor. Además, este es el primer estudio en nuestro medio que utilizó la metodología del índice de propensión, lo que permitió ajustar los análisis a partir de características basales de la población que pueden ser factores de confusión con respecto al efecto real de la inseguridad alimentaria con hambre grave en las concentraciones de los micronutrientes. Al equilibrar estos componentes en los dos grupos, se pudo determinar el efecto real, que, aunque no fue significativo, sí estableció diferencias en los niveles de algunos micronutrientes de los niños expuestos a inseguridad alimentaria con hambre grave frente a los no expuestos. Asimismo, debe señalarse que las variables equilibradas correspondían a aquellas que en otros estudios se han reportado como asociadas a la inseguridad alimentaria (3,11,21,22).

En conclusión, no se encontró una asociación entre la inseguridad alimentaria con hambre grave y la concentración de micronutrientes en la población escolar bajo estudio y, aunque sí se encontraron menores niveles de vitamina A, vitamina B12 y folato en los expuestos, dichas diferencias no fueron significativas. A pesar de que la escala de seguridad alimentaria mide adecuadamente la dificultad en la adquisición de alimentos por falta de recursos económicos, no necesariamente permite establecer una asociación con las concentraciones de micronutrientes, por lo que el método más preciso para su estimación es la medición de los niveles en sangre. Debe añadirse que la exposición a la inseguridad alimentaria por sí sola no es un factor que se asocie con las deficiencias de micronutrientes, pero probablemente la presencia de otros factores afecte sus niveles sanguíneos (enfermedades infecciosas, baja ingestión de los alimentos que los proveen y malabsorción

debida el bajo consumo de otros nutrientes o micronutrientes necesarios para un adecuado metabolismo). Dichos factores ameritan ser explorados en futuros estudios.

Referencias

1. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2019. Protegerse frente a la desaceleración y el debilitamiento de la economía. Roma; 2019. Fecha de consulta: 29 de marzo de 2021. Disponible en: <http://www.fao.org/3/ca5162es/ca5162es.pdf>
2. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Escala latinoamericana y caribeña de seguridad alimentaria (ELCSA): manual de uso y aplicaciones. Roma: FAO; 2012.
3. Ministerio de Protección Social, Instituto Colombiano de Bienestar Familiar, Instituto Nacional de Salud, Profamilia. Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia 2010. Bogotá; Da Vinci Editores & Cia; 2011.
4. Del Castillo S, Fonseca Z, Mantilla M, Mendieta N. Estudio para la medición de seguridad alimentaria y nutricional en el Magdalena medio colombiano. Caso Cesar. Revista de la Facultad de Medicina. 2012;6:S13-27.
5. Álvarez-Castaño LS, Pérez-Isaza EJ. Situación alimentaria y nutricional en Colombia desde la perspectiva de los determinantes sociales de la salud. Perspectivas en Nutrición Humana. 2013;15:203-14.
6. Matamoros SE, Cortés MH, Motato ÁM. Caracterización de la situación de seguridad alimentaria de la población en condición de desplazamiento forzado: una mirada a través de las familias. Estudio de caso Bogotá. Revista de la Facultad de Medicina. 2007;55:181-90.
7. Royo-Bordonada MÁ. ¿Pueden contribuir las industrias alimentaria y de la publicidad a prevenir la obesidad infantil y promover hábitos saludables? Gac Sanit. 2013;27:563. <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2013.01.014>
8. Pérez-Escamilla R, Segall-Corrêa AM. Food insecurity measurement and indicators. Revista de Nutrição. 2008;21:15s-26s.
9. Salvador-Castell G, Ngo de la Cruz J, Pérez-Rodrigo C, Aranceta J. Escalas de evaluación de la inseguridad alimentaria en el hogar. Revista Española de Nutrición Comunitaria. 2015;21(Supl.1):270-6.
10. Bickel GW, Hamilton WL, Cook JT, Thompson WW, Buron LF, Frongillo EA. Household food security in the United States in 1995: Summary Report of the Food Security Measurement Project. Washington, D.C.: United States Department of Agriculture; 1997;21-44
11. Isanaka S, Mora-Plazas M, López-Arana S, Baylin A, Villamor E. Food insecurity is highly prevalent and predicts underweight but not overweight in adults and school children from Bogotá, Colombia. J Nutr. 2007;137:2747-55. <https://doi.org/10.1093/jn/137.12.2747>
12. Villagómez-Ornelas P, Hernández-López P, Carrasco-Enríquez B, Barrios-Sánchez K, Pérez-Escamilla R, Melgar-Quinónez H. Validez estadística de la Escala Mexicana de Seguridad Alimentaria y la Escala Latinoamericana y Caribeña de Seguridad Alimentaria. Salud Pública México. 2014;56:s5-11.
13. Melgar-Quinónez H. Validación de la escala latinoamericana y caribeña para la medición de la seguridad alimentaria (ELCSA) en Guatemala. Guatemala: FAO; 2010; Fecha de consulta: 29 de marzo de 2021. Disponible en: https://coin.fao.org/coin-static/cms/media/9/13155829028740/validacion_elcsa_guatemala.pdf
14. Dellohain PL, Sanjur D. La adaptación y validación de una escala de seguridad alimentaria en una comunidad de Caracas, Venezuela. Arch Latinoam Nutr. 2000;50:334-40.
15. Álvarez MC, Estrada A, Montoya EC, Melgar-Quinónez H. Validation of a household food security scale in Antioquia, Colombia. Salud Pública México. 2006;48:474-81.
16. Jiménez S, Prada G, Herrán ÓF. Escalas para medir la seguridad alimentaria en Colombia: ¿son válidas? Rev Chil Nutr. 2012;39:8-17. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182012000100001>
17. Camargo G MI, Quintero L DC, Herrán F OF. Seguridad alimentaria en Colombia y modelo Rasch. Rev Chil Nutr. 2012;39:168-79. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182012000200006>

18. Del Castillo SE, Patiño GA, Herrán ÓF. Inseguridad alimentaria: variables asociadas y elementos para la política social. *Biomédica*. 2012;32:545-56. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i4.766>
19. Ministerio de Salud y Protección Social, Instituto Colombiano de Bienestar Familiar, Instituto Nacional de Salud, Universidad Nacional de Colombia. Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia 2015 ENSIN. Bogotá; ICBF; 2019.
20. Shen X, Gao X, Tang W, Mao X, Huang J, Cai W. Food insecurity and malnutrition in Chinese elementary school students. *Br J Nutr*. 2015;114:952-8. <https://doi.org/10.1017/S0007114515002676>
21. Shahraki SH, Amirkhizi F, Amirkhizi B, Hamed S. Household food insecurity is associated with nutritional status among Iranian children. *Ecol Food Nutr*. 2016;55:473-90. <https://doi.org/10.1080/03670244.2016.1212710>
22. Abdurahman AA, Mirzaei K, Dorosty AR, Rahimiforushani A, Kedir H. Household food insecurity may predict underweight and wasting among children aged 24-59 months. *Ecol Food Nutr*. 2016;55:456-72. <https://doi.org/10.1080/03670244.2016.1207069>
23. Schlüssel MM, Silva AAM da, Pérez-Escamilla R, Kac G. Household food insecurity and excess weight/obesity among Brazilian women and children: A life-course approach. *Cad Saude Pública*. 2013;29:219-26. <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2013000200003>
24. Mahan LK, Escott-Stump S. Krouse Dietoterapia. 12° edición. Barcelona: Elsevier; 2009;68-125.
25. Muthayya S, Rah JH, Sugimoto JD, Roos FF, Kraemer K, Black RE. The global hidden hunger indices and maps: An advocacy tool for action. *PloS ONE*. 2013;8:e67860. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067860>
26. Kennedy G, Natel G, Shetty P. The scourge of "hidden hunger": Global dimensions of micronutrient deficiencies. FAO; 2003. Fecha de consulta: 29 de marzo de 2021; Disponible en: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2004414753>
27. Thornton KA, Mora-Plazas M, Marín C, Villamor E. Vitamin A deficiency is associated with gastrointestinal and respiratory morbidity in school-age children. *J Nutr*. 2014;144:496-503. <https://doi.org/10.3945/jn.113.185876>
28. Ministerio de Salud Pública. Decreto número 1944 de 28 de octubre de 1996 por el cual se reglamenta la fortificación de la harina de trigo y se establecen las condiciones de comercialización, rotulado, vigilancia y control. 1996. Fecha de consulta: 29 de marzo de 2021. Disponible en: https://www.icbf.gov.co/cargues/avance/docs/decreto_1944_1996.htm
29. Eicher-Miller HA, Mason AC, Weaver CM, McCabe GP, Boushey CJ. Food insecurity is associated with iron deficiency anemia in US adolescents. *Am J Clin Nutr*. 2009;90:1358-71. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27886>
30. Park K, Kersey M, Geppert J, Story M, Cutts D, Himes JH. Household food insecurity is a risk factor for iron-deficiency anaemia in a multi-ethnic, low-income sample of infants and toddlers. *Public Health Nutr*. 2009;12:2120-8. <https://doi.org/10.1017/S1368980009005540>
31. Schmeer KK, Piperata BA. Household food insecurity and child health. *Matern Child Nutr*. 2017;13:e12301. <https://doi.org/10.1111/mcn.12301>
32. Jones AD, Mundo-Rosas V, Cantoral A, Levy TS. Household food insecurity in Mexico is associated with the co-occurrence of overweight and anemia among women of reproductive age, but not female adolescents. *Matern Child Nutr*. 2017;13:e12396. <https://doi.org/10.1111/mcn.12396>
33. Belachew A, Tewabe T. Under-five anemia and its associated factors with dietary diversity, food security, stunted, and deworming in Ethiopia: Systematic review and meta-analysis. *Syst Rev*. 2020;9:31. <https://doi.org/10.1186/s13643-020-01289-7>
34. Pirkle CM, Lucas M, Dallaire R, Ayotte P, Jacobson JL, Jacobson SW, *et al*. Food insecurity and nutritional biomarkers in relation to stature in Inuit children from Nunavik. *Can J Public Health*. 2014;105:e233-8. <https://doi.org/10.17269/cjph.105.4520>
35. Pedraza DF, Queiroz D de, Paiva A de A, Cunha MAL da, Lima ZN. Food security, growth and vitamin A, hemoglobin and zinc levels of preschool children in the northeast of Brazil. *Cien Saude Colet*. 2014;19:641-50. <https://doi.org/10.1590/1413-81232014192.22612012>
36. Villamor E, Mora-Plazas M, Forero Y, López-Arana S, Baylin A. Vitamin B-12 status is associated with socioeconomic level and adherence to an animal food dietary pattern in Colombian school children. *J Nutr*. 2008;138:1391-8. <https://doi.org/10.1093/jn/138.7.1391>

37. Arsenault JE, Mora-Plazas M, Forero Y, López-Arana S, Marín C, Baylin A, *et al.* Provision of a school snack is associated with vitamin B-12 status, linear growth, and morbidity in children from Bogotá, Colombia. *J Nutr.* 2009;139:1744-50. <https://doi.org/10.3945/jn.109.108662>
38. Maslova E, Mora-Plazas M, Forero Y, López-Arana S, Baylin A, Villamor E. Are vitamin A and iron deficiencies re-emerging in urban Latin America? A survey of schoolchildren in Bogotá, Colombia. *Food Nutr Bull.* 2009;30:103-11. <https://doi.org/10.1177/156482650903000201>
39. Harrison GG, Stormer A, Herman DR, Winham DM. Development of a Spanish-language version of the U.S. household food security survey module. *J Nutr.* 2003;133:1192-7. <https://doi.org/10.1093/jn/133.4.1192>
40. Bickel G, Mark N, Price C, Hamilton W, Cook J. Guide to Measuring Household Food Security, Revised 2000. U.S. Department of Agriculture, Food and Nutrition Service; 2000.
41. World Health Organization - WHO. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Vitamin and Mineral Nutrition Information System; 2011; Fecha de consulta: 29 de marzo de 2021; Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85839/WHO_NMH_NHD_MNM_11.1_eng.pdf?ua=1
42. Robinson SL, Marín C, Oliveros H, Mora-Plazas M, Richards BJ, Lozoff B, *et al.* Iron deficiency, anemia, and low vitamin B-12 serostatus in middle childhood are associated with behavior problems in adolescent boys: Results from the Bogotá school children cohort. *J Nutr.* 2018;148:760-70. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy029>
43. de Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ.* 2007;85:660-7. <https://doi.org/10.2471/blt.07.043497>
44. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Curso de capacitación sobre la evaluación del crecimiento del niño. 2008. Fecha de consulta: 29 de marzo de 2021. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5678:2011-curso-capacitacion-sobre-evaluacion-crecimiento-nino-2008&Itemid=4057&lang=es
45. Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 2465 de 2016, Por la cual se adoptan los indicadores antropométricos, patrones de referencia y puntos de corte para la clasificación antropométrica del estado nutricional de niñas, niños y adolescentes menores de 18 años de edad, adultos de 18 a 64 años de edad y gestantes adultas y se dictan otras disposiciones. Fecha de consulta: 29 de marzo de 2021. Disponible en: https://www.icbf.gov.co/sites/default/files/resolucion_no._2465_del_14_de_junio_de_2016.pdf
46. Johnson SR, Tomlinson GA, Hawker GA, Granton JT, Feldman BM. Propensity score methods for bias reduction in observational studies of treatment effect. *Rheum Dis Clin North Am.* 2018;44:203-13. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2018.01.002>
47. Vélez M, Egurrola J, Jaimes Barragán F. Ronda clínica y epidemiológica. Uso de la puntuación de propensión (propensity score) en estudios no experimentales. *Iatreia.* 2013;26:95-101.
48. Shenyang G, Mark WF. Statistical Methods and Applications. Second edition. Los Ángeles: SAGE Publications; 2015;180-182.
49. Perng W, Mora-Plazas M, Marín C, Villamor E. Iron status and linear growth: A prospective study in school-age children. *Eur J Clin Nutr.* 2013;67:646-51. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2013.56>
50. Shroff MR, Perng W, Baylin A, Mora-Plazas M, Marín C, Villamor E. Adherence to a snacking dietary pattern and soda intake are related to the development of adiposity: A prospective study in school-age children. *Public Health Nutr.* 2014;17:1507-13. <https://doi.org/10.1017/S136898001300133X>

Artículo original

Frecuencia de positividad de la prueba de intradermorreacción a tuberculina en una cohorte de pacientes con artritis reumatoide

Wilson Bautista-Molano^{1,2,3}, Liza González⁴, Daniel Fernández-Ávila⁵, Rosa Cardozo¹, Óscar Ruiz¹

¹ Organización Sanitas Internacional/Colsanitas, Bogotá, D.C., Colombia

² Facultad de Medicina, Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, D.C., Colombia

³ Facultad de Medicina, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Facultad de Medicina, Fundación Universitaria Sanitas, Bogotá, D.C., Colombia

⁵ Departamento de Medicina Interna, Hospital Universitario San Ignacio, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmunitaria, crónica y deformante asociada con discapacidad. Quienes la padecen reciben inmunosupresores y tienen un gran riesgo de desarrollar tuberculosis. La prueba de intradermorreacción a la tuberculina se utiliza como tamización en quienes van a recibir terapia biológica.

Objetivo. Evaluar la frecuencia de positividad en la prueba de intradermorreacción a la tuberculina en una cohorte de pacientes con artritis reumatoide.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio descriptivo de corte transversal de una cohorte de pacientes con artritis reumatoide a quienes se les practicó la prueba de tuberculina antes de iniciar la terapia biológica o en el momento del cambio de tratamiento. Los pacientes presentaban enfermedad moderada o grave y eran candidatos para iniciar o cambiar de terapia biológica. Se definió el valor de ≥ 6 mm como punto de corte para la positividad de la prueba y se hizo un análisis descriptivo de cada una de las variables.

Resultados. Se incluyeron 261 pacientes con artritis reumatoide, 92 % de ellos eran mujeres, la edad promedio fue de 55 años (desviación estándar, DE=13,92) y el tiempo desde el diagnóstico era de 12,3 años (DE=8,54). La frecuencia de positividad de la prueba fue de 15,71 % (n=41). Nueve de los 41 pacientes positivos habían recibido la prueba previamente (entre 1 y 6 años antes), todos con resultado negativo; 18 (43,9 %) de ellos venían recibiendo tratamiento con glucocorticoides y todos los 41 (100 %) recibían metotrexate.

Conclusiones. La frecuencia de positividad de la prueba de tuberculina en pacientes colombianos con artritis reumatoide fue de aproximadamente 16 %. Se recomienda optimizar las estrategias para detectar esta condición y darle un tratamiento oportuno y, así, disminuir el riesgo de reactivación de la tuberculosis.

Palabras clave: artritis reumatoide/epidemiología; tuberculosis; riesgo; terapia biológica.

Frequency of positivity of the tuberculin intradermorreaction test in a cohort of patients with rheumatoid arthritis

Introduction: Rheumatoid arthritis is an autoimmune, chronic, and deforming condition associated with disability. Patients are immunosuppressed and at high risk of developing tuberculosis. The tuberculin skin test is used to screen candidates for biological therapy.

Objective: To evaluate the frequency of positivity of the tuberculin skin test in a cohort of Colombian patients with rheumatoid arthritis.

Materials and methods: We conducted a descriptive cross-sectional study including patients with rheumatoid arthritis receiving the tuberculin skin test prior to the start or at the time of the change of biological therapy. The patients' condition was moderate or severe and they were candidates for initiation or change of biological therapy. We defined the value of ≥ 6 mm as the cut-off point for a positive tuberculin skin test and performed a descriptive analysis for each of the variables considered.

Results: In total, 261 patients with rheumatoid arthritis were included, 92 % of whom were women; the average age was 55 years (SD=13.92) and the time from diagnosis, 12.3 years (SD=8.54). The frequency of positive tuberculin skin tests was 15.71% (n=41). Of the 41 positive patients, nine had previously had the test (1 to 6 years before), all of them with negative results; 18 of these were receiving glucocorticoids (43.9%) and all of them (100%) were being treated with methotrexate.

Conclusions: The frequency of positivity of the tuberculin skin test in these Colombian patients diagnosed with rheumatoid arthritis was around 16%. We recommend optimizing strategies aimed at an optimal detection of this condition and the timely initiation of treatment to reduce the risk of tuberculosis reactivation.

Keywords: Arthritis, rheumatoid/epidemiology; tuberculosis; risk; biological therapy.

Recibido: 20/04/2020

Aceptado: 13/04/2021

Publicado: 16/04/2021

Citación:

Bautista-Molano W, González L, Fernández-Ávila D, Cardozo R, Ruiz O. Frecuencia de positividad de la prueba de intradermorreacción a tuberculina en una cohorte de pacientes con artritis reumatoide. Biomédica. 2021;41:472-80.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.5416>

Correspondencia:

Wilson Bautista-Molano, Organización Sanitas Internacional/Colsanitas, Avenida calle 100 No 11B-67, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (313) 496 4245
wilson.bautista@gmail.com

Contribución de los autores:

Todos los autores participaron en la planeación del estudio, la recolección de datos, la organización de la base de datos, el análisis de la información y de los resultados, y la escritura del manuscrito.

Financiación:

Los autores declaran no tener ninguna fuente de financiación para la realización de este estudio.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

La artritis reumatoide es una enfermedad sistémica de etiología autoinmunitaria que se caracteriza por poliartritis simétrica episódica, crónica, erosiva y deformante, de impacto en salud pública y que se asocia con discapacidad a mediano y largo plazo (1,2). Durante la última década, la terapia biológica, incluido el bloqueo farmacológico del factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor*, TNF), se ha convertido en una estrategia terapéutica eficaz para el manejo de enfermedades inflamatorias crónicas como esta (3) y, por lo tanto, el esquema de tratamiento se incluye en guías y recomendaciones internacionales (4).

La tuberculosis es una enfermedad granulomatosa causada por la infección con *Mycobacterium tuberculosis*. El bacilo responsable se transmite en las gotas de saliva de pacientes infectados a personas sanas, lo que desencadena una reacción a nivel alveolar caracterizada por una reacción de macrófagos y de células dendríticas que intentan fagocitar y destruir el bacilo. Algunas de estas células permanecen en el pulmón y otras migran a los ganglios linfáticos, donde se produce la activación de linfocitos T que migran a los granulomas en formación (5). El granuloma previene la actividad del bacilo de la tuberculosis y algunos pacientes pueden depurar la carga de bacilos; sin embargo, otros se mantienen en un estado de latencia y pueden reactivarse, incluso décadas después de la primoinfección. La reactivación depende del estado inmunológico del huésped. La tuberculosis activa se desarrolla en 5 a 15 % de los pacientes contagiados con el bacilo, y un gran porcentaje de este grupo son personas inmunocomprometidas (6).

Se considera que cerca de dos billones de personas, aproximadamente un tercio de la población mundial, pueden tener tuberculosis latente, cifra que ha venido en aumento con la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) (7). Por otra parte, se estima que se diagnostican ocho millones de casos de tuberculosis al año en el mundo, y entre 2 y 3 millones de personas mueren a causa de la enfermedad (8). En el caso específico de Colombia, la tuberculosis es una de las principales enfermedades de gran impacto en salud pública. En el 2002, cerca de dos terceras partes de las entidades territoriales del país presentaban incidencias por encima del promedio nacional (26 casos por cada 100.000 habitantes) (9), con un incremento en la tasa de incidencia de casos bacteriológicamente confirmados entre el 2012 y el 2018 (10).

La gran mayoría de quienes entran en contacto con el bacilo nunca desarrollan la infección porque su sistema inmunológico funciona adecuadamente. Una de las citocinas más importantes de la reacción inmunológica contra el bacilo es el TNF, una molécula crítica para la integridad del granuloma (11), por lo que los individuos expuestos o que van a ser expuestos a antagonistas farmacológicos del TNF se encuentran en gran riesgo de desarrollar tuberculosis: una vez iniciado el tratamiento, el riesgo relativo de enfermar se incrementa entre 1,6 y 25,1 veces dependiendo de la situación clínica particular de cada paciente (12).

Entre los métodos paraclínicos de detección de casos de tuberculosis, se encuentran la prueba de intradermoreacción a la tuberculina y la de QuantiFERON™. La primera, denominada aquí como prueba de tuberculina (*Purified Protein Derivative*, PPD), es poco específica en pacientes que han recibido la vacuna BCG (bacilo de Calmette Guérin) y poco sensible en aquellos que están en estado de inmunosupresión (13). La prueba de QuantiFERON™ y la T-SPOT TB™ miden la reacción de los linfocitos T *in vitro* frente a los antígenos que no están presentes en la vacuna BCG e, incluso, en

varias de las cepas de *Mycobacterium* no tuberculosas, por lo que constituyen pruebas más específicas que la de tuberculina (14); no obstante, con ellas se ha reportado un mayor número de casos de conversión de pruebas negativas a falsos positivos y de positivas a falsos negativos, que con la de tuberculina (15).

La prueba de tuberculina es la típica prueba de sensibilidad retardada, cuya célula efectora es el macrófago mononuclear. Tiene varias etapas: la de reconocimiento mediada por células T CD4 y CD8 de antígenos extraños en las células presentadoras de antígeno; la fase de activación en que las células T proliferan y liberan citocinas proinflamatorias; la fase efectora en que las células inflamatorias migran al tejido que contiene el antígeno, y la fase de resolución en que los macrófagos eliminan el antígeno (16). Es por este mecanismo fisiopatológico que su lectura debe interpretarse teniendo en cuenta los siguientes factores: integridad del sistema inmunitario, presencia o no de *M. tuberculosis*, factores socioeconómicos y epidemiológicos del huésped, características clínicas y radiológicas del paciente y, por último, verificación de la presencia de una “reactivación” o “reinfección” (17).

A partir de estas precisiones, se han establecido varios puntos de corte útiles para la interpretación de la prueba: la reacción cutánea negativa (induración menor de 5 mm) que se interpreta como un resultado negativo en pacientes adultos que no han tenido contacto con casos de tuberculosis activa en los tres meses anteriores y no tienen factores de riesgo por inmunosupresión; la reacción cutánea intermedia (induración de 5 a 10 mm) que se interpreta como prueba positiva en personas con factores de riesgo alto para tuberculosis, por ejemplo, aquellos con infección por HIV, en quienes han tenido contacto con pacientes con tuberculosis activa, tienen evidencia radiológica de lesiones previas de tuberculosis, o han recibido trasplantes o medicamentos inmunosupresores como glucocorticoides en dosis de más de 15 mg durante más de tres meses; y, la reacción cutánea mayor (induración mayor de 10 mm) que se interpreta como prueba positiva en pacientes con induración entre 5 y 9 mm pero con condiciones médicas que incrementan el riesgo de tuberculosis (diabetes mellitus y enfermedades hematológicas o reticuloendoteliales como leucemia o enfermedad de Hodgkin), usuarios de drogas endovenosas o con factores de riesgo para adquirir el HIV, aquellos con carcinoma de cabeza, cuello y pulmón, enfermedad renal terminal, pérdida de peso mayor de 10 % en los seis meses anteriores, y gastrectomía o derivación yeyuno-ileal (18).

En el ejercicio médico, la prueba de tuberculina es la que con mayor frecuencia se usa para la tamización de pacientes con enfermedades reumatológicas que van a recibir terapias biológicas, entre ellas, inhibidores del TNF. Se considera que los pacientes con artritis reumatoide tienen inmunosupresión porque la enfermedad altera el normal funcionamiento del sistema inmunológico y reciben tratamiento con glucocorticoides que, asociados con otros medicamentos, entre ellos el metotrexato, amplifican ese efecto depresor en el sistema inmunológico.

En Colombia, son escasos los estudios en que se evalúa la prevalencia de positividad de la prueba de tuberculina en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas, y es urgente determinarla en nuestro contexto clínico. Por ello, se propuso como objetivo de este estudio evaluar la frecuencia de positividad de la prueba de tuberculina en una cohorte de seguimiento de pacientes con diagnóstico de artritis reumatoide antes del inicio de la terapia biológica o de la modificación del tratamiento.

Materiales y métodos

Se hizo un estudio descriptivo de corte transversal en el que se documentaron y analizaron los datos de un grupo de pacientes de una cohorte en seguimiento clínico en el programa de artritis reumatoide. Se seleccionó a aquellos que ya habían recibido la prueba de tuberculina según el registro en la historia clínica antes del inicio de la terapia biológica o en el momento del cambio.

La muestra fue no probabilística, por conveniencia y secuencial, a partir de la cohorte de los individuos que asistían regularmente a la consulta de reumatología. Se definió el valor de 6 o más milímetros como punto de corte para considerar positiva la prueba de tuberculina, puesto que se trataba de pacientes que en el momento de la prueba venían recibiendo tratamiento inmunomodulador con antirreumáticos modificadores de la enfermedad o con terapia biológica, y cuya enfermedad era moderada a grave, por lo que en ese momento eran candidatos para el inicio o el cambio de terapia biológica. A todos los pacientes se les tomaron, además, radiografías de tórax y se les hizo el examen físico para detectar adenopatías cervicales, axilares o inguinales como parte de la tamización que rutinariamente se hace para tuberculosis latente.

Los datos sobre los pacientes provenían de la historia clínica electrónica de seguimiento en la consulta de reumatología. Se diseñó una base de datos para recopilar la información consolidada cada cuatro semanas para detectar datos erróneos o faltantes y garantizar un adecuado control de calidad. El programa usado fue Access, que permite eliminar los datos repetidos y hacer las validaciones de los valores de los registros. Se hizo el análisis descriptivo de cada una de las variables de estudio, y se utilizaron medidas de tendencia central y variabilidad para describir las características de la población. En cuanto al manejo estadístico de los datos, se utilizó el programa Stata™, versión 12.

Consideraciones éticas

Por tratarse de un estudio descriptivo sin intervención ni modificación de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los pacientes, la investigación se consideró de bajo riesgo y no fue necesario el consentimiento informado por escrito. Los datos se mantuvieron en absoluta confidencialidad en cumplimiento de los principios establecidos en el Código de Núremberg, la Convención de Helsinki (1964) y la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Protección Social de la República de Colombia. El almacenamiento de la información en la base de datos se ajustó a lo previsto en la Ley 1582 de 2012 y solo los investigadores principales tuvieron acceso a la base de datos.

Resultados

Se analizó la información de 261 pacientes, 91,9 % de ellos eran mujeres (n=240), la edad promedio fue de 55,06 años (DE=13,92) y el tiempo promedio desde el diagnóstico de artritis reumatoide fue de 12,28 años (DE=8,54 años). La frecuencia de positividad de la prueba de intradermorreacción a tuberculina para este grupo fue de 15,71 % (n=41). El resultado de la prueba medido en milímetros para los casos positivos fue variable, con un rango entre los 6 y 25 milímetros (figura 1).

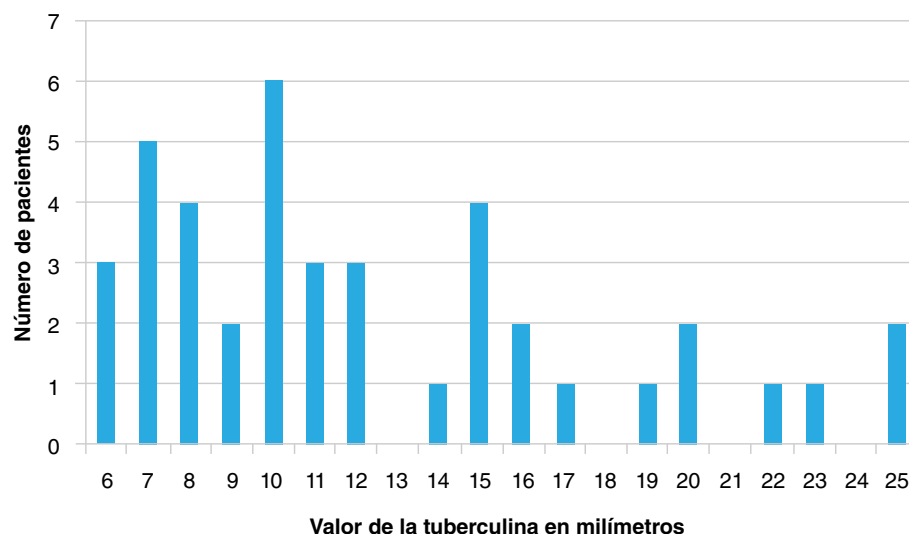


Figura 1. Valor de la tuberculina (PPD) en milímetros (mm) en el grupo de pacientes con tuberculosis latente

Del total de pacientes con resultado negativo ($n=199$), la prueba ya se había aplicado a 41 (entre 1 y 5 años antes) y, en todos ellos, había sido negativa. De los 41 pacientes con resultado positivo en la prueba de estudio, nueve ya habían sido sometidos a esta en el pasado (entre 1 a 6 años antes), con resultado negativo en todos ellos. En el momento de la prueba de tuberculina, 19 pacientes del grupo de aquellos con tuberculosis latente habían recibido, por lo menos, un producto biológico previamente y estaban a la espera del cambio de la terapia biológica; los 22 casos restantes correspondían a pacientes que venían en tratamiento con antirreumáticos modificadores de la enfermedad y la prueba de tuberculina se solicitaba para iniciar el tratamiento biológico. De los 19 pacientes que habían recibido biológicos previamente, 10 habían recibido dos y tres habían recibido tres (figura 2). En cuanto al uso de glucocorticoides, se encontró que, de los 41 pacientes con tuberculosis latente, 18 (43,9 %) venían recibiendo glucocorticoides (prednisona en dosis de 10 a 40 mg día) y todos ellos (100 %) recibían tratamiento modificador de la enfermedad con metotrexato.

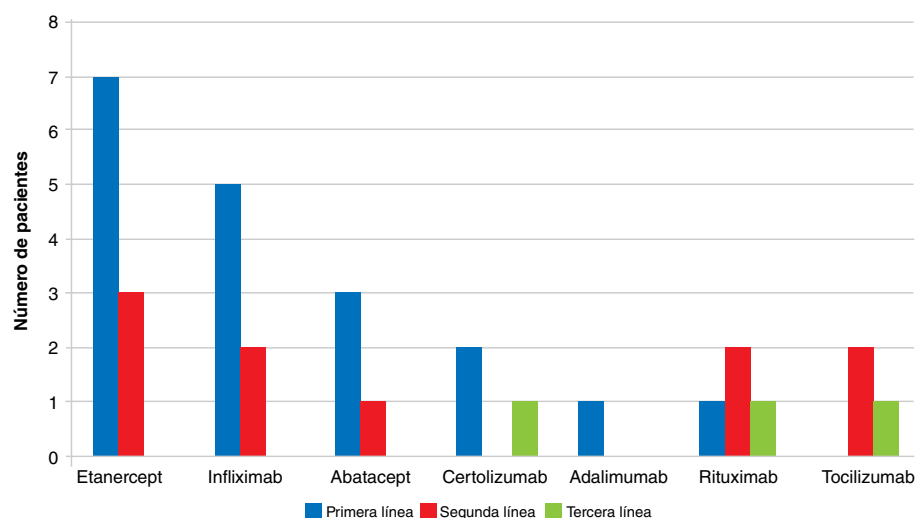


Figura 2. Número de pacientes en quienes se detectó tuberculosis latente por uso previo de terapia biológica y por uso de tratamientos de primera, segunda o tercera línea

En cuanto a la radiografía de tórax, se encontraron 10 casos con hallazgos anormales en el grupo de los pacientes con tuberculina negativa y ningún caso en el grupo de aquellos con tuberculosis latente. Los pacientes con alteraciones en la radiografía de tórax fueron remitidos a neumología, pero no se detectaron casos de tuberculosis pulmonar. Los pacientes con prueba de tuberculina positiva recibieron un tratamiento profiláctico con 300 mg de isoniácida al día durante nueve meses, con suplemento de piridoxina, y continúan en seguimiento clínico en el programa. En el examen físico, ninguno de los pacientes con prueba de tuberculina positiva presentó adenopatías cervicales, axilares o inguinales.

Discusión

El principal objetivo del presente estudio fue evaluar la frecuencia de resultados positivos en la prueba de tuberculina en una cohorte de seguimiento de 261 pacientes con diagnóstico de artritis reumatoide. En este grupo de pacientes, la prueba fue solicitada antes del inicio o cambio de tratamiento con terapia biológica, siguiendo las recomendaciones de gestión de riesgo para la prescripción de este tipo de tratamiento (19). Se encontró que la frecuencia estimada de positividad de la prueba de tuberculina para este grupo fue de cerca del 16 % y en ninguno de los casos hubo hallazgos clínicos o radiográficos de relevancia en el tórax.

La artritis reumatoide se ha asociado con un incremento del riesgo de infecciones debido a su fisiopatología y al uso de tratamientos inmunosupresores. La reactivación de la infección latente de tuberculosis es un problema grave en estos pacientes, especialmente después de recibir terapia anti-TNF. La inhibición del TNF impide la formación del granuloma tuberculoso y fomenta el crecimiento de las micobacterias. Después de una infección de tuberculosis, la recomendación es suspender el tratamiento con inhibidores de TNF hasta que la infección se haya resuelto, a pesar de su efecto favorable para suprimir la inflamación (20,21).

La prueba de tuberculina detecta la intradermoreacción a antígenos micobacterianos producto de la precipitación proteica a partir de la filtración del cultivo de *M. tuberculosis* (PPD). Se la considera la prueba de referencia para el diagnóstico de tuberculosis latente al detectar la hipersensibilidad por exposición previa al bacilo. Es positiva cuando la induración es mayor de 5 mm en personas con mayor riesgo de tuberculosis activa por estar en tratamiento con inmunosupresores en dosis equivalentes a 15 mg por día de prednisona o más o con antagonistas del TNF α (22). La gran frecuencia de positividad de la tuberculina encontrada en el presente estudio refleja lo esperado en un país endémico para tuberculosis. Según datos del Instituto Nacional de Salud, durante el 2014 se reportaron 10.849 casos nuevos de tuberculosis en todas sus formas, es decir, una incidencia de 23,02 casos por 100.000 habitantes (23). Esta cifra se ha incrementado en la última década, con un reporte de 14.446 casos en el 2018, para una incidencia de 26,9 casos por 100.000 habitantes (10).

La gran mayoría de individuos expuestos a *M. tuberculosis* desarrolla la forma latente, en la que la infección es contenida en granulomas a partir de los cuales puede reactivarse la enfermedad. En el presente estudio, se encontró que el 44 % de los pacientes con tuberculosis latente venía recibiendo glucocorticoides (prednisona en dosis de 10 a 40 mg día) y el 100 % recibía tratamiento modificador de la enfermedad con metotrexato. Esta circunstancia se relaciona con un incremento del riesgo de este tipo de infección y constituye una variable que debe considerarse en pacientes que reciben dichos

tratamientos, dada la gran probabilidad de reactivación de la tuberculosis. En ese sentido, es claro que la detección de tuberculosis latente antes de iniciar la terapia biológica puede minimizar complicaciones posteriores. En línea con lo anterior, en varios estudios se han evaluado biomarcadores adicionales y otros procedimientos para la detección temprana de la infección (24).

La frecuencia reportada de la prueba de tuberculina en este estudio es concordante con estudios previos realizados en otros países latinoamericanos. Se reportó una frecuencia del 12,4 % en pacientes argentinos con artritis reumatoide sometidos a la prueba de tuberculina, asociada con la administración de altas dosis de glucocorticoides (25). En un estudio chileno en 41 pacientes con esta condición, se reportó una positividad de la prueba mayor de 5 mm en el 36 % de los participantes (Gil G, Neira O, Marcone P, Sabagh E. Tuberculin reactivity in Chilean RA patients. Abstract XIVth Congress of the Pan-American League of Associations for Rheumatology: CATEGORY: Epidemiology. J Clin Rheumatol. 2006;12(Suppl 4): S8). Según otro estudio en Latinoamérica, que incluyó pacientes colombianos tratados por otra enfermedad inflamatoria crónica, la espondiloartritis, la prevalencia de tuberculosis activa fue del 3,3 % (IC_{95%} 1,8-5,7), significativamente mayor que la de la población general (0,32 %). El riesgo relativo estandarizado para esta población fue de 10,3 comparado con la población general (26). Hasta donde se pudo comprobar, este es uno de los primeros estudios en que se determinó la frecuencia de positividad de la prueba de tuberculina en un grupo significativo de pacientes colombianos con artritis reumatoide en seguimiento clínico.

El estudio tuvo varias limitaciones. En primer lugar, debido a diferencias entre los países, los resultados sobre la reactividad de la prueba no pueden ser extrapolados (ni siquiera a otros países de la región) y, por lo tanto, deben interpretarse en este contexto.

En segundo lugar, el efecto *booster* no pudo verificarse en todos los pacientes del estudio. La prueba de dos pasos y reacción reforzada para determinarlo consiste en la administración de una segunda prueba entre una y cinco semanas después de una primera prueba falsamente negativa. La prueba se hace en algunos pacientes en quienes la capacidad para reaccionar al antígeno de la tuberculina disminuye con el tiempo, lo que da lugar a una reacción falsamente negativa (por ejemplo, cuando la infección tuberculosa es muy antigua) (27). Sin embargo, la utilidad de esta prueba ha sido cuestionada en otros estudios (28).

En tercer lugar, la prueba confirmatoria de QuantiFERON TB™ (considerada la de referencia) no se utilizó en los pacientes que fueron reactivos en la prueba de tuberculina. La solicitud de esta prueba confirmatoria no es habitual en la práctica clínica de los reumatólogos colombianos, especialmente porque no está incluida en el plan básico de atención en salud por su alto costo.

En cuarto lugar, no se recolectó la información relacionada con el estrato socioeconómico y las condiciones de hacinamiento de la vivienda de los pacientes de la cohorte, aspectos estos que se han establecido como factores de riesgo para el desarrollo de tuberculosis y podrían ofrecer un contexto adicional desde el punto de vista socioeconómico para estratificar el riesgo de estos pacientes. Dado que no se tuvo la información previa de la prueba de tuberculina, no es posible hablar de porcentaje de pacientes con viraje en el resultado, ya que solo se registraron los datos de 9 pacientes del grupo de positivos y 41 del de negativos.

Aunque no se incluyeron otras variables útiles para estratificar el riesgo (tratamientos farmacológicos previos, resultado de prueba de tuberculina previa, estrato socioeconómico, hacinamiento y contacto epidemiológico), estos resultados reflejan una realidad objetiva del impacto de la tuberculosis latente en pacientes con artritis reumatoide y constituyen la línea de base para el desarrollo de estudios posteriores que permitan estratificar el riesgo de desarrollar tuberculosis en pacientes candidatos a terapia biológica y, por consiguiente, minimizar el impacto de esta infección en un país endémico como el nuestro. Asimismo, los estudios futuros permitirían determinar el rendimiento operativo de la prueba de tuberculina Vs. el QuantiFERON™ en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas, con el fin de diseñar e implementar algoritmos y diagramas de flujo para la adopción de decisiones en nuestro contexto clínico.

Por último, los resultados aportan información relevante sobre el comportamiento de la tuberculosis en una cohorte de pacientes con artritis reumatoide y permitirá el diseño, implementación y optimización de procesos de atención, lo que hoy se dificulta por la escasa información disponible. En conclusión, la gran frecuencia de positividad de la prueba de tuberculina en estos pacientes reclama estrategias que optimicen la detección de dicha condición y el inicio oportuno del tratamiento para disminuir el riesgo de reactivación de la tuberculosis.

Agradecimientos

A María del Pilar Soler, epidemióloga de la Unidad de Investigación de la Fundación Universitaria Sanitas por el apoyo metodológico para formular la pregunta de investigación, el posterior análisis descriptivo y su interpretación, y muy especialmente a los pacientes por permitirnos el estudio de sus casos.

Referencias

1. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester G, Emery P, Firestein G, *et al.* Rheumatoid arthritis. Nat Rev Dis Primers. 2018;4:18001. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.1>
2. Bautista-Molano W, Fernández-Ávila D, Jiménez R, Cardozo R, Marín A, Soler MP, Gómez O, Ruiz O. Perfil epidemiológico de pacientes colombianos con artritis reumatoide evaluados en una clínica especializada de atención integral. Reumatol Clin. 2016;12:313-8. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2015.11.009>
3. Askling J, Fored CM, Brandt L, Baecklund E, Bertilsson L, Coster L, *et al.* Risk and case characteristics of tuberculosis in rheumatoid arthritis associated with tumor necrosis factor antagonists in Sweden. Arthritis Rheum. 2005;52:1986-92. <https://doi.org/10.1002/art.21137>
4. Smolen JS, Landewé RBM, Bijlsma JW, Burmester G, Dougados M, Kerschbaumer A, *et al.* EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. Ann Rheum Dis. 2020;79:685-99 <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216655>
5. Kauffman SH. New issues in tuberculosis. Ann Rheum Dis. 2004;63 (Suppl.2):50-6 <https://doi.org/10.1136/ard.2004.028258>
6. Zar HJ, Udwadia ZF. Advances in tuberculosis 2011-2012. Thorax. 2013;68:283-7 <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-203127>
7. Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams B, Ravigione M, *et al.* The growing burden of tuberculosis global trends and interactions with the HIV epidemic. Arch Intern Med. 2003;163:1009-21. <https://doi.org/10.1001/archinte.163.9.1009>
8. Ravigione M. Global tuberculosis report 2015, World Health Organization. Fecha de consulta: 9 de noviembre de 2017. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf
9. Chaparro PE, García I, Guerrero MI, León CI. Situación de la tuberculosis en Colombia, 2002. Biomédica. 2004;24(Suppl.1):102-14. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v24iSuppl1.1309>

10. López-Pérez M. Informe de evento tuberculosis en Colombia 2018. Fecha de consulta: 1 de diciembre de 2020. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscadoreventos/Informesdeevento/TUBERCULOSIS_2018.pdf
11. Ehlers S. Tumor necrosis factor and its blockade in granulomatous infections: Differential modes of action of infliximab and etanercept? Clin Infect Dis. 2005;41(Suppl.3):S199-S203. <https://doi.org/10.1086/429998>
12. Gómez-Reino JJ, Carmona L, Valverde VR, Martín-Mola E, Montero MD. Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk: A multicenter active-surveillance report. Arthritis Rheum. 2003;48:2122-7. <https://doi.org/10.1002/art.11137>
13. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP. The immune response in tuberculosis. Ann Rev Immunol. 2013;31:475-527. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095939>
14. Dorman SE, Belknap R, Graviss EA, Reves R, Schluger N, Weinfurter P, *et al.* Interferon-gamma release assays and tuberculin skin testing for diagnosis of latent tuberculosis infection in healthcare workers in the United States. Am J Respir Crit Care Med. 2014;189:77-87. <https://doi.org/10.1164/rccm.201302-0365OC>
15. Pai M, Denkinger CM, Kik SV, Rangaka M, Zwerling A, Oxlade O, *et al.* Gamma Interferon release assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Clin Microbiol Rev. 2014;27:3-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00034-13>
16. Dannenberg AM. Delayed-type hypersensitivity and cell mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. Immunol Today. 1991;12:229-33. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(91\)90035-R](https://doi.org/10.1016/0167-5699(91)90035-R)
17. Pérez C, Borda A. Interpretación de la PPD, fundamentos fisiopatológicos y enfoque práctico. Rev Colomb Neumol. 2007;19:11-7.
18. American Thoracic Society. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. Am J Respir Crit Care Med. 2000;161:S221-47. https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.supplement_3.ats600
19. Forero E, Chalem M, Vásquez G, Jauregui E, Medina L, Pinto L, *et al.* Risk management for prescribing biological therapies. Rev Colomb Reumatol. 2016;23:50-67. <https://doi.org/10.1016/j.rcreu.2016.02.004>
20. Dixon WG, Hyrich KL, Watson KD, Lunt M, Galloway J, Ustianowski A, *et al.* Drug-specific risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF therapy: Results from the British Society for Rheumatology Biologics Register (BSRBR). Ann Rheum Dis. 2010;69:522-8. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.118935>
21. Chung TT, Ko HJ, Lau CS, Chung HY. A retrospective study on the risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis. Rheumatol Int. 2020;40:1-8. <https://doi.org/10.1007/s00296-020-04583-8>
22. Richeldi L. An update on the diagnosis of tuberculosis infection. Am J Respir Crit Care Med. 2006;174:736-42. <https://doi.org/10.1164/rccm.200509-1516PP>
23. López-Pérez M. Informe final. Tuberculosis, Colombia, 2014. Fecha de consulta: 29 de abril de 2016. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiol%C3%B3gico/Tuberculosis%202014.pdf>
24. Zafari P, Golpour M, Hafezi N, Bashash D, Esmaeli S, Golpour M, *et al.* Tuberculosis comorbidity with rheumatoid arthritis: Gene signatures, associated biomarkers, and screening. IUBMB Life. 2020;73:26-39. <https://doi.org/10.1002/iub.2413>
25. Tamborenea MN, Tate G, Mysler E, Debonis J, Schiledman A. Prevalence of positive PPD in a cohort of rheumatoid arthritis patients. Rheumatol Int. 2010;30:613-6. <https://doi.org/10.1007/s00296-009-1027-z>
26. Bautista-Molano W, Landewé R, Burgos-Vargas R, Maldonado-Cocco J, Molto A, van den Bosch F, *et al.* Prevalence of comorbidities and risk factors for comorbidities in patients with spondyloarthritis in Latin America: A comparative study with the general population and data from the ASAS-COMOSPA Study. J Rheumatol. 2018;45:206-12. <https://doi.org/10.3899/jrheum.170520>
27. Pahal P, Sharma S. PPD Skin Test. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing; 2020. Fecha de consulta: 25 de marzo de 2020. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556037/>
28. Small PM, Fujiwara PI. Management of tuberculosis in the United States. N Engl J Med. 2001;345:189-200. <https://doi.org/10.1056/NEJM200107193450307>

Artículo original

Efecto de la inmunoterapia con alérgenos específicos en pacientes pediátricos con asma atendidos en una institución de salud de Colombia

Jorge Andrés Puerto, Susana Uribe, Víctor Calvo, Ricardo Cardona
Grupo de Alergología Clínica y Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. El asma es una enfermedad crónica y potencialmente grave. El 80 % de los casos es de origen alérgico, por lo cual la inmunoterapia específica con alérgenos es una alternativa terapéutica que modula el curso natural de la enfermedad.

Objetivo. Evaluar el impacto de la inmunoterapia en pacientes pediátricos con asma atendidos en una institución de salud de Colombia.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio observacional descriptivo con componente analítico de corte transversal. Se incluyeron 62 pacientes con diagnóstico de asma alérgica sensibilizados a ácaros del polvo y en tratamiento, mínimo, con seis dosis de inmunoterapia contra ácaros. El efecto del tratamiento se evaluó mediante la escala de puntuación del ACT (*Asthma Control Test*), la escala de tratamiento de la GINA (*Global Initiative for Asthma*) y la espirometría.

Resultados. La puntuación de la prueba ACT antes del inicio de la inmunoterapia, correspondía a 30 % de pacientes con asma no controlada, 28 % con buen control y 4 % con asma totalmente controlada. Entre los pacientes con asma no controlada, el 46,7 % logró un buen control y el 23,3 % alcanzó un control total. En cuanto a la percepción de los pacientes sobre la mejoría con la inmunoterapia, el 9,75 % percibió una mejoría menor del 50 %, el 45,2 %, una entre el 50 y el 90 %, en tanto que el 41,9 % refirió una igual o mayor del 90 %. No se encontraron cambios significativos en los valores del volumen espiratorio forzado en un segundo (VEF1) en las espirometrías.

Conclusiones. Se observaron cambios significativos en los puntajes del ACT y en la percepción de mejoría de la enfermedad en la población tratada con inmunoterapia específica para ácaros, es decir, que esta tendría un efecto beneficioso en el curso natural de la enfermedad

Palabras clave: inmunoterapia; asma; pediatría; ácaros; espirometría; rinitis.

Impact of the allergen-specific immunotherapy in pediatric patients with asthma treated at a health institution in Colombia

Introduction: Asthma is a chronic and potentially serious disease and 80% of the cases have an allergic etiology. In this sense, allergen-specific immunotherapy is an alternative that modulates the natural course of the disease.

Objective: To evaluate the impact of immunotherapy in pediatric asthma patients treated at a health institution in Colombia.

Materials and methods: We conducted an observational descriptive study with an analytical cross-sectional component. Sixty-two patients diagnosed with allergic asthma sensitized to dust mites and treated with at least 6 doses of mite immunotherapy were included. We assessed the impact of immunotherapy using the Asthma Control Test (ACT), the Global Initiative for Asthma (GINA) treatment scale, and spirometry values.

Results: The ACT score before the start reported 30% of patients with uncontrolled asthma, 28% with good control, and 4% with totally controlled asthma. Of the patients with uncontrolled asthma, 46.7% achieved good control and 23.3% total control. Regarding patients' perception of improvement with the immunotherapy, 9.75% perceived a response of less than 50%, 45.2% one between 50% -90%, and 41.9% reported response equal to or greater than 90%. No significant changes in FEV1 values were found in spirometry.

Conclusions: Significant changes in the ACT scores and the perception of disease improvement were observed in the population evaluated with specific mite immunotherapy, i.e., it had a positive impact on the natural course of the disease.

Keywords: Immunotherapy; asthma; pediatrics; mites; spirometry; rhinitis.

Recibido: 08/10/2020

Aceptado: 28/04/2021

Publicado: 29/04/2021

Citación:

Puerto JA, Uribe S, Calvo V, Cardona-Villa R. Efecto de la inmunoterapia específica con alérgenos en pacientes pediátricos con asma atendidos en una institución de salud de Colombia. *Biomédica*. 2021;41:481-92.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.5673>

Correspondencia:

Andrés Puerto, IPS Universitaria Sede Prado, Calle 44 No 51-31, Bloque B, Medellín, Colombia
Teléfono: (574) 444 9570
jandres@hotmail.fr

Contribución de los autores:

Andrés Puerto y Susana Uribe: estructuración del proyecto, reclutamiento de los pacientes y escritura del manuscrito

Víctor Calvo: diseño de la metodología del proyecto y análisis estadístico final

Ricardo Cardona: estructuración del proyecto y escritura del manuscrito

Financiación:

Este proyecto fue financiado por la convocatoria interinstitucional IPS Universitaria – Universidad de Antioquia 2017

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

El asma es un problema de salud mundial, una enfermedad crónica y potencialmente grave que afecta, aproximadamente, a 300 millones de personas de todas las edades, países y grupos étnicos (1). En Colombia, la prevalencia aumentó del 10 % en el 2004 (2) al 12,1 % en el 2010 (3).

Sus síntomas incluyen disnea, tos, opresión en el pecho y sibilancias asociadas con disminución del flujo de aire espiratorio con reversibilidad en la espirometría previa al uso de broncodilatadores y la posterior (4). Hay diferentes factores asociados con el desarrollo de la enfermedad y su variabilidad en el tiempo y según la población, entre ellos, los factores genéticos que, sin embargo, por sí solos no son determinantes (5).

La atopia se reconoce como el principal factor de riesgo no modificable para el desarrollo del asma. Se estima que entre el 60 y el 80 % de los pacientes asmáticos puede tener una sensibilización mediada por la inmunoglobulina E (IgE) a alguna sustancia del medio ambiente, lo cual sugiere una fuerte relación entre dicha sensibilización y el desarrollo de la enfermedad (6).

Esta reacción inflamatoria mediada por IgE de tipo 2 es crucial en el asma alérgica (7), por lo que la inmunoterapia con extracto alérgico es la única que modifica el curso natural de la enfermedad, cambiando la reacción inflamatoria a una mediada por Th1 (8), con lo que se logra una mejoría clínica duradera hasta en el 70 % de los pacientes tratados, porcentaje que varía según el órgano afectado y el extracto de alérgeno utilizado (9).

En Colombia, ya se hizo un estudio para evaluar el impacto de la inmunoterapia en pacientes con asma alérgica, sin embargo, al año de seguimiento hubo limitaciones debido al reducido tamaño de la muestra (10). En este contexto, en este estudio se evaluó el impacto de la inmunoterapia subcutánea en una muestra de pacientes pediátricos con asma atendidos en un servicio hospitalario de referencia en alergología.

Materiales y métodos

Se hizo un estudio observacional descriptivo con componente analítico de corte transversal. Se reclutaron 62 pacientes del proyecto *Research About Tropical Trends in Asthma* (RATTA) (11) llevado a cabo en el 2016, el cual incluyó 150 pacientes de Medellín con edades entre los 6 y los 17 años y diagnóstico clínico de asma basado en la escala de la *Global Initiative for Asthma*, (GINA) (4) y confirmado mediante espirometría antes y después de usar el broncodilatador.

El estudio buscaba hacer una caracterización clínica y sociodemográfica de los pacientes con asma y de los factores asociados con la enfermedad, como la cuantificación de IgE y la sensibilización a alérgenos. Dicho estudio se continuó para determinar cuáles de estos pacientes recibían inmunoterapia y cuál era su impacto en la enfermedad, por lo que la selección de los pacientes obedeció a la conveniencia clínica (12).

Se hizo un análisis retrospectivo de las historias clínicas de los participantes en el proyecto RATTA; los criterios de inclusión fueron el haber recibido, por lo menos, seis dosis de inmunoterapia con extracto de dos ácaros (*Dermatophagoides farinae* y *Dermatophagoides pteronyssinus*) de polvo doméstico (*House Dust Mite*, HDM) o de tres (*D. farinae*, *D. pteronyssinus* y *Blomia tropicalis*), administradas por vía subcutánea.



Figura 1. Estudio RATTA (*Research About Tropical Trends in Asthma*)

Se usaron extractos alérgicos polimerizados inyectables (Alxoid®) o extractos alérgicos glicerinados por vía sublingual (Oraltek®), ambos de Inmunotek. Para la evaluación de las historias clínicas, se usó el *Asthma Control Test*™ (ACT) en la versión pediátrica para los pacientes de 4 a 11 años de edad.

Este consiste en cinco preguntas relacionadas con la frecuencia de los síntomas asmáticos (sibilancias, tos nocturna y diurna, tos con la actividad física, despertares nocturnos) y el uso de medicación de rescate requerida por el paciente en las cuatro semanas previas; un puntaje de 25 corresponde al asma totalmente controlada, uno entre 20 y 16, a la bien controlada, y uno de 5 a 15, a la no controlada (13).

La puntuación en la escala de tratamiento de la GINA evalúa la medicación necesaria para el control del asma y clasifica a los pacientes en cinco grados con un puntaje de 1 a 5. Los grados 1 y 2 corresponden a pacientes con medicación para controlar el asma leve y, el grado 5, a aquellos que necesitan medicamento para el asma grave. Los datos obtenidos de las historias antes de empezar la inmunoterapia se superpusieron a los de las escalas y así se asignó el puntaje en el ACT y el grado de tratamiento de la GINA, según lo explicado. Los pacientes seleccionados debían tener datos de espirometría previos a la inmunoterapia.

El estudio RATTA (*Research about Tropical Trends in Asthma*) contó con 150 pacientes. Se hizo una revisión de las historias clínicas que cumplían con los criterios establecidos; se encontraron 86 historias evaluables, de las cuales 24 no tenían datos de espirometría ni número mínimo de dosis de inmunoterapia. Es decir, 62 cumplían con los criterios mencionados y eran evaluables (figura 1), por lo que se les invitó a formar parte del estudio mediante llamadas telefónicas y se evaluó su estado de salud en el momento del estudio. Se excluyeron los pacientes con otras enfermedades pulmonares y quienes no cumplían con los requisitos mencionados. Se excluyeron los pacientes con otras enfermedades pulmonares y quienes no cumplían con los requisitos mencionados. A todos los participantes se les explicaron los riesgos y beneficios, se les pidió el consentimiento informado y sus respuestas al cuestionario modificado y abreviado del Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas (DANE) para obtener información sobre las condiciones de la vivienda y la interacción con factores como el tabaquismo. Se midió la talla, el peso y se calculó el índice de masa corporal (IMC).

La evaluación y clasificación de la rinitis se hizo según la puntuación de la *Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma* (ARIA) (14). La reacción a la inmunoterapia se evaluó con base en los puntajes del ACT y la escala de tratamiento de la GINA y los resultados de la espirometría previos a su

inicio y en el momento de la evaluación clínica del estudio para determinar el número de dosis que llevaban hasta ese momento. Se les preguntó por su percepción de la reacción a la inmunoterapia mediante una escala visual análoga y se clasificaron como, sin mejoría, cuando el puntaje era menor del 50 %, como mejoría parcial, cuando era del 50 al 90 % y, como mejoría total, cuando era de más del 90 %.

Se evaluó el efecto de la inmunoterapia específica con alérgenos, teniendo en cuenta la variable del tiempo para un mínimo de seis dosis y un máximo de 54 dosis. El efecto positivo de la inmunoterapia se definió como un aumento en el puntaje del ACT y una disminución en el grado de la GINA entre el momento de evaluación del paciente y lo registrado en la historia clínica antes de iniciar la inmunoterapia. El efecto negativo se determinó cuando no se registró ningún cambio en el puntaje del ACT o el grado de la GINA o cuando hubo una disminución en el puntaje del ACT y un aumento en el grado de la GINA.

Por último, la espirometría previa al broncodilatador y la posterior estuvieron a cargo de personal entrenado utilizando un espirómetro Easy on-PC™ previamente calibrado y con un equipo capaz de definir los valores de límite inferior de normalidad y los parámetros del estudio PLATINO (Suramérica). Todos los datos se consignaron en la historia clínica del paciente. La recolección de datos, el análisis de las historias clínicas que cumplieran con los criterios de inclusión y las pruebas, se realizaron entre mayo del 2018 y enero del 2020.

Este estudio fue aprobado por el comité de ética de la IPS Universitaria, sede Medellín, en el 2018, y se ajusta a las normas éticas estipuladas en la Declaración de Helsinki, además de las de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Protección Social. Dado que los procedimientos hacen parte de la evaluación clínica rutinaria, el estudio no representó un riesgo adicional al que tiene comúnmente un paciente que asiste a la consulta de alergología clínica.

Plan de análisis estadístico

Para el análisis descriptivo de los aspectos sociodemográficos y clínicos de los pacientes, se utilizaron distribuciones absolutas y relativas, e indicadores de resumen como la media aritmética, la desviación estándar, y valores mínimos y máximos. Se estableció el criterio de normalidad de algunas variables mediante la prueba de Shapiro-Francia.

Para evaluar el impacto de la inmunoterapia por medio de la puntuación del ACT, de los grados de la GINA y de la espirometría previa y la posterior al broncodilatador, se utilizó la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon complementada con el tamaño de efecto del coeficiente de correlación biserial, antes y después de la inmunoterapia.

Para evaluar la decisión clínica basada en el ACT, se utilizó la prueba de McNemar-Bowker; se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

En cuanto a la relación de las condiciones de la inmunoterapia según la mejoría del paciente después de aplicarla, se utilizó la prueba de ji al cuadrado de independencia de la razón de verosimilitud, y la fuerza de asociación se evaluó con base en la razón de proporción (RP), con sus respectivos intervalos de confianza del 95 % (IC95%).

Resultados

Aspectos sociodemográficos

De los 62 asmáticos incluidos, 74 % eran hombres y 25 % eran mujeres; y la edad promedio fue de $11,3 \pm 2,8$ años, con un rango entre 6 y 16. El 96,8 % de los participantes vivía en zonas urbanas y el 3,2 % en zonas rurales. En cuanto al IMC, se observó que el 78,3 % de los pacientes estaba en los rangos de la normalidad, el 6,7 % tenía bajo peso y, el 15,0 %, sobrepeso; no se encontraron pacientes con obesidad. Solo el 16,7 % de los pacientes informó convivir con fumadores.

Aspectos clínicos de los pacientes pediátricos tratados con inmunoterapia

El 96,8 % de los pacientes sufría rinitis asociada con el asma, el 27,4 %, de dermatitis atópica, y el 61,3 %, de conjuntivitis alérgica. El promedio de edad al inicio de los síntomas respiratorios era de 1,7 años, y había antecedente de bronquiolitis en 27,4 % de ellos, definida esta como la presencia de sibilancias antes de los tres años; en el análisis de este subgrupo de pacientes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Al inicio de la inmunoterapia, la sensibilización predominante fue con *D. pteronyssinus* y *D. farinae*, en ambos casos con el 93,6 %, seguida por sensibilización con *B. tropicalis* en el 58,1 %. El 62,9 % de los pacientes estaba en inmunoterapia con dos alérgenos y el 33,9 % con tres, en tanto que el 3,2 % había comenzado con dos y había cambiado a tres alérgenos después de las primeras seis dosis. La vía subcutánea se empleaba en el 90,3 % de los casos, y dos de los pacientes evaluados habían iniciado con administración sublingual y pasaron a la subcutánea en el curso de la aplicación de las seis primeras dosis.

Se evaluó la percepción de la mejoría con la inmunoterapia en un rango de 0 a 100 %, usando la escala visual análoga: 0 % correspondía a ausencia de mejoría y 100% a una completa mejoría de los síntomas bronquiales. Se encontró que el 9,75 % ($n=6$) de los pacientes tuvo una mejoría por debajo del 50 %, el 48,4 % ($n=30$), una entre el 50 y el 80 %, y la mejoría en el 41,9 % ($n=26$) de los pacientes fue igual o mayor del 90 %. El promedio de dosis de inmunoterapia recibidas hasta el momento de la evaluación fue de $28 \pm 12,5$, con un rango entre 6 y 54.

Efecto de la inmunoterapia según el ACT, la GINA y la espirometría

Al evaluar el efecto clínico de la inmunoterapia en el puntaje del ACT, se encontró que, antes de iniciarla, 30 pacientes tenían asma no controlada, 28 tenían un buen control y en 4 pacientes la enfermedad estaba totalmente controlada. El 30,0 % ($n=9$) de los 30 pacientes con asma no controlada continuó en esta condición después de la inmunoterapia, el 46,7 % ($n=14$) logró un buen control y el 23,3 % ($n=7$) alcanzó un control total de la enfermedad.

El 10,7 % ($n=3$) de los 28 pacientes con buen control del asma empeoraron después de la inmunoterapia según el puntaje del ACT, que los calificaba con asma no controlada, el 42,9 % ($n=12$) continuó con un buen control, en tanto que el 46,4 % ($n=13$) logró un control total del asma.

Cuando se evaluó a los cuatro pacientes que tenían un control total del asma al inicio, se encontró que ninguno de ellos presentó asma no controlada, en tanto que el puntaje del ACT del 50 % (n=2) disminuyó y llegaron a un buen control, y el 50 % (n=2) continuó con un control total.

El 19,4 % (n=12) de los 62 pacientes evaluados después del tratamiento con inmunoterapia, tuvo puntajes del ACT correspondientes a asma no controlada, el 45,2 % (n=28) logró un buen control del asma y el 35,5 % (n=22) alcanzó un puntaje de 25, es decir, un control total del asma (cuadro 1). Estos resultados fueron estadísticamente significativos (p=0,00006) (figura 2A).

Efecto de la inmunoterapia en el puntaje del ACT según subgrupos

Se hizo un análisis por subgrupos con base en el número de dosis de inmunoterapia recibidas hasta el momento de la evaluación, siguiendo criterios establecidos en la literatura especializada que sugieren que la respuesta clínica a mejoría clínica con la inmunoterapia se aprecia principalmente entre las 12 y las 18 dosis (15). Los pacientes se agruparon en aquellos con menos de 18 dosis y aquellos con más de 18 dosis.

Cuadro 1. Efecto de la inmunoterapia según la puntuación del ACT

Puntuación del ACT (McNemar-Bowker; p=0,096)	Antes de la inmunoterapia		Después del tratamiento con inmunoterapia					
			Asma no controlada		Buen control del asma		Control total del asma	
			n (%)		n (%)		n (%)	
	18 dosis n (%)	Más de 18 dosis n (%)	6-18 dosis	Más de 18 dosis	6-18 dosis	Más de 18 dosis	6-18 dosis	Más de 18 dosis
Asma no controlada	9 (100)	21 (100)	2 (22,2)	7 (23,3)	4 (44,4)	10 (47,6)	3 (33,3)	4 (19)
Buen control del asma	11 (100)	17 (100)	2 (18,2)	1 (5,9)	4 (36,4)	8 (47,1)	5 (45,5)	8 (47,1)
Control total del asma	1 (100)	3 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100)	1 (33,3)	0 (0)	2 (66,7)
Total	21 (100)	41 (100)	4 (19)	8 (19,5)	9 (42,9)	19 (46,3)	8 (38,1)	14 (34,1)

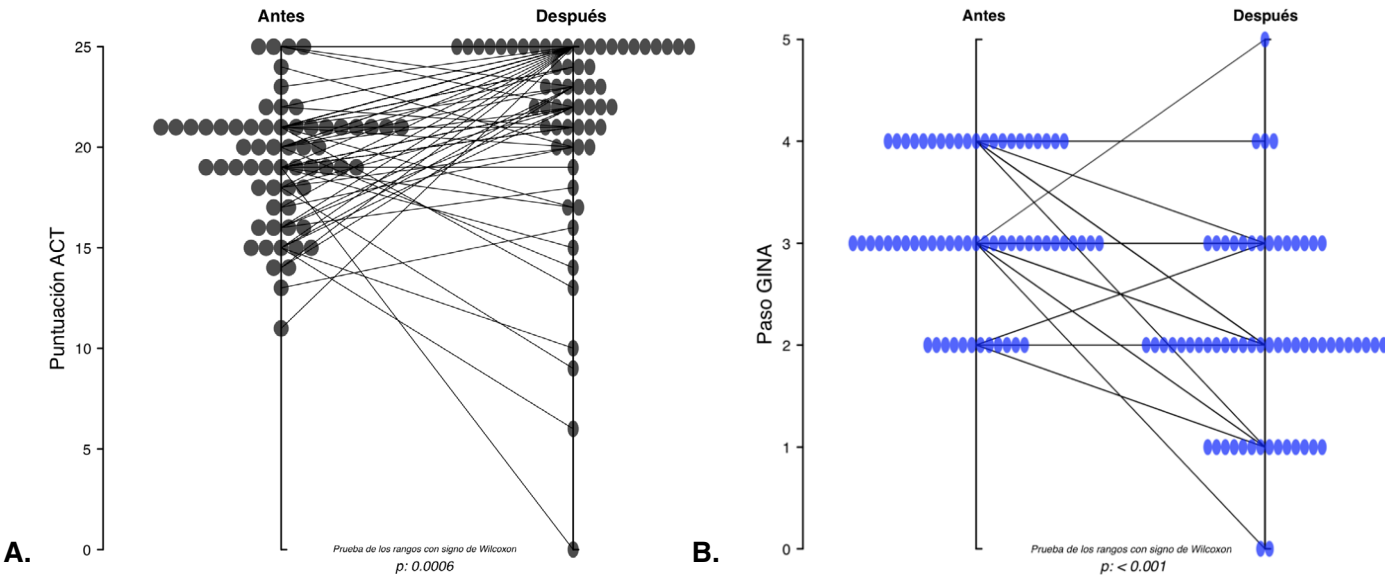


Figura 2. Efecto de la inmunoterapia según: A. el puntaje del ACT y B. el de la GINA

Efecto de la inmunoterapia en la condición clínica según el ACT en pacientes con 6 a 18 dosis

Un total de 21 pacientes había recibido menos de 18 dosis hasta el momento de la evaluación. De ellos, nueve tenían diagnóstico de asma no controlada según el ACT y, de estos, el 22,2 % (n=2) mantenía esta condición en el momento de evaluar la inmunoterapia, el 44,4 % (n=4) logró un buen control del asma y el 33,3 % (n=3) tuvo puntajes indicativos de un control total del asma.

Se encontró que 11 de los 21 pacientes tenían un buen control del asma antes de iniciar la inmunoterapia y, de ellos, el 18,2 % (n=2) presentaba asma no controlada en el momento de evaluar la inmunoterapia, 36,4 % (n=4) continuaba teniendo un buen control del asma y un 45,5 % (n=5) logró el control total.

Un solo paciente con menos de 18 dosis de inmunoterapia tenía control total de asma antes de iniciarla y, en el momento de la evaluación, tuvo puntajes del ACT que indicaban un buen control del asma.

El 19 % (n=4) de los 21 pacientes con menos de 18 dosis no logró el control del asma según los puntajes del ACT en el momento de la evaluación de la inmunoterapia, el 42,9 % (n=9) tuvo un buen control y el 38,1 % (n=8), un control total del asma. Estos resultados no fueron estadísticamente significativos ($p=0,096$) (cuadro 1).

Efecto de la inmunoterapia según la puntuación del ACT en pacientes con más de 18 dosis

De los 62 pacientes del estudio, 41 habían recibido más de 18 dosis hasta el momento de la evaluación, 21 de ellos con asma no controlada. De estos 21, el 23,3 % (n=7) continuaba en la misma condición en el momento de la evaluación, el 47,6 % (n=10) alcanzó un buen control del asma y el 19 % (n=4) logró su control total.

Del grupo de 41, en 17 pacientes con un buen control del asma según el puntaje del ACT previo a la inmunoterapia, en el momento de la evaluación, se encontró que: en 5,9 % (n=1), disminuyeron los puntajes del ACT y el asma se consideró como no controlada; en 47,1 % (n=8), continuó el buen control del asma, y en 47,1 % (n=8), se logró el control total del asma.

De los 41 pacientes evaluados en este subgrupo, el 19,5 % (n=8) tenía asma no controlada en el momento de la evaluación, el 46,3 % (n=19) un buen control de la enfermedad y el 34,1 % (n=14) alcanzó el control total del asma. Los resultados fueron estadísticamente significativos ($p=0,001$) (cuadro 1).

Efecto clínico de la inmunoterapia según el puntaje de resultados terapéuticos de la GINA

Al evaluar el tratamiento para el asma según el grado de la GINA, se encontró que ningún paciente se encontraba en el paso 1 de tratamiento, 19,4 % (n=12) estaba en el paso 2, el 46,8 % (n=29) en el paso 3, el 33,8 % (n=21) en el paso 4 y ningún paciente estaba en el paso 5. En la evaluación posterior al inicio de la inmunoterapia, el 3,22 % (n=2) no recibía ningún medicamento para el asma, el 22,6 % (n=14) estaba en el paso 1, el 45,2 % (n=28) en el paso 2, el 22,6 % (n=14) en el paso 3, el 4,8 % (n=3) en el paso 4 y el 1,6 % (n=1) en el paso 5 (cuadro 2). Se observó que antes del inicio de

la inmunoterapia la mayoría de los pacientes evaluados (80,6 %) estaba en los pasos 3 y 4 de gradación de la GINA, y en el momento de la evaluación posterior, la mayoría (67,6 %) estaba en los pasos 1, 2 y 3. Estos resultados fueron estadísticamente significativos ($p=0,001$) (figura 2B).

Efecto de la inmunoterapia según la espirometría antes y después del uso de broncodilatador

Según el volumen espiratorio forzado en un segundo (VEF₁) y el porcentual, la mediana de los valores anteriores al uso de los agonistas beta-2 antes de la inmunoterapia era de 1,52 L y, después, de 1,87 L, con un valor de $p<0,0001$ y un tamaño de efecto de -0,34 (-0,48 a -0,17). Los valores del VEF₁ posteriores al uso de los agonistas beta-2 fueron de 1,66 L antes del inicio de la inmunoterapia y, después, de 1,87 L, con un valor de $p=0,0005$ y un tamaño de efecto de -0,28 (-0,43 a -0,11). Al evaluar los valores de VEF₁ porcentual antes y después de la inmunoterapia, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas y los tamaños del efecto fueron casi nulos. El cambio en el VEF₁ tanto porcentual como numérico (litros) después de la inmunoterapia no fue estadísticamente significativo al compararlo con los valores previos (cuadro 3).

Evaluación del efecto de la inmunoterapia en la población de estudio

Esta evaluación tuvo en cuenta dos variables: el puntaje del ACT y el grado de la GINA. El 79 % ($n=49$) de los pacientes mostró mejoría después de la inmunoterapia según la puntuación del ACT y el grado de la GINA, es decir, esta tuvo un impacto positivo. En la evaluación por subgrupos, los menores de 10 años no presentaron cambios significativos en los puntajes comparados con los mayores de 10 años. En cuanto a las comorbilidades, el 80 % de los pacientes con rinitis registraron mejoría en el puntaje del ACT y el grado de la GINA, como también sucedió en el 76,5 % de aquellos con dermatitis atópica y en el 79,8 % de aquellos con conjuntivitis. El 72,2 % de los pacientes sensibilizados con *B. tropicalis* y un 81 % de los sensibilizados con *D. pteronyssinus* presentaron mejores puntajes en el ACT y la GINA, y aunque el porcentaje de cambio en ambos casos fue menor en los pacientes sensibilizados con *B. tropicalis* frente a los sensibilizados con *D. pteronyssinus*, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (cuadro 4).

Cuadro 2. Efecto de la inmunoterapia según el escalón terapéutico de la estrategia de la GINA

Escalón terapéutico estrategia de la GINA (p<0,001)	Antes de la inmunoterapia n (%)	Después del tratamiento con inmunoterapia						
		Paso 0 n (%)	Paso 1 n (%)	Paso 2 n (%)	Paso 3 n (%)	Paso 4 n (%)	Paso 5 n (%)	
Paso 2	12 (100)	0 (0,0)	5 (41,7)	3 (25,0)	4 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Paso 3	29 (100)	2 (6,9)	6 (20,7)	13 (44,8)	7 (24,1)	0 (0,0)	1 (3,4)	
Paso 4	21 (100)	0 (0,0)	3 (14,3)	12 (57,1)	3 (14,3)	3 (14,3)	0 (0,0)	
Total	62 (100)	2 (3,2)	14 (22,6)	28 (45,2)	14 (22,6)	3 (4,8)	1 (1,6)	

Cuadro 3. Efecto de la inmunoterapia según la espirometría previa y posterior al uso de broncodilatador

	Antes Me (RI)	Después Me (RI)	P	Tamaño del efecto rbis (I.C. 95%)
VEF ₁ previo (L)	1,52 (0,70)	1,87 (1,07)	<0,0001	-0,34 (-0,48 a -0,17)
VEF ₁ posterior (L)	1,66 (0,64)	1,87 (1,13)	0,0005	-0,28 (-0,43 a -0,11)
VEF ₁ previo %	96 (15)	96 (19)	0,8393	0,01 (-0,17 a 0,19)
VEF ₁ posterior %	99 (16)	98,5 (17)	0,8022	0,07 (-0,11 a 0,24)
% cambio en el VEF ₁	3,5 (9)	4,5 (10)	0,7862	0,04 (-0,14 a 0,22)

Me: mediana; RI: rango Intercuartílico; rbis: correlación biserial

Cuadro 4. Evaluación del efecto de la inmunoterapia en población pediátrica con diagnóstico de asma

Variables		Impacto de la inmunoterapia		p	RP (IC _{95%})
		Efecto positivo (%)	Efecto negativo (%)		
Sexo	Hombres	38 (82,6)	8 (17,4)	0,255	1,20 (0,84 a 1,71)
	Mujeres	11 (68,8)	5 (31,3)		
Grupo de edad (años)	≤10	20 (76,9)	6 (23,1)	0,730	0,95 (0,73 a 1,24)
	>10	29 (80,6)	7 (19,4)		
Estrato económico	Bajo	16 (76,2)	5 (23,8)	0,696	0,95 (0,71 a 1,26)
	Medio-alto	33 (80,5)	8 (19,5)		
Rinitis	Sí	48 (80,0)	12 (20,0)	0,355	1,60 (0,40 a 6,43)
	No	1 (50,0)	1 (50,0)		
Dermatitis	Sí	13 (76,5)	4 (23,5)	0,763	0,96 (0,71 a 1,29)
	No	36 (80,0)	9 (20,0)		
Conjuntivitis	Sí	30 (78,9)	8 (21,1)	0,984	0,99 (0,77 a 1,30)
	No	19 (79,2)	5 (20,8)		
Sensibilización con <i>B. tropicalis</i>	Sí	26 (72,2)	10 (27,8)	0,111	0,82 (0,64 a 1,04)
	No	23 (88,5)	3 (11,5)		
Sensibilización con <i>D. farinae</i>	Sí	46 (79,3)	12 (20,7)	0,841	1,06 (0,59 a 1,89)
	No	3 (75,0)	1 (25,0)		
Sensibilización con <i>D. pteronyssinus</i>	Sí	47 (81,0)	11 (19,0)	0,181	1,62 (0,60 a 4,35)
	No	2 (50,0)	2 (50,0)		
Tipo de inmunoterapia	Con dos alérgenos	32 (82,1)	7 (17,9)	0,592	1,07 (0,81 a 1,43)
	Con tres alérgenos	16 (76,2)	5 (23,8)		

Discusión

Las personas con asma alérgica a los ácaros del polvo doméstico, uno de los alérgenos más comunes involucrados en esta enfermedad (16), presentan exacerbaciones recurrentes, aumento de la gravedad y disminución de la función pulmonar. La inmunoterapia con alérgenos específicos es la única que ha demostrado eficacia en la modulación persistente del curso natural de esta enfermedad, por lo cual se recomienda en varias guías para tratar el asma alérgica (4).

En el presente estudio se seleccionaron 62 participantes que cumplieran con los criterios de selección entre los 150 pacientes del estudio RATTA. La selección se hizo por conveniencia (12) porque se apuntaba más a una inferencia científica que a una de representatividad poblacional estadística; por ello, los participantes debían cumplir con criterios muy específicos para garantizar la calidad de la información obtenida. Los resultados se basaron en tres elementos de verificación principales: el puntaje del ACT, el grado de la GINA y los cambios del VEF1 en la espirometría, además de la evaluación de la percepción de los pacientes con respecto a la mejoría mediante una escala visual análoga. La combinación del puntaje del ACT y el grado de la GINA buscó determinar el efecto de la inmunoterapia y los análisis de subgrupos se orientaron a delimitar el número de dosis de inmunoterapia hasta el momento de la evaluación presencial, ya que este varía en un rango amplio entre 6 y 54 dosis, como ya se mencionó en la metodología.

La división en dos grupos se basó en lo establecido en la literatura, es decir, el número de dosis con el que se espera una mejoría clínica es de 12 a 18. De los 62 pacientes evaluados, 30 tenían asma no controlada antes del inicio de la inmunoterapia, 7 (23,3 %) habían logrado un control total de la enfermedad en el momento de la evaluación, y 10 (47,6), un buen control. De los 28 pacientes con buen control del asma, 12 (42,9 %) continuaron teniéndolo y 13 lograron un control total de la enfermedad. Es decir, 50 pacientes de los 62 evaluados tenían un buen control o control total del asma en el momento de la evaluación.

Los resultados fueron estadísticamente significativos y hubo una mejoría de el puntaje del ACT. Al evaluar los subgrupos según el número de dosis de inmunoterapia (hasta 18 dosis y más de 18 dosis), se encontraron diferencias importantes también con los puntajes del ACT, con una tendencia al buen control o control total del asma en el momento de la evaluación. Estos datos no alcanzaron una significación estadística en el subgrupo de hasta 18 dosis. Sin embargo, debe aclararse que el tamaño de la muestra en este subgrupo ($n=22$) era pequeño, lo que pudo ocasionar que no se logaran valores de p significativos, ello sin menospreciar la mejoría importante de los datos obtenidos en el subgrupo con más de 18 dosis de inmunoterapia.

Al evaluar según la gradación de la GINA, se encontró que, antes de la inmunoterapia, el 80 % de los pacientes se encontraba en los grados 3 o 4 de la GINA y que, en la evaluación posterior, el 67,7 % se encontraba en los grados 3 o 4 y solo uno (4,8 %) estaba en el grado 4. Estos datos fueron estadísticamente significativos ($p=0,001$). Se presentaron cambios importantes en el porcentaje de pacientes con un resultado terapéutico de grado 3 (46,8 a 22,6 %) o de grado 4 (33,8 a 4,8 %) (figura 2), y que avanzaron a los grados 1 y 2. Estos cambios en la gradación del tratamiento según la GINA antes y después de la inmunoterapia, se reflejaron en la disminución del número de medicamentos y las dosis utilizadas para controlar el asma, lo que se correlaciona con la mejoría en el puntaje del ACT en cuanto a la sintomatología.

Estos resultados son similares a los de otros estudios, por ejemplo, el metanálisis de Abramson, *et al.*, en el cual se analizaron 42 estudios clínicos aleatorizados sobre la inmunoterapia subcutánea contra los ácaros del polvo casero. Se encontró que este tratamiento redujo los síntomas del asma y disminuyó la hiperreactividad bronquial (17). En la revisión sistemática de Dhami, *et al.*, que incluyó 51 estudios sobre las inmunoterapias subcutánea y sublingual en niños y adultos, se encontró que estos tratamientos pueden reducir en forma significativa el puntaje en las escalas de síntomas a corto plazo y sin producir reacciones adversas graves, en el asma alérgica inducida por ácaros del polvo doméstico (18).

Cuando se evaluó el efecto de la inmunoterapia combinando la puntuación del ACT y la gradación de la GINA, el 79 % ($n=49$) de los pacientes evidenció mejoría, lo que se considera como un impacto positivo. Este resultado no se vio influenciado por condiciones como la edad, las comorbilidades asociadas o las condiciones sociodemográficas. En general, hubo una correlación de este efecto positivo determinado de manera objetiva con los datos sobre la percepción de la efectividad de la inmunoterapia clasificada por los pacientes mediante la escala visual análoga, pues el 45,2 % ($n=28$) respondió que entre 50 y 80 %, y el 41,9 % ($n=26$) respondió que igual o mayor de 90 %. Por lo tanto, hubo una correlación con el porcentaje de pacientes que mostraron mejoría en los puntajes, lo que permite pensar que los resultados obtenidos mostraron un efecto en general positivo objetivado mediante el puntaje del ACT y la gradación de la GINA. No se encontraron cambios estadísticamente significativos en los valores de VEF1 previos y posteriores al uso de broncodilatadores y antes de iniciar la inmunoterapia, comparados con los registrados en el momento de la evaluación. Asimismo, se observó que los valores porcentuales del VEF1, previos y posteriores, se mantuvieron estables en los dos momentos de la inmunoterapia.

El porcentaje de sensibilización a los ácaros del polvo casero fue de más del 90 % con *D. farinae* y *D. pteronyssinus*, lo que coincide con lo reportado en la literatura mundial (19). Además, el 60 % de los pacientes presentó sensibilización a *B. tropicalis*, lo que es alto comparado con lo reportado en estudios como el de Sánchez, *et al.*, en el cual el 39 % de los participantes mostraron sensibilización a este alérgeno (20). Solo 33 % de los pacientes pediátricos en el presente estudio estaba recibiendo inmunoterapia con extracto de tres alérgenos, el otro 62 % recibía extracto con dos alérgenos. Se cree que esta prevalencia en la sensibilización comparada con la de otros países europeos o norteamericanos es más alta en Colombia por ser un país situado en el trópico (21).

En comparación con otros estudios, el presente es uno de los que más pacientes pediátricos ha evaluado (18). Por otra parte, en el estudio de Yepes, *et al.*, se evaluó el efecto de la inmunoterapia con *D. farinae* y *D. pteronyssinus* sobre la calidad de vida de pacientes con rinitis y asma alérgica en una muestra colombiana mediante dos encuestas validadas. Al año de seguimiento, se observó que un porcentaje considerable presentaba cambios positivos en términos de calidad de vida, aunque no se evaluaron los cambios en los puntajes de resultados terapéuticos. Este estudio, sin embargo, tuvo la limitación de contar con una reducida muestra de pacientes (10).

En cuanto a nuestro estudio, las limitaciones incluyeron el número de pacientes, aunque ya se mencionó este apuntaba más a una inferencia científica que a una inferencia estadística de representatividad poblacional. Además, tampoco hubo un grupo de control para determinar el efecto de la inmunoterapia en el asma, y fue amplio el rango de las dosis empleadas hasta el momento de la evaluación. Por último, en futuros trabajos de este mismo tipo, sería importante usar otras escalas diferentes a la del ACT y la GINA, pues la inmunoterapia subcutánea no solo impacta en la sintomatología, sino en la calidad de vida, la disminución del uso de medicamentos, etc.

La inmunoterapia específica con alérgenos sigue siendo un tratamiento relevante que permite disminuir el uso de medicamentos y el número de exacerbaciones en pacientes con asma alérgica. En la población pediátrica ha demostrado tener un efecto positivo y estadísticamente significativo, con una mejoría cercana al 60 %. No se logró evidenciar un efecto importante en la mejoría de los valores del VEF1 en la espirometría asociados con la inmunoterapia. Sin embargo, debe recordarse que, para que un paciente pueda iniciarla, debe tener una espirometría con un VEF1 mínimo de más del 70 %. Además, se ha establecido, la relevancia de los ácaros del polvo casero como fuente de exacerbación de la enfermedad. En el presente estudio, se pudo evidenciar un efecto positivo, según la escala del ACT y la de resultados terapéuticos de la GINA.

Agradecimientos

Queremos agradecer a todos los pacientes y docentes de la Universidad de Antioquia que contribuyeron al resultado final del estudio.

Referencias

1. Russell RJ, Brightling C. Pathogenesis of asthma: Implications for precision medicine. Clin Sci. 2017;131:1723-35. <https://doi.org/10.1042/CS20160253>
2. Dennis R, Caraballo L, García E, Caballero A, Aristizábal G, Córdoba H, *et al.* Asthma and other allergic conditions in Colombia: A study in 6 cities. Ann Allergy Asthma Immunol. 2004;93:568-74. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)61265-3](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)61265-3)

3. Dennis RJ, Caraballo L, García E, Rojas MX, Rondón MA, Pérez A, *et al.* Prevalence of asthma and other allergic conditions in Colombia 2009-2010: A cross-sectional study. *BMC Pulm Med.* 2012;12:17. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-12-17>
4. Global Initiative for Asthma. Pocket guide for asthma management: For adults and children over 5 years. GINA; 2019. Fecha de consulta: 26 de noviembre de 2019. Disponible en: <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2019/04/GINA-2019-main-Pocket-Guide-wms.pdf>
5. Bousquet J, Mantzouranis E, Cruz AA, Ait-Khaled N, Baena-Cagnani CE, Bleecker ER, *et al.* Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: Document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126:926-38. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.07.019>
6. Tran TN, Zeiger RS, Peters SP, Colice G, Newbold P, Goldman M, *et al.* Overlap of atopic, eosinophilic, and TH2-high asthma phenotypes in a general population with current asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2016;116:37-42. <https://doi.org/10.1016/j.anaai.2015.10.027>
7. Lötval J, Akdis CA, Bacharier LB, Bjerrmer L, Casale TB, Custovic A, *et al.* Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127:355-60. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.037>
8. Posa D, Perna S, Resch Y, Lupinek C, Panetta V, Hofmaier S, *et al.* Evolution and predictive value of IgE responses toward a comprehensive panel of house dust mite allergens during the first 2 decades of life. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139: 541-9.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.08.014>
9. Durham SR. Allergen immunotherapy: 100 years on. *Clin Exp Allergy.* 2011;41:1171. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03843.x>
10. Yepes-Núñez JJ, Gómez C, Espinoza Y, Cardona R. Impacto de la inmunoterapia subcutánea con *Dermatophagoides farinae* y *Dermatophagoides pteronyssinus* sobre la calidad de vida de pacientes con rinitis y asma alérgica. *Biomédica.* 2014;34:282-90. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.1744>
11. Gaviria R, Ocampo J, Londoño J, Calvo V, Cardona R, Sánchez J. Sensibilización IgE y las condiciones sociodemográficas como determinantes en la gravedad del asma. *Revista Alergia México.* 2017;64:439. <https://doi.org/10.29262/ram.v64i4.291>
12. Rothman KJ, Gallacher JE, Hatch EE. Why representativeness should be avoided. *Int J Epidemiol.* 2013;42:1012-4. <https://doi.org/10.1093/ije/dys223>
13. Schatz M, Sorkness CA, Li JT, Marcus P, Murray JJ, Nathan RA, *et al.* Asthma Control Test: Reliability, validity, and responsiveness in patients not previously followed by asthma specialists. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117:549-56. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.01.011>
14. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, *et al.* Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy.* 2008;63(Suppl.86):8-160. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2007.01620.x>
15. Roberts G, Pfaar O, Akdis CA, Ansotegui IJ, Durham SR, Gerth van Wijk R, *et al.* EAACI Guidelines on Allergen Immunotherapy: Allergic rhinoconjunctivitis. *Allergy.* 2018;73:765-98. <https://doi.org/10.1111/all.13317>
16. Gandhi VD, Davidson C, Asaduzzaman M, Nahirney D, Vliagoftis H. House dust mite interactions with airway epithelium: Role in allergic airway inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2013;13:262-70. <https://doi.org/10.1007/s11882-013-0349-9>
17. Abramson MJ, Puy RM, Weiner JM. Injection allergen immunotherapy for asthma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010;CD001186. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd001186.pub2>
18. Dhami S, Kakourou A, Asamoah F, Agache I, Lau S, Jutel M, *et al.* Allergen immunotherapy for allergic asthma: A systematic review and meta-analysis. *Allergy.* 2017;72:1825-48. <https://doi.org/10.1111/all.13208>
19. Acevedo N, Zakzuk J, Caraballo L. House dust mite allergy under changing environments. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2019;11:450-69. <https://doi.org/10.4168/aair.2019.11.4.450>
20. Sánchez-Caraballo J, Diez-Zuluaga S, Cardona-Villa R. Sensitization to aeroallergens in allergic patients from Medellín, Colombia. *Rev Alerg Mex.* 2012;59:139-47.
21. Fernández-Caldas E, Puerta L, Mercado D, Lockey RF, Caraballo LR. Mite fauna, Der p I, Der f I and *Blomia tropicalis* allergen levels in a tropical environment. *Clin Exp Allergy.* 1993;23:292-7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.1993.tb00325.x>

Artículo original

Malformaciones esqueléticas y alteraciones del crecimiento en fetos de ratas con diabetes moderada

Tahiry Gómez¹, Milagros García², Leticia Bequer¹, Cindy Freire¹, María Aimee Vila², Sonia Clapés³

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

² Facultad de Medicina, Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Santa Clara, Cuba

³ Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón", Universidad de Ciencias Médicas de La Habana, La Habana, Cuba

Introducción. En la actualidad, la diabetes mellitus representa una de las condiciones médicas que complica el embarazo con mayor frecuencia, lo que afecta el crecimiento y el desarrollo fetal.

Objetivo. Determinar las malformaciones esqueléticas y alteraciones en el crecimiento en fetos de ratas Wistar diabéticas.

Materiales y métodos. Se utilizó un modelo de diabetes moderada inducida neonatalmente con estreptozotocina (STZ 100 mg/kg de peso corporal, por vía subcutánea) en ratas Wistar. En la adultez, las ratas sanas y diabéticas se aparearon con machos sanos de la misma edad y cepa. El día 20 de gestación se practicó la cesárea bajo anestesia. Se extrajeron los fetos, se pesaron y clasificaron como pequeños (PAG), adecuados (AEG) o grandes (GEG) para la edad gestacional. Los fetos seleccionados se procesaron para el análisis de anomalías esqueléticas y sitios de osificación.

Resultados. En la descendencia de las ratas diabéticas, hubo un mayor porcentaje de fetos clasificados como pequeños o grandes y un menor porcentaje de fetos con peso adecuado; el promedio de peso fetal fue menor y había menos sitios de osificación. Se observaron alteraciones en la osificación de cráneo, esternón, columna vertebral, costillas y extremidades anteriores y posteriores; y también, hubo una correlación directa entre el peso y el grado de osificación fetal.

Hubo malformaciones congénitas asociadas con la fusión y bifurcación de las costillas, así como cambios indicativos de hidrocefalia, como la forma de domo del cráneo, una amplia distancia entre los parietales y la anchura de las fontanelas anterior y posterior.

Conclusión. La diabetes moderada durante la gestación altera el crecimiento y el desarrollo fetal, que se ve afectado tanto por macrosomía y la restricción del crecimiento intrauterino como por malformaciones esqueléticas.

Palabras clave: diabetes mellitus experimental; teratogénesis; anomalías congénitas; macrosomía fetal; restricción del crecimiento fetal.

Skeletal malformations and growth disturbances in fetuses of mild diabetic rats

Introduction: Currently, diabetes mellitus represents one of the medical conditions that more frequently complicates pregnancy affecting the fetus's growth and development.

Objective: To determine the skeletal malformations and growth alterations in fetuses of diabetic Wistar rats.

Materials and methods: We used a neonatally streptozotocin-induced mild diabetes model (STZ 100 mg/kg body weight - subcutaneously) in Wistar rats. In adulthood, healthy and diabetic rats were mated with healthy males of the same age and strain. On day 20 of gestation, a cesarean was performed under anesthesia. Fetuses were removed, weighed, and classified as small (SPA), adequate (APA), and large (LPA) for the gestational age. Selected fetuses were processed for skeletal anomaly and ossification sites analysis.

Results: In the offspring of diabetic rats, there was a higher percentage of fetuses classified as small or large and a lower percentage of fetuses with adequate weight; the fetal weight mean was lower and there were fewer sites of ossification.

Alterations were observed in the ossification of the skull, sternum, spine, ribs and fore and hind limbs; and also, there was a direct correlation between fetal weight and ossification degree. There were congenital malformations associated with fusion and bifurcation of the ribs, as well as changes indicative of hydrocephaly, such as the dome shape of the skull, a wide distance between parietals, and the width of the anterior and posterior fontanels.

Conclusion: Moderate diabetes during pregnancy alters fetal growth and development with macrosomia and intrauterine growth restriction, as well as skeletal malformations.

Keywords: Diabetes mellitus, experimental; teratogenesis; congenital abnormalities; fetal macrosomia; fetal growth retardation.

Recibido: 07/10/2020

Aceptado: 03/05/2021

Publicado: 04/05/2021

Citación:

Gómez T, García M, Bequer L, Freire C, Vila MA, Clapés S. Malformaciones esqueléticas y alteraciones del crecimiento en fetos de ratas con diabetes moderada. *Biomédica*. 2021;41:493-503. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5736>

Correspondencia:

Tahiry Gómez, Calle Prolongación de 7ma e/ Avenida Hospital y Colón # 80, Santa Clara, Cuba
Teléfono: 5553 2001
tahirygh@infomed.sld.cu

Contribución de los autores:

Todos los autores participaron activamente en el diseño y la ejecución del trabajo de investigación, así como en la redacción y revisión final del manuscrito.

Financiación:

La investigación se realizó con recursos de la Unidad de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la diabetes se define como una enfermedad crónica grave que se desencadena cuando el páncreas no produce suficiente insulina o cuando el organismo no puede utilizar eficazmente la insulina que produce. La enfermedad se considera un problema de salud a nivel mundial debido a su gran incidencia y prevalencia (1). En 2019, se reportaron en el mundo 463 millones de personas adultas con diabetes mellitus y se estima que para el 2030 esta cifra aumentará a 578 millones (2).

La diabetes representa una de las condiciones médicas que con mayor frecuencia complica el embarazo. Las alteraciones en el control de la glucemia afectan a una de cada seis mujeres gestantes (2,3). En el 2019, más de 20 millones de nacidos vivos fueron hijos de madres con diabetes mellitus (2). Los fetos de madres diabéticas tienen características morfológicas, fisiológicas y patológicas diferentes debido a que se desarrollan en un ambiente intrauterino alterado (4). A pesar de los avances actuales en el cuidado de la mujer gestante con diabetes, la descendencia presenta hasta cinco veces mayor riesgo de alteraciones en el crecimiento (5,6) y malformaciones congénitas (6), siendo estas últimas una de las principales causas de muerte perinatal (6,7).

Las principales categorías de malformaciones observadas tanto en la diabetes clínica (4,8) como en la experimental (9) son las del sistema nervioso central, el cardiovascular y el musculoesquelético. Estas alteraciones se consideran secundarias a una diabetes mal controlada antes de la concepción o entre la tercera y la octava semanas de gestación, periodo embriogénico en que la mayoría de las mujeres gestantes desconocen su estado de gravidez (6,10).

La etiología, patogenia y prevención de las complicaciones inducidas por la diabetes requieren constantes esfuerzos de investigación básica y clínica (11). Los modelos animales de diabetes y gestación constituyen una importante herramienta para el estudio del desarrollo embrionario y fetal en la diabetes materna, dada la complejidad que implican estos estudios en humanos (12) o el empleo de métodos alternativos que no implican animales vivos (9).

Se han empleado diversos esquemas de inducción de la diabetes mellitus para intentar reproducir en animales los efectos de la diabetes moderada durante la gestación (11). Los resultados muestran que no siempre se logra obtener un patrón de daño como el que se desea evaluar en la descendencia. Esto se debe a las dificultades propias de un modelo experimental, en particular, cuando se pretende evaluar el crecimiento y el desarrollo de la primera generación (11,13). Con este estudio, nos propusimos estudiar las malformaciones esqueléticas y alteraciones en el crecimiento en fetos de 20 días descendientes de ratas Wistar con diabetes moderada.

Materiales y métodos

Diseño experimental

Se utilizaron ratas Wistar adultas vírgenes (180 ± 20 g de peso) de ambos sexos producidas en el Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), en La Habana, Cuba. Para la obtención de las crías, se aparearon hembras y machos. Antes del apareamiento, las hembras se dividieron en dos grupos: aquellas a cuyas crías se les induciría la diabetes en el período neonatal y las del grupo de control. Al nacer, las camadas de las madres en cada grupo se colocaron en áreas separadas y debidamente identificadas. Se mantuvo en

cada caja a las madres con las crías hembras de la camada, en tanto que los machos se cedieron para otros estudios en la universidad.

Se indujo diabetes en la crías hembras seleccionadas en el segundo día de nacidas (grupo D) mediante inyección subcutánea de estreptozotocina (STZ, Applichem, Alemania) en dosis de 100 mg/kg de peso corporal disuelta en solución tampón de citrato de sodio de 0,1 M y pH 4,5. El modelo aplicado permite la obtención de hiperglucemias moderadas en la adultez (14,15). Las crías del grupo control (grupo C) recibieron solución tampón de citrato sódico en similares condiciones. A todas las crías se les permitió crecer hasta los 120 días del nacimiento con suministro de agua y comida *ad libitum*, y condiciones controladas de temperatura de 19 a 25 °C, humedad relativa de 45 a 65 % y ciclos de 12 horas de luz y oscuridad, como se establece para este tipo de experimento. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara y se ajustó a la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” (16).

Ambos grupos de ratas (D y C) se aparearon con machos sanos de la misma edad y cepa. La mañana en que se observaron espermatozoides en el lavado vaginal se consideró el día cero de preñez; la glucemia se determinó mediante el uso de un glucómetro y biosensores SUMA a partir de una gota de sangre de la punta de la cola. Se incluyeron diez ratas preñadas en el grupo de control y diez en el grupo experimental con diabetes, y se colocaron en cajas independientes en el área de gestación bajo estricta vigilancia y seguimiento metabólico hasta el día en que se practicó la eutanasia.

Cesárea y eutanasia, selección de los fetos y análisis morfológico

El día 20 de gestación se practicó la cesárea bajo anestesia con 50 a 60 mg/kg de tiopental sódico (Farmahealth-Laboratories Rotifarma-SA, India). La eutanasia se practicó por desangrado mediante punción intracardiaca. Se extrajeron ambos cuernos uterinos y, después de extirpar la grasa y el tejido periuterino, se obtuvieron los fetos.

El peso de todos los 193 fetos vivos se determinó en una balanza digital con una sensibilidad de 0,01 g (YAMATO, China): 105 descendientes de ratas sanas y 88 de ratas diabéticas. Los fetos fallecidos se excluyeron de la investigación y, del total de fetos vivos, se seleccionó un tercio de cada camada para el examen esquelético; en total, 58 fetos: 28 descendientes de ratas sanas y 30 de ratas diabéticas.

Los fetos se clasificaron según los valores percentiles del peso fetal del grupo control, siguiendo la metodología de Soulimane-Moktari, *et al.* (17), de la siguiente manera: pequeño para la edad gestacional (PEG), feto con peso menor que el valor del percentil 5; adecuado para la edad gestacional (AEG), feto con peso entre los valores de los percentiles 5 y 95, y grande para la edad gestacional (GEG), feto con peso mayor que el valor del percentil 95.

El procedimiento para el examen esquelético consistió en la transparentación de especímenes y tinción ósea, descrito por Staples, *et al.* (18). La observación se realizó con estereoscopio (BMS, EE. UU.) y se documentó del con una cámara fotográfica (Canon, Japón). Se analizaron los huesos del cráneo, y las vértebras cervicales, torácicas, lumbares, sacras y caudales, las costillas, el esternón (manubrio, xifoides y centros esternales), los miembros anteriores (carpos, metacarpos y falanges), los miembros posteriores (tarsos, metatarsos y falanges) y la pelvis. Se tuvieron en cuenta

el tamaño, la forma, el número, la posición, la adición, la ausencia o la fusión de huesos, así como el grado de osificación (19). Todo el procedimiento se llevó a cabo según los parámetros propuestos por Aliverti, *et al.* (20).

Análisis estadístico

Debido a la distribución no gaussiana de las variables cuantitativas, se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney para determinar si existían diferencias entre los grupos. La prueba exacta de Fisher se empleó para comparar los valores porcentuales y la relación entre las variables se determinó mediante la correlación de Spearman. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando p era menor de 0,05.

Resultados

En el día inicial de la gestación, la glucemia presentó valores significativamente superiores ($p < 0,05$; Mann-Whitney) en las ratas diabéticas ($7,65 \pm 0,16$ mM) comparadas con las sanas ($5,14 \pm 0,09$ mM).

Los fetos de ratas diabéticas presentaron un menor peso promedio a los 20 días de gestación en comparación con los descendientes de ratas sanas. El grupo diabético registró un mayor porcentaje de fetos PEG y GEG, y uno menor de AEG con respecto al grupo de control. En la descendencia de las ratas sanas, predominaron los fetos AEG (cuadro 1).

Los fetos descendientes de ratas diabéticas mostraron menor grado de osificación en el cráneo, el esternón, la columna vertebral y las extremidades anteriores y posteriores, que la descendencia de las ratas de control (cuadro 1). El resto de las regiones del esqueleto se encontraron completamente osificadas en los descendientes de ambos grupos.

En la descendencia de madres diabéticas, se encontró retardo en la osificación en cuatro de los siete huesos pertenecientes a la bóveda craneana. En los huesos parietales, interparietales, frontal y supraoccipital, se detectó un mayor retardo en la osificación en los fetos del grupo diabético que en los de control, aunque en los dos últimos huesos el retardo en la osificación no fue significativo (cuadro 1 y figura 1). Además, en seis descendientes de madres diabéticas, que representaban el 20 % del total del grupo, se identificaron alteraciones morfológicas asociadas con la osificación parcial de los huesos parietales, alteraciones descritas como amplia distancia entre estos huesos y fontanelas anterior y posterior anchas, lo que le confirió forma de domo al cráneo de estos fetos (figura 1).

En la región de las costillas, se detectaron malformaciones en un descendiente de rata diabética con presencia de bifurcación en la quinta costilla derecha y fusión en el extremo distal de las tercera y cuarta costillas derechas (figura 2).

En la región del esternón, se evidenció retardo en la osificación de la primera, tercera y cuarta esternebras en los fetos del grupo diabético. La ausencia de la cuarta esternebra no fue significativa, sin embargo, la osificación parcial o la ausencia de este hueso se observó en el 46,67 % de los descendientes de ratas diabéticas. La ausencia del xifoides se presentó en cinco fetos del grupo de ratas diabéticas, en tanto que se observó solo en un feto del grupo de control. La osificación parcial del xifoides se evidenció en un descendiente de madre diabética, lo que representa un 20 % de los fetos de dicho grupo (cuadro 1 y figura 3 A y B). El número de vértebras caudales

fue variable; no obstante, en el grupo de ratas diabéticas se observó un número mayor de fetos con ausencia de las vértebras quinta y sexta (cuadro 1 y figura 3 C y D). En los descendientes de madres diabéticas, se evidenció retardo en la osificación de los huesos de las patas anteriores y posteriores. En las patas anteriores, el cuarto metacarpo y las falanges, el retardo en la osificación era significativo, así como la ausencia de falanges en las patas posteriores (cuadro 1 y figura 3 E y F).

Cuadro 1. Variables de crecimiento y desarrollo en fetos de ratas diabéticas (D) y controles (C)

Variables	Grupos	
	C	D
Peso y clasificación acorde al peso fetal		
Fetos examinados ^a	105	88
Peso ^b	3,70 ± 0,050	3,56 ± 0,071*
PEG ^c	5 (4,8)	14 (15,9) ^{&}
AEG ^c	97 (92,3)	65 (73,9) ^{&}
GEG ^c	3 (2,9)	9 (10,2) ^{&}
Alteraciones esqueléticas		
Fetos examinados ^a	28	30
Cráneo ^c		
Osificación parcial del frontal	1 (3,57)	3 (10,00)
Osificación parcial de los parietales	4 (14,29)	22 (73,33) ^{&}
Osificación parcial del interparietal	0 (0,00)	12 (40,00) ^{&}
Osificación parcial del supraoccipital	0 (0,00)	2 (6,67)
Esternón ^c		
Osificación parcial de la primera esternebra	0 (0,00)	3 (10,00)
Osificación parcial de la tercera esternebra	0 (0,00)	1 (3,33)
Osificación parcial de la cuarta esternebra	2 (7,14)	11 (36,67) ^{&}
Ausencia de la cuarta esternebra	0 (0,00)	3 (10,00)
Osificación parcial del xifoides	0 (0,00)	1 (3,33)
Ausencia del xifoides	1 (3,57)	5 (16,67)
Región caudal ^c		
Osificación parcial de primera vértebra caudal	0 (0,00)	1 (3,33)
Osificación parcial de segunda vértebra caudal	0 (0,00)	1 (3,33)
Osificación parcial de tercera vértebra caudal	0 (0,00)	1 (3,33)
Ausencia de la cuarta vértebra caudal	0 (0,00)	3 (10,00)
Ausencia de la quinta vértebra caudal	8 (28,57)	14 (46,67)
Ausencia de la sexta vértebra caudal	16 (57,14)	30 (100,00) ^{&}
Patas anteriores ^c		
Ausencia del cuarto metacarpo	3 (10,71)	10 (33,33) ^{&}
Ausencia de falanges	2 (7,14)	8 (26,67)
Patas posteriores ^c		
Ausencia del quinto metatarso	0 (0,00)	1 (3,33)
Ausencia de falanges	1 (3,57)	9 (30,00) ^{&}
Sitios de osificación		
Fetos examinados ^a	28	30
Esternón ^b	5,89 ± 0,08	5,20 ± 0,19*
Vertebras caudales ^b	5,14 ± 0,16	4,33 ± 0,19*
Metacarpos ^b	3,89 ± 0,06	3,67 ± 0,09*
Metatarsos ^b	5,00 ± 0,00	4,97 ± 0,03
Falanges anteriores ^b	3,71 ± 0,20	2,93 ± 0,33*
Falanges posteriores ^b	3,86 ± 0,14	2,80 ± 0,34*
Total de sitios de osificación ^b	27,49 ± 0,42	23,90 ± 0,90*

PEG: pequeño para la edad gestacional, AEG: adecuado para la edad gestacional, GEG: grande para la edad gestacional

^a Datos presentados como total

^b Datos presentados como media ± error estándar de la media. * Diferencias significativas con respecto al grupo de control (p<0,05, prueba U de Mann-Whitney)

^c Datos presentados como total y porcentaje. & Diferencias significativas con respecto al grupo control (p<0,05, prueba exacta de Fischer)

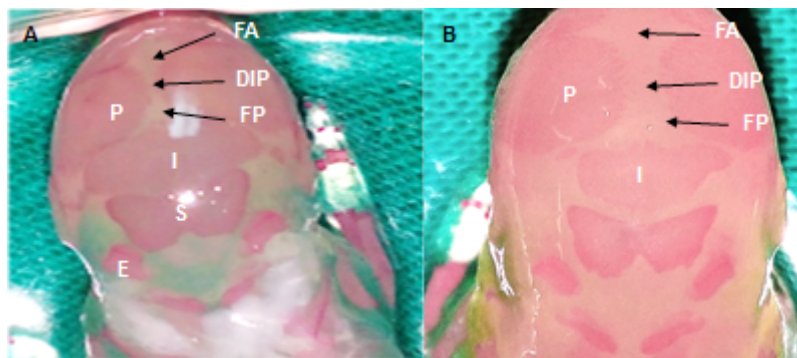


Figura 1. Alteraciones en la osificación de los huesos del cráneo. **A:** Feto del grupo control. Osificación completa de los huesos parietales (P), interparietales (I), supraoccipitales (S) y exoccipitales (E). Dimensiones normales de la fontanela anterior (FA), la fontanela posterior (FP) y la distancia interparietal (DIP). **B:** Feto del grupo diabético. Osificación parcial de los huesos parietales e interparietales. Fontanelas anterior y posterior anchas, distancia interparietal amplia, cráneo en forma de domo

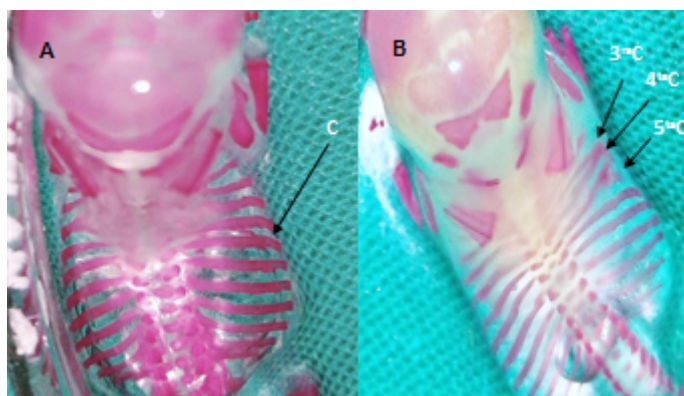
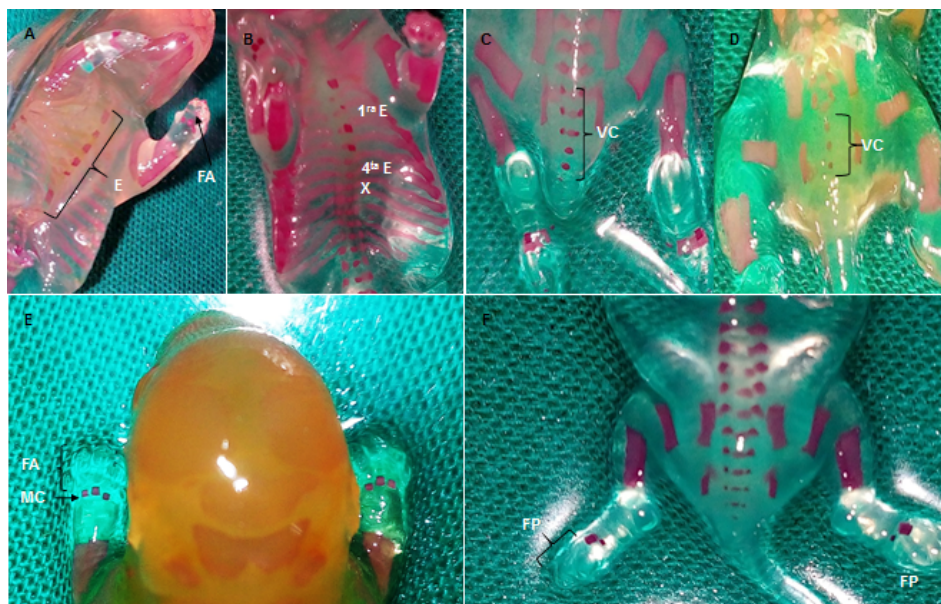
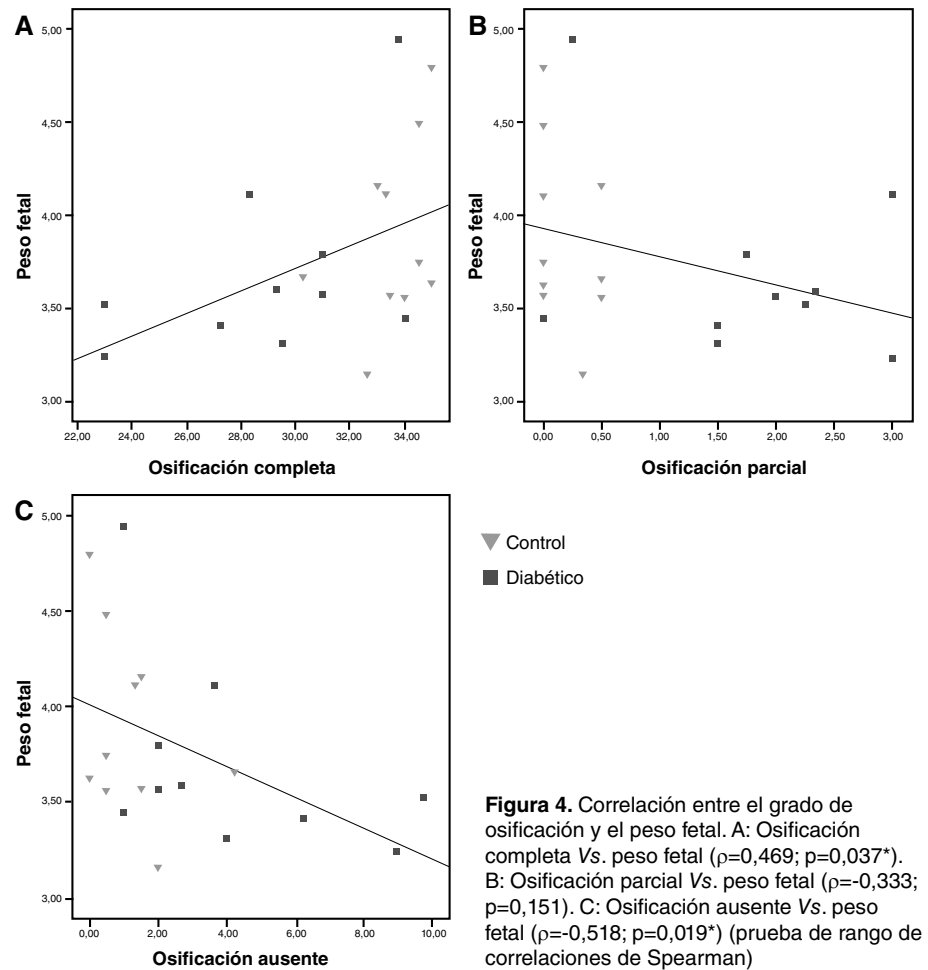


Figura 2. Malformaciones en costillas. **A:** Feto del grupo control. Osificación completa de las costillas (C). **B:** Feto del grupo diabético. Tercera y cuarta costillas fusionadas, quinta costilla bifurcada

Figura 3. Alteraciones en la osificación de esternón, columna vertebral y extremidades. Sitios de osificación. **A:** Esternón en feto del grupo control. Osificación completa de los seis centros del esternón (E) y falanges anteriores (FA). **B:** Esternón en feto del grupo diabético. Osificación parcial de la primera esternebra (1ª E), ausencia de la cuarta esternebra (4ª E) y ausencia del xifoides (X). **C:** Vértebras caudales en feto del grupo control. Osificación completa de las vértebras caudales (VC). **D:** Vértebras caudales en feto del grupo diabético. Ausencia de osificación de arcos en las vértebras caudales con osificación completa de tres centros de las vértebras caudales. **E:** Huesos de las patas anteriores en feto del grupo diabético. Ausencia de falanges anteriores (FA) y cuarto metacarpo (MC). **F:** Huesos de las patas posteriores en feto del grupo diabético. Ausencia de falanges posteriores (FP)





En cuanto a los sitios de osificación, se encontraron carencias en el esternón, las vértebras caudales, los metacarpos y las falanges anteriores y las posteriores de los fetos de ratas diabéticas, con respecto a los descendientes de las ratas de control. Un comportamiento similar se presentó en todos los sitios de osificación (cuadro 1 y figura 3).

El peso fetal se relacionó con el grado de osificación, pues los fetos con mayor número de huesos completamente osificados alcanzaron mayor peso fetal y viceversa (figura 4 A, B, C).

Discusión

En varios estudios en modelos de roedores de diabetes moderada y gestación, se han evidenciado condiciones adversas de mediana magnitud que conducen a consecuencias de diversa índole sobre la descendencia (9,11).

En este experimento, los niveles de glucosa en ayuno fueron más altos en el grupo de ratas diabéticas que en las de control, con valores discretamente superiores a 7 mM, lo que permitió verificar la presencia de hiperglucemias moderadas en el día inicial de la gestación. La mayor frecuencia de fetos sin el peso adecuado para la edad gestacional en el grupo de ratas diabéticas, indicó la incidencia de restricción del crecimiento intrauterino, así como de macrosomía, resultados análogos a los reportados en modelos de diabetes moderada y gestación (13,21,22).

La regulación del crecimiento fetal en la gestación diabética es un proceso complejo que depende de varios factores, como el tipo de diabetes, la disponibilidad de nutrientes y oxígeno para el feto, una variedad de factores de crecimiento de origen materno, fetal y placentario, y la unidad funcional madre-placenta-feto (4,23,24). Los daños generados por el entorno intrauterino hiperglucémico en la placenta afectan su estructura morfológica y su función (11) y pueden inducir desviaciones en el peso que afectan de manera diferente a los fetos de una misma camada (9). Las alteraciones en la placenta pueden provocar restricción del crecimiento fetal por condiciones hipóxicas y afectaciones en el transporte de nutrientes (5), en tanto que pueden generar macrosomía cuando existe mayor transferencia de nutrientes asociada con elevados niveles de metabolitos circulantes en la madre y al límite que posee la placenta para acumular los excesos de sustratos de origen materno (17,23). Los datos aportados en varios estudios de placenta en diabetes materna, sugieren una elevada incidencia de inmadurez placentaria comparada con la de embarazos normoglucémicos (25). Aunque en el presente estudio no se analizó el estado de la placenta, es importante destacar que los fetos de ratas diabéticas presentaron menor eficiencia placentaria (calculada como peso fetal dividido por peso placentario) que los descendientes de ratas sanas.

Los patrones de osificación son similares en el humano y en la rata, los huesos se originan por osificación membranosa o endocondral, procesos controlados por factores genéticos y ambientales (26). El esqueleto fetal se considera un indicador útil del desarrollo embrionario al reflejar las alteraciones del ambiente intrauterino (26,27). En fetos de ratas con enfermedades de origen metabólico, como la diabetes, se ha comprobado el retardo en la osificación del esqueleto (21,22).

En el presente estudio, se comprobó el retardo en el proceso de osificación en varios de los huesos analizados. Los fetos de ratas diabéticas presentaron alteraciones en los huesos del cráneo, con retardo en la osificación de los parietales, los interparietales, el frontal y el supraoxipital. Estos resultados, analizados en conjunto con los hallazgos de mayor distancia entre los parietales y mayor amplitud de las fontanelas anterior y posterior, así como la forma de domo en el cráneo, podrían constituir una novedad del presente estudio. Los trabajos revisados en modelos de diabetes moderada no reportan modificaciones en la osificación en los huesos de la bóveda craneana de la descendencia (21,22,28).

Las alteraciones en la osificación del esternón antes mencionadas corresponde con lo reportado por otros autores en modelos experimentales de diabetes moderada (21,22). Se ha observado que, en el día 20 de gestación, varias esternibras y el xifoides aún no se han osificado y que, en el día 21, su osificación es completa. Este trastorno parece ser transitorio, pues hay estudios que corroboran que se produce una recuperación posterior durante el período neonatal (20,29).

La correlación directa entre el grado de osificación y el peso de los fetos estuvo en concordancia con reportes previos (20,26), lo que indica que el peso fetal se ve afectado cuando no se ha completado el proceso de osificación. El retraso en la osificación en diferentes regiones del esqueleto, acompañado del menor número de sitios de osificación, contribuyó a un mayor porcentaje de fetos PEG en el grupo de ratas diabéticas, confirmando que la gestación diabética puede causar en los fetos retardo en el

crecimiento además de macrosomía. Resultados similares se han reportado en este modelo experimental en un estudio en el que las ratas se gestaron a los 90 días de evolución de la diabetes (13), así como en otros modelos de diabetes moderada (21,22,28).

Entre los mecanismos involucrados en el efecto teratogénico de la hiperglucemia, se encuentran el estrés oxidativo y el estrés nitrosativo. Ambos pueden modificar múltiples vías de señalización, y provocar daño celular masivo y eventos apoptóticos que conduce a defectos en el desarrollo embrionario y fetal (10,30). El estudio del desarrollo de las estructuras cráneo-faciales ha aportado pruebas de que la diabetes durante la gestación ejerce un efecto teratogénico sobre las células de la cresta neural cefálica, precursoras de los huesos de la cara y la bóveda craneana, afectando su migración y proliferación (26,31,32). Se ha propuesto que la hiperglucemia provoca un desequilibrio oxidativo que conlleva a un silenciamiento en la expresión del gen *Pax3*, por lo que se produce un incremento de la apoptosis. Esta situación induce modificaciones en la migración de las células de la cresta neural, de lo que se derivan defectos en el cierre del tubo neural y en otras estructuras del cerebro, entre otras anomalías (6,31,32).

En los fetos descendientes de ratas diabéticas del presente estudio, el conjunto de características morfológicas apreciadas en la región cráneo-facial es atribuible a posibles daños sobre las células de la cresta neural provocados por la diabetes materna. Estos hallazgos constituyen signos de dilatación moderada o extrema de los ventrículos laterales en el cerebro que podrían sugerir la presencia de hidrocefalia, una de las malformaciones del sistema nervioso central regularmente observada en la diabetes materna clínica y experimental (32).

Vale la pena señalar que los fetos portadores de alteraciones en las regiones del cráneo y las costillas fueron descendientes de ratas diabéticas con descontrol glucémico antes y durante la gestación. El hallazgo de las malformaciones fetales en este estudio coincide con investigaciones previas de este equipo de trabajo en las que las malformaciones externas fetales se asociaron con el descontrol metabólico materno y la disminución de la actividad antioxidante en tejidos fetales y placentarios (13). El incremento de la incidencia de malformaciones esqueléticas en fetos de ratas diabéticas podría asociarse al efecto teratogénico del ambiente intrauterino hiperglucémico, lo que permite comprobar que varias alteraciones provocadas por la diabetes en la madre, aun con hiperglucemias moderadas, producen resultados adversos antes y después del nacimiento.

Se concluyó que la diabetes moderada durante la gestación alteró el crecimiento y el desarrollo fetal, caracterizados tanto por macrosomía y restricción del crecimiento intrauterino, como por malformaciones esqueléticas. Aunque las principales limitaciones de este estudio se relacionan con las diferencias entre la gestación diabética experimental y la humana, los resultados son comparables a lo observado en descendientes de mujeres con diabetes materna, en los que el desarrollo prenatal se ve afectado y el índice de malformaciones se incrementa (11,30). Este modelo experimental da oportunidades para estudiar intervenciones farmacológicas, que tempranamente aplicadas, permitirían mejorar la salud de futuras generaciones.

Referencias

1. World Health Organization. Global Report on Diabetes. Geneva: WHO; 2016.
2. International Diabetes Federation. Diabetes Atlas. Brussels-Belgium: IDF; 2019.
3. Kelstrup L, Bytoft B, Hjort L, Houshmand-Oeregaard A, Mathiesen E, Damm P. Diabetes in pregnancy. In: Lapolla A, Metzger BE, editors. Gestational diabetes. 28 edition. New York: Basel, Karger; 2020. p. 201-22. <https://doi.org/10.1159/000480176>
4. Jean-Baptiste A, Simeoni U. Offspring of mothers with hyperglycemia in pregnancy: Short-term consequences for newborns and infants. In: Lapolla A, Metzger BE, editors. Gestational diabetes. New York: Basel, Karger; 2020. p. 194-200. <https://doi.org/10.1159/000480175>
5. Gutaj P, Wender-Ozegowska E. Diagnosis and management of IUGR in pregnancy complicated by type 1 diabetes mellitus. *Curr Diab Rep*. 2016;16:1-9. <https://doi.org/10.1007/s11892-016-0732-8>
6. Wentzel P, Eriksson U. Embryopathy and diabetes. In: Lapolla A, Metzger BE, editors. Gestational diabetes. New York: Basel, Karger; 2020. p. 132-44. <https://doi.org/10.1159/000480170>
7. MINSAP. Ministerio de Salud Pública de Cuba. Dirección de Registros Médicos y Estadísticas de Salud. Anuario estadístico de salud 2019. La Habana: Ministerio de Salud Pública; 2020.
8. Parodi K, Jose S. Diabetes y embarazo. *Rev Fac Cienc Méd*. 2016;1:27-35.
9. Jawerbaum A, White V. Animal models in diabetes and pregnancy. *Endocr Rev*. 2010;31:680-701. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0038>
10. Eriksson UJ, Wentzel P. The status of diabetic embryopathy. *Ups J Med Sci*. 2016;121:96-112. <https://doi.org/10.3109/03009734.2016.1165317>
11. Jawerbaum A, White V. Review on intrauterine programming: Consequences in rodent models of mild diabetes and mild fat overfeeding are not mild. *Placenta*. 2017;52:21-32. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.02.009>
12. Friedman JE. Obesity and gestational diabetes mellitus pathways for programming in mouse, monkey, and man. *Diabetes Care*. 2015;38:1402-11. <https://doi.org/10.2337/dc15-0628>
13. Bequer L, Gómez T, Molina J, Álvarez A, Chaviano C, Clapés S. Experimental diabetes impairs maternal reproductive performance in pregnant Wistar rats and their offspring. *Syst Biol Reprod Med*. 2018;64:7. <https://doi.org/10.1080/19396368.2017.1395928>
14. Bequer L, Gómez T, Molina JL, Artilles D, Bermúdez R, Clapés S. Acción diabetogénica de la estreptozotocina en un modelo experimental de inducción neonatal. *Biomédica*. 2016;26:230-8. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2686>
15. Gómez T, Bequer L, Sánchez C, de la Barca M, Muro I, Reyes MA, et al. Inducción neonatal de hiperglucemias moderadas: indicadores metabólicos y de estrés oxidativo en ratas adultas. *Rev ALAD*. 2014;4:148-57.
16. National Institute of Health. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, D. C.: National Academies Press; 2011.
17. Soulimane-Moktari N, Guermouche B, Yessoufou A, Saker M, Moutairou K, Hichami A. Modulation of lipid metabolism by n-3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring. *Clin Sci*. 2005;109:287-95. <https://doi.org/10.1042/CS20050028>
18. Staples RE, Schnell VL. Refinements en rapid clearing techinc in the KOH-alizarine red S method for fetal bone. *Stain Technology*. 1964;39:61-3.
19. Damasceno DC, Kempinas WG, Volpato GT, Consoni M, Rudge MVC, Paumgarten FJR. Anomalias congénitas: Estudos experimentais. 1a edición. Belo Horizonte: Coopmed; 2008. p. 102.
20. Aliverti V, Bonanomi L, Giavini E, Leone VG, Mariani L. The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. *Teratology*. 1979;20:237-42. <https://doi.org/10.1002/tera.1420200208>
21. Saito FH, Damasceno DC, Dallaqua B, Moreno I, Rudge MVC, De Mattos I. Heat shock protein production and immunity and altered fetal development in diabetic pregnant rats. *Cell Stress Chaperones*. 2013;18:25-33. <https://doi.org/10.1007/s12192-012-0353-3>

22. Iessi IL, Bueno A, Sinzato YK, Taylor KN, Rudge MV, Damasceno DC. Evaluation of neonatally-induced mild diabetes in rats: Maternal and fetal repercussions. *Diabetol Metab Syndr*. 2010;37. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-2-37>
23. Cunningham FG, Leveno KL, Bloom SL, Spong CY, Dashe J, Hoffman BL. Williams Obstetrics. 25 edition. New York, United States: McGraw-Hill Education; 2018. p. 1344.
24. Elizabeth KE, Ashwin DA, Sobhakumar S, Sujatha TL. Outcome of large- and small-for-gestational-age babies born to mothers with pre-pregnancy and gestational diabetes mellitus versus without diabetes mellitus. *Indian J Child Health*. 2018;5:592-6. <https://doi.org/10.32677/IJCH.2018.v05.i09.011>
25. Huynh J, Dawson D, Roberts D, Bentley-Lewis R. A systematic review of placental pathology in maternal diabetes mellitus. *Placenta*. 2015;36:101-14. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.11.021>
26. Raymond GY, Robert M. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. En: Hayes WA, Kruger CL. Hayes' principles and methods of toxicology. 6th edition. London: CRC Press; 2014. p. 1639-712. <https://doi.org/10.1201/b17359>
27. Damasceno DC, Dallaqua B, Iessi IL, Volpato GT, Campos KE. Impact of maternal over-nutrition during pregnancy on maternal oxidative stress and fetal skeletal/visceral anomalies of the rats. *J Nutr Disorders Ther* 2016;6:1-5. <https://doi.org/10.4172/2161-0509.1000185>
28. Saito FH, Damasceno DC, Kempinas WG, Morceli G, Sinzato YK, Taylor KN, et al. Repercussions of mild diabetes on pregnancy in Wistar rats and on the fetal development. *Diabetol Metab Syndr*. 2010;2:8. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-2-26>
29. Lewis EM. Reproductive toxicology: historical control data in rats. Pennsylvania: Charles River Laboratories; 2017. p .54.
30. Loeken MR. Mechanisms of congenital malformations in pregnancies with pre-existing diabetes. *Curr Diab Rep*. 2020;20:12. <https://doi.org/10.1007/s11892-020-01338-4>
31. Zabihi S, Loeken MR. Understanding diabetic teratogenesis: Where are we now and where are we going? *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2018;88:779-90. <https://doi.org/10.1002/bdra.20704>
32. Castori M. Diabetic embryopathy: A developmental perspective from fertilization to adulthood. *Mol Syndromol*. 2013;4:74-86. <https://doi.org/10.1159/000345205>

Artículo original

Consumo crónico de edulcorantes en ratones y su efecto sobre el sistema inmunitario y la microbiota del intestino delgado

Jorge Alberto Escoto¹, Beatriz Elina Martínez-Carrillo¹, Ninfa Ramírez-Durán², Hugo Ramírez-Saad³, José Félix Aguirre-Garrido⁴, Roxana Valdés-Ramos¹

¹ Investigación en Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, México

² Microbiología Médica y Ambiental, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, México

³ Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Ciudad de México, México

⁴ Biotecnología Ambiental, Universidad Autónoma Metropolitana-Lerma, Lerma, Estado de México, México

Introducción. Los edulcorantes son aditivos que se consumen en los alimentos. Pueden ser naturales (sacarosa y estevia) o artificiales (sucralosa). Actualmente, se consumen rutinariamente en múltiples productos, y sus efectos en la mucosa y la microbiota del intestino delgado aún son controversiales

Objetivo. Relacionar el consumo de edulcorantes y su efecto en el sistema inmunitario y la microbiota del intestino delgado en ratones CD1.

Materiales y métodos. Se utilizaron 54 ratones CD1 de tres semanas de edad divididos en tres grupos: un grupo de tres semanas sin tratamiento, un grupo tratado durante seis semanas y un grupo tratado durante 12 semanas. Se les administró sacarosa, sucralosa y estevia. A partir del intestino delgado, se obtuvieron linfocitos B CD19⁺ y células IgA⁺, TGF- β (*Transforming Growth Factor-beta*) o el factor de crecimiento transformador beta (TGF-beta), IL-12 e IL-17 de las placas de Peyer y de la lámina propia. De los sólidos intestinales se obtuvo el ADN para identificar las especies bacterianas.

Resultados. Después del consumo de sacarosa y sucralosa durante 12 semanas, se redujeron las comunidades bacterianas, la IgA⁺ y el TGF-beta, se aumentó el CD19⁺, y además, se incrementaron la IL-12 y la IL-17 en las placas de Peyer; en la lámina propia, aumentaron todos estos valores. En cambio, con la estevia mejoraron la diversidad bacteriana y el porcentaje de linfocitos CD19⁺, y hubo poco incremento de IgA⁺, TGF- β e IL-17, pero con disminución de la IL-17.

Conclusión. La sacarosa y la sucralosa alteraron negativamente la diversidad bacteriana y los parámetros inmunitarios después de 12 semanas, en contraste con la estevia que resultó benéfica para la mucosa intestinal.

Palabras clave: edulcorantes; intestino delgado; microbioma gastrointestinal; sacarosa; estevia.

Chronic consumption of sweeteners in mice and its effect on the immune system and the small intestine microbiota

Introduction: Sweeteners are additives used in different foods. They can be natural (sucrose and stevia) or artificial (sucralose). Currently, they are routinely consumed in multiple products and their effects on the mucosa of the small intestine and its microbiota are still controversial.

Objective: To relate the consumption of sweeteners and their effect on the immune system and the microbiota of the small intestine in CD1 mice.

Materials and methods: We used 54 three-week-old CD1 mice divided into three groups in the experiments: 1) A group of three weeks without treatment, 2) a group treated for six weeks, and 3) a group treated for 12 weeks using sucrose, sucralose, and stevia. We obtained CD19⁺ B lymphocytes, IgA⁺ antibodies, *transforming growth factor-beta* (TGF-b), and interleukins 12 and 17 (IL-12 and -17) from Peyer's patches and lamina propria cells while DNA was obtained from intestinal solids to identify bacterial species.

Results: After 12 weeks, sucrose and sucralose consumption caused a reduction in bacterial communities with an increase in CD19⁺, a decrease in IgA⁺ and TGF-b, and an increase in IL-12 and -17 in the Peyer's patches while in the lamina propria there was an increase in all parameters. In contrast, stevia led to an improvement in bacterial diversity and percentage of CD19⁺ lymphocytes with minimal increase in IgA⁺, TGF-b, and IL-12, and a decrease in IL-17.

Conclusion: Sucrose and sucralose caused negative alterations in bacterial diversity and immune parameters after 12 weeks; in contrast, stevia was beneficial for the intestinal mucosa.

Recibido: 11/09/2020

Aceptado: 03/05/2021

Publicado: 06/05/2021

Citación:

Escoto JA, Martínez-Carrillo BE, Ramírez-Durán N, Ramírez-Saad H, Aguirre-Garrido JF, Valdés-Ramos R. Consumo crónico de edulcorantes en ratones y su efecto sobre el sistema inmunitario y la microbiota del intestino delgado. *Biomédica*. 2021;41:504-30. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5806>

Correspondencia:

Beatriz Elina Martínez-Carrillo, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Toluca esquina Jesús Carranza s/n. Col. Universidad, 50180 Toluca, Estado de México, México Teléfono: (+52) (722) 217 3552, extensión 232 martinez_elina9@hotmail.com

Contribución de los autores:

Jorge Alberto Escoto: elaboración de experimentos
Beatriz Elina Martínez-Carrillo y Roxana Valdés-Ramos: diseño de experimentos, análisis de resultados inmunológicos y discusión
Ninfa Ramírez-Durán, Hugo Ramírez-Saad y José Félix Aguirre-Garrido: aislamiento, caracterización y análisis bioinformático de la microbiota
Todos los autores participaron en la discusión y escritura del manuscrito.

Financiación:

El proyecto fue financiado por la Universidad Autónoma del Estado de México.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Keywords: Sweetening agents; intestine, small; gastrointestinal microbiome; sucrose; stevia.

Los edulcorantes son aditivos alimentarios que brindan un sabor dulce a los alimentos (1). Se clasifican en naturales (sacarosa y estevia) o artificiales (sucralosa) y, con base en su aporte energético, como nutritivos (sacarosa) o no nutritivos (sucralosa y estevia) (2). En los últimos años, se ha incrementado el uso de edulcorantes no nutritivos como alternativa para reducir el consumo de calorías y, así, combatir la elevada tasa de enfermedades crónicas no transmisibles, como obesidad, diabetes mellitus e hipertensión arterial sistémica (3). El metabolismo de los edulcorantes no nutritivos es independiente de la insulina y estos permiten disfrutar del sabor dulce en los alimentos sin incrementar el contenido calórico de la dieta (4). Los edulcorantes con mayor demanda comercial actualmente son sacarosa, sucralosa y estevia (5).

El encargado de absorber y metabolizar los nutrientes que ingresan al sistema digestivo es el intestino delgado, el cual los recibe ya digeridos por el estómago, los absorbe y los utiliza para proveer de energía al organismo (6). El intestino delgado está involucrado en la defensa del organismo mediante la reacción inmunitaria local (7) del tejido linfóide asociado al intestino de tipo encapsulado (placas de Peyer) y el difuso (lámina propia) (6). Este tejido está separado de la luz intestinal por las células epiteliales (8), las cuales forman una barrera protectora y son el medio por el cual interactúan la microbiota y las placas de Peyer (9), que permiten el transporte de macromoléculas y microorganismos intactos que interaccionan con células del sistema inmunitario en ese sitio. La lámina propia, por su parte, recibe células activadas que han tenido contacto con los antígenos en las placas de Peyer (10).

Es evidente, entonces, la relación íntima entre el contenido intestinal, la microbiota y las estructuras linfoides del intestino delgado (11), cuyo funcionamiento y homeostasis dependen de su adecuado equilibrio, el cual se modifica según los nutrientes que se consumen y que alteran, a su vez, el tipo de microbiota y, por lo tanto, la inmunidad en este sitio. Otro factor que interviene en el mantenimiento de dicho equilibrio es la adecuada producción de IgA+ (12). Se ha observado que su ausencia en ratones altera la microbiota intestinal (13), es decir, que la microbiota comensal y la IgA+ pueden regularse entre sí promoviendo un “mutualismo pacífico” entre huésped y anticuerpos (12). Asimismo, este equilibrio permite que los linfocitos B se activen y migren de las placas de Peyer hacia la lámina propia del intestino delgado, permitiendo el cambio de isotipo a células plasmáticas IgA+ (14), lo que confirma la relación estrecha y simbiótica entre la composición de la microbiota y el desarrollo de la inmunidad del organismo. En pocos estudios se aborda la composición de la microbiota del intestino delgado en humanos debido a su difícil acceso, por lo que la mayoría se enfoca en la descripción de la microbiota del intestino grueso y su relación con la inmunidad.

En el intestino delgado, sin embargo, hay una estrecha relación entre el tipo y la proporción de nutrientes, el desarrollo de la microbiota y el estímulo del sistema inmunitario de las mucosas, especialmente de las placas de Peyer. Esto se ve favorecido por la secreción de algunas citocinas, como el TGF-beta, que regula muchas de las funciones celulares en el intestino (15), además de estimular la diferenciación de los linfocitos vírgenes a Th17, con la consecuente secreción de IL-17 (16,17). Esta interleucina está implicada en la defensa frente a infecciones bacterianas y fúngicas que no están cubiertas por la respuesta de los linfocitos T ayudadores 1 y 2 (Th1 y Th2) (18). Como se ha demostrado, las citocinas tienen la capacidad de distinguir la microbiota normal o natural de la patógena. Otro ejemplo de ello es la

IL-12, la cual contribuye a resolver enfermedades infecciosas causadas por microorganismos patógenos, como *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans* y *Leishmania major* (19), aunque su actividad en el intestino delgado aún no es clara.

Todavía son pocos los estudios sobre la microbiota del intestino delgado y, más escasos aún, aquellos que explican la influencia del consumo de edulcorantes. Nuestro grupo ha llevado a cabo estudios previos sobre el consumo de edulcorantes en ratones jóvenes recién destetados (20,21), para relacionar su efecto con parámetros inmunitarios mediante diferentes métodos de análisis de la microbiota del intestino delgado.

En este contexto, el presente estudio se planteó como objetivo relacionar el consumo de edulcorantes y su efecto, sobre el sistema inmunitario y la microbiota del intestino delgado en ratones CD1.

Material y métodos

Diseño de estudio

Se hizo un estudio experimental, controlado y transversal con 54 ratones machos de tres semanas de edad (recién destetados) de la cepa CD1, libres de patógenos, alimentados con croquetas Rodent Laboratory Chow™ 5001 de Purina (3,02 kcal/g) (RLChow™ 5001, Saint Louis, MO, USA) y agua *ad libitum*. Los ratones fueron alojados en jaulas en grupos de cuatro en condiciones controladas de temperatura (19 a 21 °C) y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas cada uno. Se cuantificó el consumo de agua y alimento por semana hasta que concluyó el experimento.

El proyecto fue aprobado por el Comité de ética en investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México, y se consideraron las especificaciones técnicas para la producción, el cuidado y el uso de animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999 (22).

Grupos de estudio

Se conformaron tres grupos de ratones utilizando como variables el tiempo de tratamiento (6 y 12 semanas) y el consumo de edulcorante administrado (figura 1): 1) un grupo de tres semanas de edad sin tratamiento (G3sSTx, n=6); los animales se sacrificaron el día 21 del destete y sirvieron de control inicial; 2) un grupo de tres semanas de edad y seis semanas de tratamiento (G6sTx, n=24) con edulcorantes a partir de la tercera y hasta la novena semana de vida de los ratones, y 3) un grupo de tres semanas de edad con 12 semanas de tratamiento (G12sTx, n=24) y administración de dos edulcorantes de la tercera a la decimoquinta semana de vida de los ratones. Los ratones del grupo G3sSTx fueron sacrificados recién destetados, al final de la tercera semana de vida, y no se les administró ningún tratamiento. Los grupos G6sTx y G12sTx fueron subdivididos en cuatro subgrupos (n=6 cada uno), según el tipo de edulcorante administrado (figura 1):

G6sTx:

- i. de control (CL6sTx), sin administración de edulcorante;
- ii. grupo suplementado con sacarosa (Sac6sTx); iii) grupo suplementado con sucralosa (Sucr6sTx), y iv) grupo suplementado con estevia (Est6sTx).

G12sTx:

- i. de control (CL12sTx), sin administración de edulcorante;
- ii. suplementado con sacarosa (Sac12sTx);
- iii. grupo suplementado con sucralosa y
- iv. grupo suplementado con estevia (Est12sTx).

Administración de edulcorantes

Los edulcorantes diluidos en agua ultrapura según las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011 para bebidas saborizadas no alcohólicas, se administraron por vía oral a libre demanda (23). La solución con el edulcorante se preparó en una concentración de 41,66 mg/ml de sacarosa, y 4,16 mg/ml de sucralosa y estevia. Se colocó diariamente la solución con edulcorante en las jaulas de los ratones durante cinco horas en un horario de las 08:00 a las 13:00 pm. Después de las 13:00 horas, se retiraba la solución y se sustituía con agua sin edulcorante (de 13:00 p.m. a 08:00 a.m.). Se cuantificó diariamente el volumen de agua con edulcorante para determinar su consumo en mg/ml, así como el volumen de agua sin edulcorante para obtener la media de consumo por semana.

Determinación del índice de masa corporal

Para determinar el índice de masa corporal (IMC), se cuantificaron el peso y la longitud (nariz-ano) de los animales semanalmente a partir de la semana 3 y hasta el momento del sacrificio, con ayuda de una báscula pesa ratón Triple Beam 700/800 Series (Ohaus™ Cat. No. 2,729,439). La longitud se determinó de la nariz hasta el ano en los ratones anestesiados con 0,1 ml de pentobarbital sódico al 1 %, usando una cinta métrica (24).

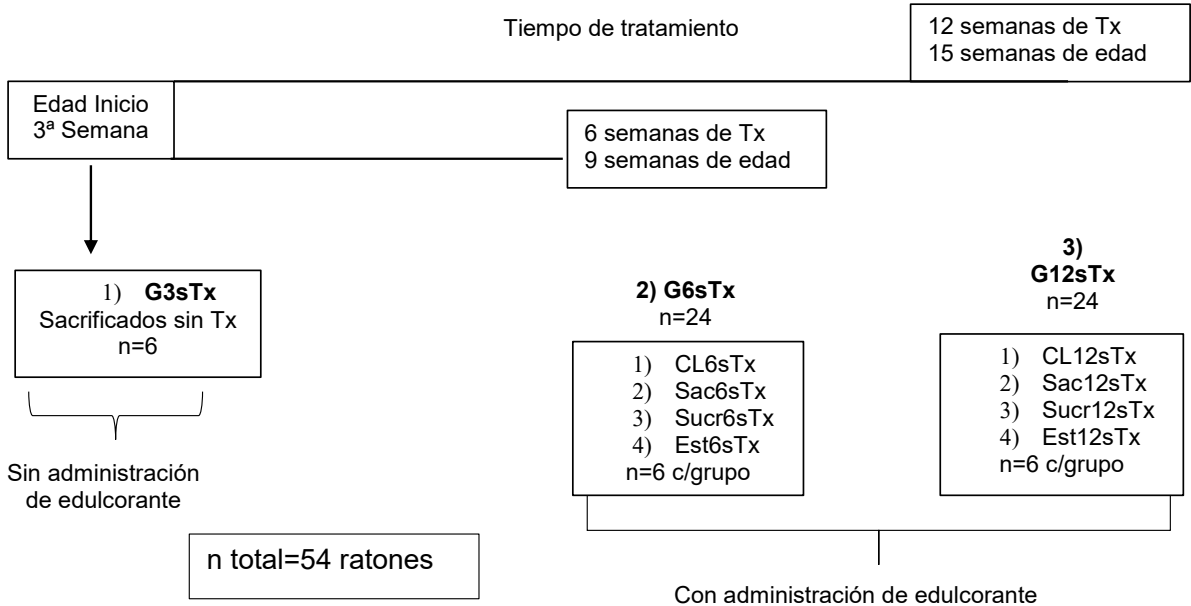


Figura 1. Distribución de los grupos de estudio de acuerdo con el tiempo de tratamiento y el tipo de edulcorante administrado

Cálculo energético y consumo de alimento

Se cuantificó el consumo de alimento de forma semanal a partir de la tercera semana de vida de los animales, pesando el alimento colocado en las jaulas los días lunes (inicio) y domingo (final) para, así, calcular el consumo como la diferencia de cantidad al inicio y final de cada semana. El consumo energético total se calculó a partir del aporte energético del alimento Rodent Laboratory Chow™ 5001 de Purina (3,02 kcal/g) y de cada edulcorante: sacarosa, 4 kcal/gramo, sucralosa, 0 kcal/gramo, y estevia, 4 kcal/gramo. Una vez obtenidos los datos de consumo de alimento y agua con edulcorante por semana, se calculó la ingestión energética total con la fórmula: $\text{kcal} = (\text{gramos de alimento} \times 3,02) + \text{kcal de edulcorante}$ (24,25).

Determinación de glucosa

Semanalmente, se determinó la glucosa en sangre periférica tomada de la cola del ratón por capilaridad con un glucómetro Contour TS™ de Bayer (26).

Obtención y procesamiento de muestras

Los grupos de ratones fueron sacrificados a la tercera, novena y decimoquinta semanas de vida, en condiciones de ayuno de 8 horas. El procedimiento se realizó a las 07:00 a.m. por dislocación cervical, siguiendo las recomendaciones de la norma oficial mexicana para uso y manejo de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y después de anestesarlos con 0,1 ml de pentobarbital sódico al 1 %. Una vez sacrificados, se procedió a disecar y lavar el intestino delgado cuidadosamente con 3 ml de solución tampón fosfato-salino (PBS) para eliminar el mesenterio y después extraer las placas de Peyer (27,28). El líquido obtenido se centrifugó a 4.000 rpm/5 minutos, se recolectó el contenido sólido de heces fecales y se guardó a -70°C hasta su procesamiento. Para obtener los linfocitos de las placas de Peyer y la lámina propia, se utilizó la técnica descrita por Reséndiz-Albor, et al. (28), con algunas modificaciones, como se describe a continuación.

Aislamiento de linfocitos del intestino delgado (placas de Peyer y lámina propia)

Placas de Peyer. Una vez obtenidas, se trituraron en una solución de suero de ternera fetal (STF) y solución tampón (PBS) al 3 % en hielo, y se pasaron por un filtro de acero inoxidable de 300 secciones para células. El líquido se centrifugó durante 10 minutos a 1.500 rpm y 4°C , para obtener el botón de células.

Lámina propia. Para la recuperar los linfocitos de la lámina propia del intestino delgado, este se evertió introduciendo una aguja de ganchillo de hierro de 10 cm de largo atada a una cuerda. Se ató el intestino en un extremo, se retiró la aguja de ganchillo y se tiró de la cuerda con cuidado mientras este se mantenía sumergido en medio RPMI-1640 frío (Sigma-Aldrich, No. Cat. R6504, Saint Louis, MO, USA). Cada segmento intestinal evertido se transfirió a un tubo de 50 ml que contenía 25 ml de medio RPMI con 60 U/ml de collagenasa de tipo IV (Sigma-Aldrich, Cat. No. C5138, Saint Louis, MO, USA), DTT (1,4 Ditiotreitól, Sigma-Aldrich, Cat. No. 43819, Saint Louis, MO, USA), 1 % de SFT y 50 µg/ml de gentamicina.

Los tubos se incubaron horizontalmente durante 30 minutos a 37°C en un baño de agua con agitación a 150 rpm. Los contenidos de cada tubo se transfirieron luego a placas de Petri y se agregaron 200 µl de SFT. La mucosa

intestinal se comprimió con un émbolo de jeringa sobre una malla de plástico. La suspensión de cada tubo con células de lámina propia se filtró con una malla de organza y, después, se centrifugó durante 10 minutos a 1.500 rpm a 4° C. Las suspensiones celulares se recolectaron y centrifugaron en un gradiente discontinuo de 40 a 70 % de Percoll a 2.500 rpm durante 25 minutos. Las células de la interfaz se lavaron y se suspendieron en medio RPMI-1640.

Citometría de flujo

La suspensión de células obtenida a partir de las placas de Peyer y la lámina propia se ajustó a 1×10^6 células/ml en solución tampón (PBS) para el análisis citofluorométrico, utilizando la técnica de Arciniega-Martínez (29) con algunas modificaciones:

- i. el fenotipo de superficie de las células B fue detectado utilizando un anticuerpo monoclonal marcado con fluorescencia anti-CD19 (PE, Cat. No. 553786, BD Biosciences, New Jersey, USA); las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con (PBS) y se fijaron con paraformaldehído;
- ii. el porcentaje de células plasmáticas IgA+ se detectó agregando un coctel compuesto por anticuerpos anti-CD19 PE, anti-CD138 APC y anti-IgA FITC (todos de BD Biosciences, New Jersey, USA). Las células plasmáticas y las células B se fijaron, permeabilizaron y tiñeron, siguiendo el protocolo de BD Bioscience para tinción intracelular;
- iii. para el reconocimiento de la producción de citocinas intracelulares, los linfocitos se estimularon con una mezcla que contenía miristato de forbol acetato, ionomicina y brefeldin A (Leucocyte Activation Cocktail Kit, BD Pharmingen, San José California, USA), y se incubaron durante 4 horas a 37 °C y 5 % de CO₂.

Después, se añadieron anticuerpos contra los marcadores de superficie celular PerCP anti-CD4 y se incubaron como antes. Para la marca intracelular de células T CD4+, la fijación y la permeabilización se hicieron utilizando Cytofix/Cytoperm Kits (BD Pharmingen, San José California, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Estas células se incubaron con anti-IL-17 APC (Cat. No. 565163), anti-TGF-beta FITC (Cat. No. 141414) y anti-IL-12 PerCP (Cat. No. 501821). La intensidad de la señal fluorescente se registró y analizó mediante un citómetro de flujo FACS Aria (Becton Dickinson). Los eventos se recogieron de la ventana de linfocitos en el diagrama de puntos FSC/SSC. Se adquirieron 20.000 eventos cerrados de cada muestra utilizando el programa de investigación CellQuest (Becton Dickinson). Los datos se analizaron con el programa Summit, versión 4,3 (Dako, Colorado Inc.). Se reportaron los datos de seis ratones por grupo como medias $\pm$ desviación estándar (DE).

Extracción y secuenciación del ADN

A partir de los sólidos intestinales obtenidos de cada ratón, se extrajo el ADN metagenómico y se cuantificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %, utilizando como marcador de tamaño molecular el Phago Lambda DNA/EcoRI y el programa Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290. Para explorar la presencia de genes o familias génicas en la microbiota intestinal de los ratones de cada grupo de tratamiento, se hizo una ultrasecuenciación directa en la plataforma ILLUMINA del ADN metagenómico de muestras seleccionadas con base en los datos de diversidad y composición diferencial. El ADN metagenómico se envió al servicio de secuenciación masiva *Integrated Microbiome Resource*

(Canadá). La secuenciación de la región V6-V8 del gene *16S ARNr* se hizo en la plataforma MiSeq de Illumina.

Análisis y clasificación de secuencias metagenómicas

El análisis bioinformático se hizo con el programa MOTHUR (30), así como el ensamble de las secuencias Read1 y Read2; para tener una secuencia aproximada de 450 pb, se verificó que las secuencias cumplieran con los siguientes criterios: no presentar bases ambiguas, tener una longitud mínima de 400 pb, no contener homopolímeros mayores de 8 pb, y tener una ampliación de secuencias de calidad de 50 pb y una puntuación media por secuencia de 35 pb.

Las unidades taxonómicas operacionales (*Operational Taxonomic Unit*, OTU) se asignaron utilizando la base de datos Silva, versión 119 (31); el alineamiento de referencia bacteriana se hizo con las secuencias que presentaran un 97 % de similitud y, además, se identificaron y excluyeron las secuencias quiméricas con el programa UCHIME (32,33).

La diversidad y riqueza de las especies presentes en las muestras metagenómicas, así como las curvas de rarefacción, se calcularon con un 97 % de similitud como parte de los resultados de diversidad alfa obtenidos a partir del análisis en el programa MOTHUR.

Se utilizaron cinco indicadores para determinar la evolución de las comunidades bacterianas, como los índices de diversidad de Shannon y Pielou, y los estimadores Inv-Simpson y Chao1 para la riqueza de especies, calculados con base en el número de unidades taxonómicas operacionales observadas (34). Estos parámetros se calcularon mediante la normalización de todas las bibliotecas con base en la muestra que presentó el menor número de secuencias.

El análisis de componente principal y el análisis estadístico multivariado se hicieron utilizando el programa STAMP, con una agrupación de 97 % de identidad (35). Las secuencias obtenidas se depositaron en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) con el número de acceso SRP149731.

Análisis estadístico

Para los datos morfométricos, nutricionales e inmunológicos, se obtuvieron medidas de tendencia central, medias y desviación estándar; se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la normalidad de los datos con un valor de significación de $p < 0,05$.

Una vez comprobada la normalidad de los datos, se procedió a aplicar la prueba de análisis de varianza ANOVA de una vía para comparar los grupos según el tipo de tratamiento (control, sacarosa, sucralosa y estevia) a las 6 y 12 semanas de tratamiento, y a una ANOVA de dos vías para comparar los grupos a la tercera, sexta y duodécima semana por tiempo de consumo y tipo de edulcorante.

En ambos casos, se hizo la prueba *post hoc* de Bonferroni con una significación estadística de $p < 0,05$. Los datos obtenidos del análisis de secuencias metagenómicas mediante MOTHUR, se analizaron y graficaron en el programa STAMP, versión 2,3, utilizando un ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Tukey-Kramer.

Resultados

Consumo de agua y alimento, aporte energético e IMC

El consumo de agua fue menor en el subgrupo Sac12sTx del G12sTx. En el G3sSTx, se cuantificaron el consumo de agua y alimento, el aporte calórico y el IMC después del destete de los animales, los cuales fueron sacrificados inmediatamente. En el G6sTx, no se apreciaron diferencias en el consumo de agua ($p=0,635$), pero en el G12sTx este disminuyó en el subgrupo Sac12sTx ($p<0,042$). Al comparar los grupos por tiempo de tratamiento, se encontraron diferencias significativas ($p<0,042$) entre el G3sSTx y el G12sTx, con un incremento en el consumo de agua (cuadro 1).

El consumo de alimento disminuyó en los subgrupos de sacarosa a las 6 y 12 semanas de tratamiento. En el G6sTx, el consumo de alimento disminuyó en los subgrupos Sac6sTx y Est6sTx ($p<0,025$); en el G12sTx, se observó disminución en los subgrupos Sac12sTx y Sucr12sTx ($p<0,007$) comparados con sus respectivos grupos de control. La diferencia entre los grupos según el tiempo de tratamiento fue significativa ($p<0,001$) (Verificar sentido con los autores). El consumo crónico de edulcorantes redujo el consumo de alimento, según se comprobó al comparar los resultados de los subgrupos CL6sTx y Sac6sTx a las 6 ($p<0,011$) y 12 semanas ($p<0,020$) de tratamiento (cuadro 2).

El aporte energético se encontró reducido en los subgrupos de edulcorantes. En el G6sTx, el aporte energético se redujo en los subgrupos Est6sTx y Sac6sTx ($p<0,049$) comparados con su control. En el G12sTx, esta reducción se apreció entre los subgrupos CL12sTx y Sac12sTx ($p<0,012$) y Sac12sTx y Est12sTx ($p<0,022$). La diferencia entre los grupos fue significativa ($p<0,001$); el G6sTx tuvo mayor aporte energético comparado con el G12sTx, lo que significa que el tiempo de consumo sí modificó los hábitos de consumo tanto del edulcorante como del alimento (cuadro 2).

El IMC no se modificó con el consumo de edulcorantes. La reducción en el consumo de alimento y de edulcorantes con bajo aporte energético pueden ser la causa de que el IMC no sufriera modificaciones significativas entre los grupos G6sTx ($p<0,408$) y G12sTx ($p<0,293$) (cuadro 2).

Cuadro 1. Composición de la dieta normal administrada a los ratones durante 6 y 12 semanas

Porcentaje	
Macronutrientes	Contenido de la dieta normal (%)
Hidratos de carbono	48,7
Lípidos	10,7
Proteínas	23,9
Micronutrientes	
Vitaminas	4,6
Minerales	7,0
Fibra	5,1
Total	100
Aporte energético (kcal/g)	3,02

Contenido de la dieta normal: Rodent Laboratory Chow™ 5001 de Purina administrada a los ratones. El porcentaje total de nutrientes digeribles fue de 76 % y la dieta aportó 3,02 kcal/g. Se administraron los edulcorantes a libre demanda durante 6 y 12 semanas en una concentración de 41,66 mg/ml de sacarosa y 4,16 mg/ml de sucralosa y estevia, en el horario de las 08 a las 13 horas diariamente (lunes a domingo).

Cuadro 2. Parámetros morfométricos y nutricionales de los grupos que consumieron edulcorantes durante 6 y 12 semanas

	G3sSTx				
	Media ± DE				
	n=6				
IMC (g/cm²)	0,192 ± 0,2				
Consumo de agua (ml) **	4,4 ± 0,194				
Glucemia (mg/l)	95 ± 8,45				
	G6sTx				P*
	CL6sTx	Sac6sTx	Sucr6sTx	Est6sTx	
	Media ± DE n=6	Media ± DE n=6	Media ± DE n=6	Media ± DE n=6	
IMC (g/cm ²)	0,294 ± 0,02	0,286 ± 0,013	0,298 ± 0,015	0,3 ± 0,016	0,408
Consumo de agua (ml) **	8,3 ± 0,839	7,8 ± 0,248	7,9 ± 0,019	8,2 ± 0,276	0,635
Consumo de alimento (g) **	39,2 ± 2,37	37,4 ± 0,427 ^a	38,5 ± 0,066	37,3 ± 1,36 ^a	0,025*
Consumo de edulcorante ** (mg/ml)	0	128 ± 9,79 ^b	22,7 ± 0,4	14,3 ± 1,22	0,001*
Aporte energético (kcal) **	118 ± 7,18	113 ± 1,29 ^a	116 ± 0,193	112 ± 4,11 ^a	0,028*
Glucemia (mg/dl)	135 ± 12	133 ± 2,7	128 ± 9	142 ± 9	0,689
	G12sTx				P*
	CL12sTx	Sac12sTx	Sucr12sTx	Est12sTx	
	Media ± DE n=6	Media ± DE n=6	Media ± DE n=6	Media ± DE n=6	
IMC (g/cm ²)	0,275 ± 0,013	0,288 ± 0,02	0,289 ± 0,014	0,289 ± 0,017	0,293
Consumo de agua (ml) **	8,1 ± 1,14	7,3 ± 0,267 ^a	7,7 ± 0,419	8,2 ± 0,229	0,042*
Consumo de alimento (g) **	35,1 ± 2,87	31,3 ± 1,45 ^a	33,6 ± 1,06 ^a	34,8 ± 2,71	0,007*
Consumo de edulcorante ** (mg/ml)	0	200 ± 6,68 ^b	28,4 ± 0,6	29 ± 0,644	0,001*
Aporte energético (kcal) **	106 ± 8,68	94,9 ± 4,39 ^a	101 ± 3,22	105 ± 8,18	0,008*
Glucemia (mg/dl)	136 ± 10	134 ± 14	130 ± 8,9	140 ± 3,2	0,648

*ANOVA de una vía para comparar los subgrupos por tipo de edulcorante consumido: ^a prueba post-hoc de Bonferroni, con $p < 0,05$, de los subgrupos que observaron disminución en su valor comparados con su control. ^b prueba post-hoc de Bonferroni, con $p < 0,05$, de los que presentaron incremento en su valor comparados con su control. ** ANOVA de dos vías entre las variables 3sSTx, 6sTx y 12sTx con diferencias significativas ($p < 0,05$) comparados en cuanto a tiempo de exposición a los edulcorantes

Los valores representan la media ± desviación estándar de los valores morfométricos y nutricionales de los ratones que consumieron edulcorantes durante 6 y 12 semanas. Los experimentos se realizaron por duplicado. Grupo de tres semanas sin tratamiento (3sSTx); grupos con 6 semanas de tratamiento (G6sTx): control (CL6sTx), sacarosa (Sac6sTx), sucralosa (Sucr6sTx) y estevia (Est6sTx); grupos con 12 semanas de tratamiento (G12sTx): control (CL12sTx), sacarosa (Sac12sTx), sucralosa (Sucr12sTx) y estevia (Est12sTx). IMC: índice de masa corporal

Consumo de edulcorante y glucemia

El edulcorante más consumido por los ratones fue la sacarosa. Se comparó el consumo de edulcorantes excluyendo los subgrupos de control (no consumieron edulcorante) (cuadro 2). Los ratones consumieron la sacarosa en gran cantidad: 128 mg (6sTx) y 200 mg (12sTx), por lo cual las diferencias fueron significativas entre los subgrupos Sac6sTx y Sac12sTx ($p < 0,001$), independientemente del tiempo de consumo en ambos grupos. Por el contrario, no se observaron diferencias entre los subgrupos de sucralosa y estevia ($p = 0,083$) a las 6 ni a las 12 semanas de tratamiento (cuadro 2). Al comparar los grupos por tiempo, se encontró que, al final de las 12 semanas, se había consumido mayor cantidad de edulcorantes ($p < 0,001$) en comparación con el G6sTx (cuadro 2).

La glucemia no se modificó con el consumo de edulcorantes. La glucemia de los grupos G6sTx y G12sTx se incrementó ($p < 0,001$), comparada con la del G3sSTx. A pesar de este incremento, al comparar los grupos G6sTx y G12sTx, no se evidenció diferencia entre ellos ($p = 0,874$), y la glucemia se mantuvo sin cambios según el tiempo y el consumo del edulcorante (cuadro 2).

Marcadores inmunológicos en linfocitos de las placas de Peyer y la lámina propia del intestino delgado

En las placas de Peyer, el porcentaje de linfocitos CD19+ se incrementó paulatinamente con el consumo prolongado de edulcorantes en el grupo G12sTx. En el G6sTx, este aumento fue significativo en los subgrupos Suc6sTx y Est6sTx ($p < 0,001$) comparados con el subgrupo CL6sTx. En el grupo G12sTx, los subgrupos Sac12sTx, Sucr12sTx y Est12sTx registraron aumento del porcentaje de linfocitos B CD19+ ($p < 0,001$). Al comparar los grupos G3sTx, G6sTx y G12sTx, se observó un incremento significativo ($p < 0,001$) del porcentaje de linfocitos CD19+ después de 12 semanas de tratamiento (cuadro 3).

El consumo de estevia incrementó el porcentaje de células IgA+ en los grupos G6sTx y G12sTx. El porcentaje de células IgA+ en el grupo G6sTx se elevó con el consumo de Sac6sTx, Sucr6sTx y Est6sTx ($p < 0,001$) comparado con el CL6sTx. Por el contrario, en el G12sTx, el porcentaje de IgA+ disminuyó en los subgrupos Sac12sTx y Sucr12sTx ($p < 0,001$), pero se incrementó en el subgrupo Est12sTx ($p < 0,001$) comparado con el grupo CL12sTx. El porcentaje de células IgA+ se elevó paulatina y significativamente en el G6sTx y el G12sTx ($p < 0,001$), comparados con el G3sTx (cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de linfocitos obtenidos de las placas de Peyer y la lámina propia del intestino delgado de ratones CD1 con consumo de edulcorantes por 6 y 12 semanas

G3sTx					
Media $\pm$ DE					
n=6					
CD19+PP (%)	55,1 $\pm$ 0,545				
IgA+ PP (%)	5,6 $\pm$ 0,267				
CD19+LP (%)	10,1 $\pm$ 0,577				
IgA+ LP (%)	16,3 $\pm$ 0,176				
G6sTx					
	CL6sTx	Sac6sTx	Sucr6sTx	Est6sTx	
	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	P
	n=6 (%)	n=6 (%)	n=6 (%)	n=6 (%)	
CD19+PP (%) **	55,7 $\pm$ 0,481	56,9 $\pm$ 0,513	64,8 $\pm$ 0,49 ^b	59 $\pm$ 0,229 ^b	0,001*
IgA+ PP (%)**	8,7 $\pm$ 0,32	17,7 $\pm$ 0,32 ^b	17,1 $\pm$ 0,267 ^b	10,7 $\pm$ 0,347 ^b	0,001*
CD19+LP (%)**	8,07 $\pm$ 0,085	3,4 $\pm$ 1,19 ^a	3,4 $\pm$ 1,09 ^a	8,9 $\pm$ 0,759	0,001*
IgA+ LP (%) **	20,7 $\pm$ 0,342	12,2 $\pm$ 0,261 ^a	34,6 $\pm$ 0,55 ^b	7,9 $\pm$ 0,545 ^a	0,001*
G12sTx					
	CL12sTx	Sac12sTx	Sucr12sTx	Est12sTx	
CD19+PP (%) **	63,6 $\pm$ 0,63	71,9 $\pm$ 0,497 ^b	69 $\pm$ 0,539 ^b	65,1 $\pm$ 1,03 ^b	0,001*
IgA+ PP (%) **	11,3 $\pm$ 0,324	6,08 $\pm$ 0,267 ^a	6,3 $\pm$ 0,32 ^a	17,6 $\pm$ 0,267 ^b	0,001*
CD19+LP (%) **	3,4 $\pm$ 0,267	3,7 $\pm$ 0,176	4,8 $\pm$ 0,63 ^b	9,1 $\pm$ 0,235 ^b	0,001*
IgA+ LP (%) **	16,3 $\pm$ 0,267	26,4 $\pm$ 0,545 ^b	24,3 $\pm$ 0,267 ^b	19,7 $\pm$ 0,347 ^b	0,001*

*ANOVA de una vía para comparar los subgrupos por tipo de edulcorante consumido: ^a prueba post-hoc de Bonferroni, con $p < 0,05$, de los subgrupos que disminuyeron el porcentaje de linfocitos y células IgA+ obtenidos de las placas de Peyer (PP) y la lámina propia (LP) al compararlos con su control. ^b Prueba post-hoc de Bonferroni, con $p < 0,05$, que incrementaron el porcentaje de linfocitos y células IgA+ obtenidos de las placas de Peyer (PP) y la lámina propia (LP) comparados con su control. **Comparación de los grupos por tiempo de tratamiento con los edulcorantes (3sTx, 6sTx y 12sTx) mediante ANOVA de dos vías y con diferencias significativas positivas ($p < 0,05$).

Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar del porcentaje de linfocitos CD19+ e IgA+ de las placas de Peyer y la lámina propia del intestino delgado, obtenidos por citometría de flujo con anticuerpos monoclonales. Los experimentos se realizaron por duplicado. Clusters de diferenciación (CD); inmunoglobulina A+ (IgA+); placas de Peyer (PP), lámina propia (LP). Grupo con tres semanas sin tratamiento (G3sTx), grupos con 6 semanas de tratamiento (G6sTx): control (CL6sTx), sacarosa (Sac6sTx), sucralosa (Sucr6sTx) y estevia (Est6sTx); grupos con 12 semanas de tratamiento (G12sTx): control (CL12sTx), sacarosa (Sac12sTx), sucralosa (Sucr12sTx) y estevia (Est12sTx)

Secreción de las citocinas TGF-beta, IL-12 e IL-17 en las placas de Peyer. La concentración de TGF-beta en el G6sTx se incrementó de forma significativa ($p<0,001$) con el consumo de Sac6sTx, Sucr6sTx y Est6sTx. El comportamiento de la secreción del TGF-beta en el G12sTx fue diferente, pues en los subgrupos Sac12sTx y Sucr12sTx su secreción se deprimió significativamente ($p<0,001$), en tanto que se elevó en el subgrupo Est12sTx, comparados con el subgrupo CL12sTx. Al comparar los grupos, se observó un incremento de la secreción ($p<0,001$) del TGF-beta con el consumo de estevia por tiempo prolongado (cuadro 4).

Cuadro 4. Concentración intracelular de citocinas obtenidas de linfocitos de las placas de Peyer y la lámina propia de ratones CD1 sometidos a consumo de edulcorantes por 6 y 12 semanas

G3sSTx					
Media ± DE n=6					
TGF-β PP (pg/ml)	3,4 ± 0,053				
IL-12 PP (pg/ml)	3 ± 0,069				
IL-17 PP (pg/ml)	1,4 ± 0,058				
TGF-β LP (pg/ml)	10,8 ± 0,053				
IL-12 LP (pg/ml)	6,7 ± 0,122				
IL-17 LP (pg/ml)	2,8 ± 0,112				
G6sTx					
	CL6sTx	Sac6sTx	Sucr6sTx	Est6sTx	
	Media ± DE n=6 (pg/ml)	Media ± DE n=6 (pg/ml)	Media ± DE n=6 (pg/ml)	Media ± DE n=6 (pg/ml)	Valor P
TGF-β PP (pg/ml) **	3,4 ± 0,053	11,6 ± 0,106 ^b	12,2 ± 0,069 ^b	11,2 ± 0,096 ^b	0,001*
IL-12 PP (pg/ml) **	2,1 ± 0,09	2,2 ± 0,08	2,7 ± 0,069 ^b	1,4 ± 0,058 ^a	0,001*
IL-17 PP (pg/ml) **	1,1 ± 0,08	2,9 ± 0,074 ^b	3,8 ± 0,058 ^b	3,3 ± 0,074 ^b	0,001*
TGF-β LP (pg/ml) **	11,5 ± 0,053	9,5 ± 0,106	16,9 ± 0,069 ^b	5,1 ± 0,096 ^a	0,001*
IL-12 LP (pg/ml) **	5,4 ± 0,096	12,9 ± 0,096 ^b	8,1 ± 0,069 ^b	2,8 ± 0,096 ^a	0,001*
IL-17 LP (pg/ml) **	3,8 ± 0,074	7,4 ± 0,074 ^b	7,8 ± 0,058 ^b	11,1 ± 0,074 ^b	0,001*
G12sTx					
	CL12sTx	Sac12sTx	Sucr12sTx	Est12sTx	
TGF-β PP (pg/ml) **	9,3 ± 0,16	1,8 ± 0,16 ^a	1,97 ± 0,16 ^a	18,96 ± 0,096 ^b	0,001*
IL-12 PP (pg/ml) **	2,3 ± 0,09	3,1 ± 0,08 ^b	1,08 ± 0,069 ^a	7,26 ± 0,058 ^b	0,001*
IL-17 PP (pg/ml) **	1,7 ± 0,08	4,4 ± 0,235 ^b	5 ± 0,053 ^b	5,32 ± 0,074 ^b	0,001*
TGF-β LP (pg/ml) **	11,5 ± 0,053	17,8 ± 0,106 ^b	18,7 ± 0,069 ^b	16,6 ± 0,096 ^b	0,001*
IL-12 LP (pg/ml) **	4,5 ± 0,096	5,2 ± 0,096 ^b	10,6 ± 0,069 ^b	1,2 ± 0,096 ^a	0,001*
IL-17 LP (pg/ml) **	3,3 ± 0,058	12,2 ± 0,074 ^b	12 ± 0,058 ^b	10,1 ± 0,08 ^b	0,001*

*ANOVA de una vía para comparar los subgrupos por tipo de edulcorante consumido: a prueba post-hoc de Bonferroni, con $p<0,05$, de los subgrupos que disminuyeron la concentración de citocinas comparados con su control; b prueba post-hoc de Bonferroni, con $p<0,05$, que incrementaron la concentración de citocinas comparados con su control. **Comparación entre los grupos por tiempo de exposición al edulcorante (3sTx, 6sTx y 12sTx), con ANOVA de dos vías y diferencias significativas positivas ($p<0,05$).

Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar de la concentración intracelular de las citocinas (TGF- β , IL-12 e IL-17), obtenidas por citometría de flujo de linfocitos CD19+ de las placas de Peyer y la lámina propia. Los experimentos se realizaron por duplicado. Grupo de tres semanas sin tratamiento (G3sTx); grupos con 6 semanas de tratamiento (G6sTx): control (CL6sTx), sacarosa (Sac6sTx), sucralosa (Sucr6sTx) y estevia (Est6sTx); grupos con 12 semanas de tratamiento (G12sTx): control (CL12sTx), sacarosa (Sac12sTx), sucralosa (Sucr12sTx) y estevia (Est12sTx). Placas de Peyer (PP); lámina propia (LP); factor de crecimiento transformador (TGF-); interleucinas 12 y 17 (IL-12, IL-17); picogramos por mililitro (pg/ml)

El consumo prolongado de sucralosa redujo la secreción de IL-12 pero esta se incrementó con el consumo de estevia. La secreción de IL-12 de los subgrupos CL6sTx y CL12sTx disminuyó con respecto al G3sTx (cuadro 4). Al comparar los subgrupos del G6sTx, la concentración de IL-12 disminuyó significativamente en el subgrupo Est6sTx ($p < 0,001$), y se incrementó con el consumo de Sucr6sTx comparado con el subgrupo CL6sTx (cuadro 4). En el G12sTx, la IL-12 se incrementó en los subgrupos Sac12sTx, especialmente en el Est12sTx, a diferencia del Sucr12sTx, en el que hubo una reducción en la secreción de IL-12 ($p < 0,001$) (cuadro 3). Al comparar los grupos G3sTx, G6sTx y G12sTx, se apreció que, con el consumo de sacarosa y de estevia, se elevó la concentración de IL-12 ($p < 0,001$).

La secreción de IL-17 se incrementó con el consumo prolongado de edulcorantes. La secreción de IL-17 se incrementó en los subgrupos Sac6sTx, Sucr6sTx y Est6sTx a las 6 semanas de tratamiento ($p < 0,001$), comparados con el subgrupo CL6sTx. Con 12 semanas de tratamiento, la secreción de esta interleucina se encontró fue más abundante en todos los subgrupos que consumieron edulcorantes (cuadro 4). Al comparar los grupos, se apreció una diferencia paulatina y significativa ($p < 0,001$) pues, cuanto mayor el tiempo de consumo de edulcorantes, mayor la concentración de la interleucina 17.

En la lámina propia, con el consumo de sacarosa y sucralosa ($p < 0,001$), se disminuyó el porcentaje de linfocitos B CD19+ a las 6 semanas de tratamiento (G6sTx) y no hubo cambios en la secreción con el consumo de estevia ($p = 0,369$). En el G12sTx, el incremento se observó en los subgrupos de estevia y sucralosa ($p < 0,001$) (cuadro 3). Al comparar los grupos según el tiempo de tratamiento, se apreció una reducción del porcentaje de linfocitos ($p < 0,001$) a las 6 (G6sTx) y 12 (G12sTx) semanas de tratamiento, comparados con el G3sTx (cuadro 3).

El consumo prolongado de edulcorantes modificó el porcentaje de IgA+ en la lámina propia. A las seis semanas de tratamiento, el porcentaje de IgA+ disminuyó con el consumo de Sac6sTx y Est6sTx ($p < 0,001$) y se incrementó significativamente con la Sucr6sTx, comparado con el subgrupo CL6sTx. En cambio, a las 12 semanas de consumo, se elevó en todos los subgrupos el porcentaje de IgA+ (cuadro 3). Al comparar los grupos según el tiempo de exposición al edulcorante (6 y 12 semanas), se observaron diferencias ($p < 0,001$) que disminuyeron con el consumo de sucralosa, pero se incrementaron con el de estevia comparados con sus controles, por lo cual la diferencia se puede atribuir al tipo de edulcorante y no al tiempo de exposición (cuadro 3).

Secreción de citocinas TGF- beta, IL-12 e IL-17 en la lámina propia. El TGF- beta en el G6sTx se encontró elevado en el subgrupo Sucr6sTx y disminuido en el subgrupo Est6sTx ($p < 0,001$) al compararlos con el subgrupo CL6sTx. Sin embargo, en el G12sTx, se elevó en todos los subgrupos: Sucr12sTx, Sac12sTx y Est12sTx, en ese orden (cuadro 4). Al comparar los grupos por tiempo de tratamiento, no hubo diferencia entre el G3sTx y los controles de los grupos G6sTx y G12sTx ($p = 0,873$), pero sí entre los controles y los subgrupos de edulcorantes, por lo cual las diferencias dependieron del consumo del edulcorante y no del tiempo de exposición, como sucedió con la IgA+ (cuadros 3 y 4).

La secreción de IL-12 se encontró elevada con el consumo de sacarosa y sucralosa, pero disminuyó con la estevia. En sincronía con lo anterior, la

secreción de IL-12 en los G6sTx y G12sTx se elevó de forma significativa con el consumo de sacarosa y sucralosa ($p < 0,001$), pero la secreción de IL-12 disminuyó en ambos grupos con el consumo de estevia ($p < 0,001$). Al comparar los grupos por tiempo de tratamiento, se observó que la IL-2 se incrementó ($p < 0,001$) a las 6 y 12 semanas de consumo de edulcorantes, comparados con el grupo G3sSTx (cuadro 4).

La IL-17 se elevó en todos los subgrupos suplementados con edulcorantes a las 6 y 12 semanas. En el G6sTx, la IL-17 se elevó con el consumo de los tres edulcorantes (cuadro 4). En el caso del G12sTx, el incremento fue similar en todos los subgrupos. Al comparar los grupos por tiempo de tratamiento, la IL-17 aumentó ($p < 0,001$) en los grupos G6sTx y G12sTx, comparados con el G3sSTx.

Diversidad bacteriana

La estructura de las comunidades bacterianas derivadas de la secuenciación del gen 16S se abordaron mediante la normalización del número de secuencias en las bibliotecas antes del cálculo de los parámetros de cobertura, diversidad, riqueza y uniformidad de Good. En cuanto al primer parámetro (Good), se observó una alta proporción de unidades taxonómicas operacionales con relación a las esperadas (90-99 % de cobertura) en todas las librerías (cuadro 5). En las muestras del grupo G3sSTx, los grupos bacterianos con el porcentaje de abundancia relativa más alto correspondieron a *Pseudomonas*, *Lactobacillus* y *Clostridium* (cuadro 6).

Las muestras de los subgrupos expuestos al consumo de edulcorantes CL6sTx, Sucr6sTx, Est6sTx y CL12sTx, presentaron una mayor riqueza según el índice de Shannon (H). Las muestras de los animales sometidos a consumo de edulcorante por 6 semanas (G6sTx), presentaron mayor diversidad según el índice inverso de Simpson. El subgrupo más abundante según el estimador de Chao1, fue el Est6sTx. La distribución de las unidades taxonómicas operacionales fue uniforme según el índice de Pielou (J) (cuadro 5).

Cuadro 5. Número de lecturas calificadas para la diversidad, riqueza y uniformidad del ADN de las comunidades bacterianas presentes en los sólidos intestinales de ratones CD1 sometidos a consumo crónico de edulcorantes

Grupo	Número de secuencias ^a	OTU ^b	Cobertura de Good ^c	Inv. Simpson ^c (inferior/superior)	Chao1 ^c (inferior/superior)	H ^c (inferior/superior)	J ^c
G3sSTx	58.350	270	0,99	1,965 (1,94/1,98)	1.691,1 (1.770,17/2.808,11)	0,75 (0,74/0,76)	0,93
CL6sTx	35.283	510	0,99	13,59 (13,28/13,92)	1.215,40 (1.006,39/1.524,73)	3,06 (3,04/3,08)	0,99
CL12sTx	36.357	340	0,99	5,09 (5,02/5,17)	1.090,6 (830,35/1.498,58)	2,24 (2,22/2,26)	0,99
SAC6sTx	28.979	849	0,97	7,084 (6,92/7,24)	2.893,9 (2.502,5/3.406,9)	2,67 (2,65/2,70)	0,99
SAC12sTx	72.818	232	0,99	1,06 (1,05/1,06)	1.106,5 (762,07/1.675,9)	0,159 (0,153/0,165)	0,95
SUC6sTx	33.594	216	0,99	15,63 (15,30/15,98)	1.525,58 (1.323,1/1.799,04)	2,92 (2,90/2,94)	0,98
SUC12sTx	51.654	727	0,98	1,29 (1,28/1,29)	1.268,3 (805,6/2.099,2)	0,45 (0,44/0,46)	0,97
EST6sTx	21.037	2.510	0,90	14,14 (13,77/14,54)	8.904,9 (8.030,3/9.918,35)	4,13 (4,10/4,17)	0,99
EST12sTx	24.650	281	0,99	7,01 (6,85/7,17)	760,7 (582,6/1.049,9)	2,52 (2,49/2,54)	0,99

^a El número de secuencias se obtuvo después de eliminar las secuencias de baja calidad ($N \geq 2$; homopolímeros ≥ 8) y las secuencias cortas (< 250 nt).

^b El número de unidades taxonómicas operacionales (OTU) observadas se definió sobre la base de una distancia máxima del 3 %.

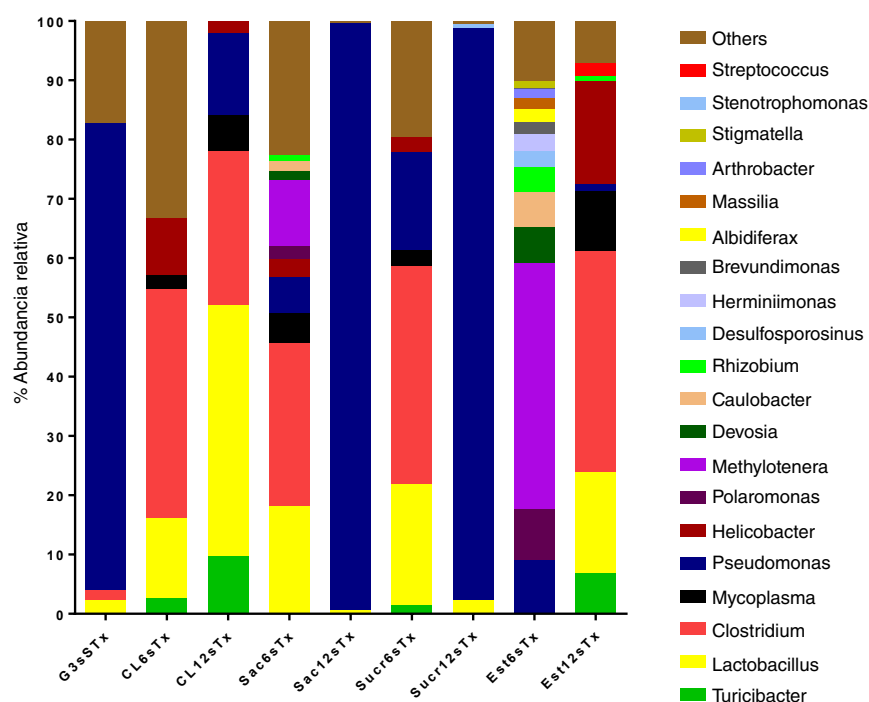
^c La biblioteca más pequeña (21.037 secuencias) se utilizó para la normalización de datos. Los resultados presentados son el promedio de 1.000 repeticiones. Los parámetros se estimaron utilizando MOTHUR. Los parámetros indican el número de lecturas calificadas, el número estimado de OTU y la cobertura, los estimadores de riqueza de especies (Good, Inv-Simpson), la diversidad de muestras (Chao 1), la diversidad (H') y la uniformidad (J') del ADN de las comunidades bacterianas presentes en los sólidos intestinales de ratones CD1 sometidos a consumo crónico de edulcorantes.

Cuadro 6. Abundancia relativa de los géneros bacterianos predominantes en las secuencias del gen de 16S rRNA de muestras intestinales sólidas de ratones CD1 sometidos al consumo de edulcorante por 6 y 12 semanas de tratamiento

Clase o filo	Género	Control %	Sacarosa %	Sucralosa %	Estevia %
G3sSTx					
γ -proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	78,76	-	-	-
Firmicutes	<i>Lactobacillus</i>	2,25	-	-	-
	<i>Clostridium</i>	1,74	-	-	-
G6sTx					
α -proteobacteria	<i>Devosia</i>	-	1,63	-	6,20
	<i>Caulobacter</i>	-	1,60	-	5,80
	<i>Rhizobium</i>	-	1,08	-	4,21
β -proteobacteria	<i>Methylobacter</i>	-	11,05	-	41,39
	<i>Polaromonas</i>	-	2,25	-	8,74
	<i>Brevundimonas</i>	-	-	-	2,18
	<i>Albidiferax</i>	-	-	-	2,16
	<i>Massilia</i>	-	-	-	1,83
δ -proteobacteria	<i>Stigmatella</i>	-	-	-	1,23
ϵ -proteobacterias	<i>Helicobacter</i>	9,56	2,94	2,53	-
γ -proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	-	6,13	16,50	8,94
Firmicutes	<i>Lactobacillus</i>	13,42	18,13	20,30	-
	<i>Clostridium</i>	38,77	27,51	36,80	-
	<i>Turicibacter</i>	2,67	-	1,45	-
	<i>Desulfosporosinus</i>	-	-	-	2,79
Tenericutes	<i>Mycoplasma</i>	2,25	5,04	2,80	-
Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	-	-	-	1,62
G12sTx					
ϵ -proteobacterias	<i>Helicobacter</i>	1,98	-	-	17,38
γ -proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	-	99,1	96,46	1,17
Firmicutes	<i>Lactobacillus</i>	42,18	-	2,33	17,14
	<i>Clostridium</i>	25,99	-	-	37,27
	<i>Turicibacter</i>	9,75	-	-	6,77
	<i>Desulfosporosinus</i>	-	-	-	-
	<i>Streptococcus</i>	-	-	-	2,09
Tenericutes	<i>Mycoplasma</i>	6,24	-	-	10,08

En el cuadro se muestra el porcentaje (%) de la abundancia relativa de los géneros bacterianos predominantes según tiempo y tipo de tratamiento. Todos los géneros presentaron diferencias significativas y una abundancia relativa >1.

En el grupo de ratones sometidos a consumo de edulcorante durante 6 semanas, se registraron diversos géneros. En el grupo CL6sTx, la abundancia relativa más alta correspondió a *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Helicobacter*, *Turicibacter* y *Mycoplasma*. En los subgrupos Sac6sTx y Sucr6sTx, hubo un mayor porcentaje de abundancia relativa de *Clostridium* y de *Lactobacillus*. En el subgrupo Est6sTx, hubo una mayor abundancia de *Methylobacter*, con presencia de otros géneros como *Devosia*, *Caulobacter*, *Rhizobium*, *Desulfosporosinus* y *Albidifereax*, entre otros (cuadro 6) (figura 2). En el G12sTx, el subgrupo CL12sTx mostró mayor abundancia de *Lactobacillus* con presencia de otros géneros como *Clostridium*, *Turicibacter*, *Mycoplasma* y *Helicobacter*. Hubo una disminución significativa en la diversidad bacteriana de las muestras de Sac12sTx, con una mayor abundancia relativa del género *Pseudomonas*, en tanto que, en el subgrupo Sucr12sTx, hubo presencia de *Pseudomonas* y *Lactobacillus* (cuadro 6). Por otra parte, en el grupo Est12sTx, la mayor abundancia correspondió a *Clostridium*, *Helicobacter*, *Lactobacillus*, *Mycoplasma*, *Turicibacter*, *Streptococcus* y *Pseudomonas*. Las frecuencias relativas de los géneros bacterianos predominantes basadas en las secuencias del gen ARN ribosómico 16S (16S rRNA), se presentan en el cuadro 6 y la figura 2.



Los datos obtenidos significan las medias de la secuenciación masiva de las regiones V6-V8 del gen 16S rRNA. Clasificación taxonómica con abundancia relativa a nivel de género de la lectura total de las secuencias. El análisis se hizo en MOTHUR utilizando la alineación de referencia bacteriana de Silva. Grupo de 3 semanas sin tratamiento (G3sSTx); grupos con 6 semanas de tratamiento (G6sTx): control (CL6sTx), sacarosa (Sac6sTx), sucralosa (Sucr6sTx) y estevia (Est6sTx); grupos con 12 semanas de tratamiento (G12sTx): control (CL12sTx), sacarosa (Sac12sTx), sucralosa (Sucr12sTx) y estevia (Est12sTx)

Figura 2. Composición de la microbiota obtenida de los sólidos del intestino delgado de ratones CD1 tratados o no con edulcorantes durante 6 y 12 semanas

Además, se analizaron los componentes principales para todas las lecturas de las secuencias del gen 16S rRNA según el tiempo de tratamiento para detectar diferencias en la composición bacteriana en las muestras. En el grupo de tratamiento G6sTx, los dos componentes principales explicaron el 70 % de la varianza de la diversidad beta de las muestras. En la figura 3, se observa que los subgrupos CL6sTx, Sac6sTx y Sucr6sTx se agruparon de manera positiva para ambos componentes, en tanto que el subgrupo de Est6sTx se agrupó de manera negativa para el PC2, lo que puede explicar el 17,7 % de la varianza. Además, el G3sSTx se agrupó bajo valores negativos para el PC1, lo que explicaría el 50,4 % de la varianza. Estas diferencias indican una mayor heterogeneidad en G3sSTx y Est6sTx (figura 3).

En los grupos tratados durante 12 semanas, los dos componentes principales explicaron un 81,5 % de la varianza. Los subgrupos Sac12sTx y Sucr12sTx presentaron una menor diversidad, agrupándose positivamente en el PC1 y explicando el 80,9 % de la varianza. El subgrupo CL12sTx puntuó negativamente para ambos componentes y el subgrupo Est6sTx se ubicó positivamente en el PC2, el cual explica únicamente el 8,6 % de la varianza (figura 3).

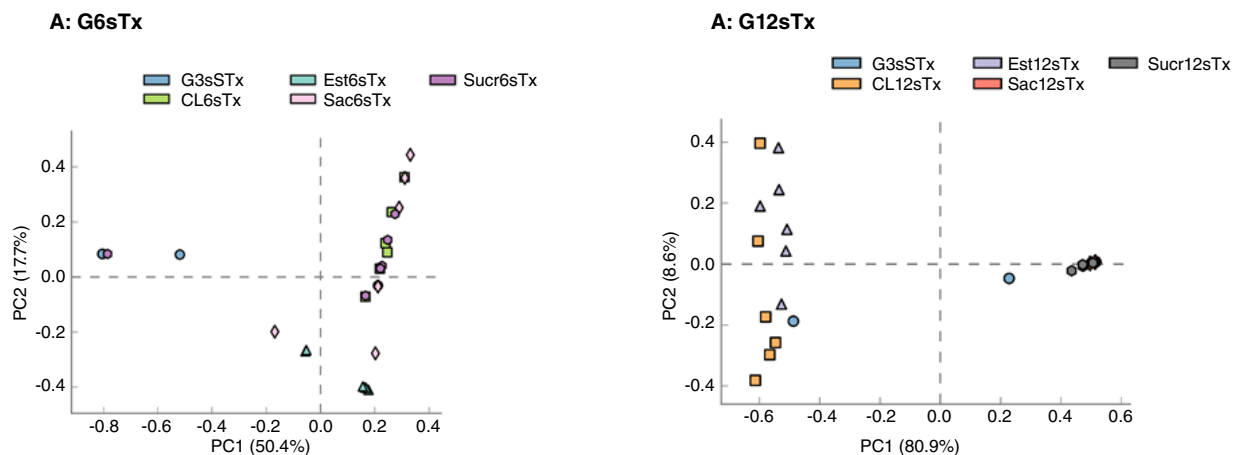


Figura 3. Gráfico del análisis coordinado principal (plot ACoP) de comunidades bacterianas presentes en el contenido sólido del intestino delgado de ratones CD1 que consumieron edulcorantes durante 6 semanas (A: G6sTx) y 12 semanas (B: G12sTx). G3sSTx. Grupos con 6 semanas de tratamiento (G6sTx): control (CL6sTx), sacarosa (Sac6sTx), sucralosa (Sucr6sTx) y estevia (Est6sTx); grupos con 12 semanas de tratamiento (G12sTx): control (CL12sTx), sacarosa (Sac12sTx), sucralosa (Sucr12sTx) y estevia (Est12sTx)

Discusión

Consumo de alimento, agua y edulcorante, aporte energético, peso corporal e IMC, según cada edulcorante

Sacarosa. En el G6sTx, los ratones disminuyeron su consumo de alimento y agua y, por lo tanto, el aporte calórico, con un incremento sustancial del consumo de sacarosa y sin cambios en el IMC. Este comportamiento podría deberse a que el gran consumo de sacarosa pudo ocasionarles sensación de saciedad, lo que resultó en la moderación del consumo de alimento. Ello coincide con un estudio previo en el que se señaló cómo el consumo crónico de alimentos dulces con sacarosa podría inducir comportamientos adictivos y desembocar en una mayor ingestión de alimentos dulces y menor consumo de alimento (36). Tales conductas adictivas se han visto también al administrar soluciones endulzadas con sacarosa a ratas, con la consecuente disminución en el consumo de alimento (37). En otro estudio en el que los ratones consumieron glucosa, su sensibilidad a la insulina aumentó y el porcentaje de grasa corporal se elevó (38), aunque no hubo modificaciones en el IMC.

En este sentido, todavía hay controversia sobre si las dietas que contienen hidratos de carbono, como sacarosa, maltodextrinas y almidón, inducen cambios metabólicos (39). En otro estudio en ratas expuestas a sacarosa, se observaron reacciones fisiológicas y conductuales similares a las provocadas por el abuso de drogas como la cocaína o las anfetaminas (40), lo que explicaría el gran consumo de sacarosa en este estudio. Lo que es un hecho es que la exposición repetida a la sacarosa ocasiona tolerancia a sus efectos, lo cual se ha comprobado en animales que desarrollaron una reacción compensatoria caracterizada por la hiperactividad asociada con su consumo (41).

Sucralosa. En el subgrupo Sucr6sTx, los ratones no modificaron la cantidad de alimento consumido en comparación con el subgrupo de control, sin embargo, disminuyeron su consumo de agua. Los ratones consumieron mayor cantidad de sucralosa que de estevia (22,7 mg/ml de sucralosa Vs. 14,31 mg/ml de estevia), con escaso aporte energético, pero sin cambios en el IMC (cuadro 2). En el G12sTx, el consumo de alimento y agua y el aporte

energético disminuyeron y hubo un mayor consumo de edulcorante (28,47 mg/ml) en comparación con el G6sTx (22,77 mg/mL), aunque sin cambios en el IMC (cuadro 2).

Los estudios sobre la sucralosa han suscitado controversias. En uno con ratas macho, se encontró que el consumo de sucralosa durante 12 semanas aumentó la expresión de la P-glucoproteína y el citocromo P450, lo que sugiere que el cuerpo podría estar tratando a la sucralosa como una toxina que requiere ser eliminada (42). La sucralosa es un edulcorante artificial intenso cuya dulzura se correlaciona con fuertes enlaces de hidrógeno, agua y azúcar (39), lo cual genera preferencia por su consumo, pero con la ventaja de que no aporta calorías a diferencia de la sacarosa. A pesar de su inocuidad, hasta ahora continúa la controversia frente a su efecto sobre el IMC.

Estevia. El consumo de estevia durante 6 semanas (Est6sTx) disminuyó el consumo de alimento y no produjo cambios en el consumo de agua, comparado con el grupo de control. Se consumieron 14,31 mg/semana de estevia, proporción mucho menor que la del consumo de sacarosa y sucralosa (cuadro 2). El aporte energético fue el más bajo de los tres grupos y no hubo cambios en el IMC como sucedió con la sucralosa. En el subgrupo Est12sTx, no se apreciaron cambios en el consumo de alimento o agua, en el aporte energético ni el IMC, y los ratones elevaron el consumo de estevia comparado con el subgrupo tratado por 6 semanas (Est6sTx). Se ha reportado que el consumo de estevia en el desayuno reduce el consumo de alimento durante el resto del día en comparación con los alimentados con sacarosa (43). En este estudio el edulcorante se administró en la mañana, lo que podría explicar este comportamiento.

En cuanto al IMC y su relación con el consumo de edulcorantes no nutritivos, esta sigue suscitando controversia, aunque se sabe que es multifactorial y depende del sexo, la edad, el tipo de dieta, el estilo de vida e, incluso, la raza (3). Los resultados del presente estudio coinciden con lo reportado por Figlewicz, *et al.* y Dhingra, *et al.*, autores que concluyeron que el consumo de sucralosa y estevia no aumentó el peso corporal ni el IMC en ratas (44,45), aunque también subrayan las diferencias debidas a la especie o sexo.

En este sentido, el contenido de la dieta actúa de forma distinta en cada individuo, como se resalta en el estudio de Nishikawa, *et al.* Los autores compararon seis cepas diferentes de roedores que, a pesar de recibir la misma dieta, se comportaron de forma diferente, pues cada una reguló la cantidad de alimento consumido (46), situación que también se apreció en nuestro estudio, especialmente con el consumo de sacarosa. Por otro lado, el gusto influye en la predilección por uno u otro nutriente. En el estudio de South, *et al.*, se observó que cada cepa de ratones prefirió un tipo particular de alimento que, en este caso, fue la sacarosa frente a la sucralosa y la estevia (47). Se han descrito, además, cepas resistentes a la dieta, ya que no ganan peso aun cuando se les brindan dietas elevadas en grasa o hidratos de carbono (48).

En el presente estudio, el IMC no se modificó en ningún subgrupo, ni siquiera cuando los animales tuvieron un consumo prolongado de edulcorantes. En el caso de la sucralosa y la estevia, esto puede explicarse por su bajo índice calórico, pero la sacarosa, a pesar de su alto índice glucémico, ocasionó una disminución en el consumo de alimento, lo que permitió que el IMC no se incrementara. Asimismo, resulta benéfico reducir la exposición al sabor dulce en la dieta, ya que los edulcorantes artificiales, aunque reducen el consumo de

calorías, fomentan la ansiedad y la dependencia (49). Otro factor que explica este fenómeno es el hecho de que los edulcorantes activan señales intestinales y gástricas que ocasionan un efecto sinérgico sobre la saciedad, además de modular el consumo de alimento (2,37).

Se considera que el aumento de peso en los individuos es de origen multifactorial (genético, ambiental, conductual, etc.). Las dietas ricas en glucosa y calorías influyen en el apetito de los animales, ya que disminuyen el consumo de alimento (50), situación que se observó con el consumo de sacarosa en el presente estudio. Así pues, la dieta por sí sola no produce un aumento significativo de peso. La controversia sobre los efectos del consumo de edulcorantes bajos en calorías en la salud continúa, pues se ha asociado positivamente con la ganancia de peso y la diabetes, pero también con un IMC bajo y pérdida de peso, además de casos sin relación con el peso corporal y ciertos parámetros metabólicos (51).

Consumo de edulcorante y glucemia. La glucemia no se modificó con el consumo de edulcorantes. Aunque la sacarosa tiene un mayor aporte calórico (4 kcal/g), los niveles de glucemia no fueron estadísticamente diferentes a los de los ratones que consumieron sucralosa (menos de 2 kcal/g). Estos resultados coinciden con los obtenidos recientemente por Grotz, *et al.*, quienes demostraron que el consumo de sucralosa y estevia no aumentaban la glucemia (52).

Relación con la microbiota de los marcadores inmunológicos en las placas de Peyer y la lámina propia

En el intestino delgado residen aproximadamente 104 unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) de contenido intestinal en la parte superior y 108 UFC/g en la región distal del íleon, cifra que aumenta (1014 UFC/g) en el intestino grueso (53). Hay diversos factores que influyen en la composición de las comunidades bacterianas, como las modificaciones en los gradientes químicos o en la disposición de nutrientes, y la situación inmunitaria del huésped (54). Sucede igual en la homeostasis de las comunidades bacterianas, especialmente en el estado nutricional del individuo (55). Cuando este equilibrio se pierde, se producen modificaciones en el tipo de especies y su abundancia (56), y se altera su comunicación con las vías inmunitaria y nerviosa. Por ejemplo, se ha descrito, que interfieren en la elaboración de moléculas de señalización y el reconocimiento de compuestos bacterianos por parte de las células inmunitarias del epitelio y de la lámina propia (57). El estudio de la microbiota del intestino delgado tiene gran importancia para el funcionamiento endocrino y del tejido linfoide asociado al intestino, pues en él se lleva a cabo cerca del 90 % de la extracción de energía proveniente de la dieta (56); además, la absorción de nutrientes depende del buen funcionamiento e integridad de la mucosa, incluida la microbiota (58). La mayoría de las investigaciones en este campo se enfocan en el estudio de la microbiota derivada de heces fecales del intestino grueso (59), por lo que es la que cuenta con la descripción más completa hasta el momento.

Sacarosa. Al comparar los parámetros inmunitarios por compartimiento, se pudo observar que la sacarosa tuvo un efecto importante cuando su consumo fue prolongado (12 semanas), ya que elevó el porcentaje de linfocitos CD19+ y disminuyó el de las células IgA+ en las placas de Peyer, debido, quizá, a la falta de cambio del isotipo de linfocitos a células plasmáticas al reducirse la secreción de TGF-beta, principal estimulador de este proceso.

En la lámina propia, no se modificó el porcentaje de linfocitos CD19+ y las células IgA+ se incrementaron quizá por el aumento en la migración desde las placas de Peyer y el cambio de isotipo por la estimulación del TGF-beta elevado. En ambos compartimientos se incrementaron las interleucinas IL-12 e IL-17 (cuadro 4), lo que permite concluir que la sacarosa podría actuar como estimulador de los linfocitos B vírgenes para transformarlos en células plasmáticas productoras de IgA+.

La diversidad bacteriana fue mayor en el grupo G6sTx que en el G12sTx (figura 2) (cuadros 5 y 6). La gran diversidad bacteriana observada a las 6 semanas de tratamiento pudo deberse a la estimulación de la sacarosa en las placas de Peyer, con la consecuente elevación de la IL-12 y la IL-17 (60). La estimulación del compartimiento inductor (placa de Peyer) podría explicarse por el incremento del porcentaje de células IgA+ y de las citocinas TGF-beta, IL-12 e IL-17 en la lámina propia. Por el contrario, la diversidad bacteriana se redujo con el consumo de sacarosa durante 12 semanas, ya que solo se encontraron proteobacterias del género *Pseudomonas*. Esta reducción en las comunidades bacterianas puede explicarse también por la reducción en el porcentaje de células IgA+, lo que ocasiona una transición incompleta a una microbiota madura y, por lo tanto, mayor propensión a las lesiones intestinales (61). La producción elevada de citocinas IL-12 e IL-17 podría ser la consecuencia de una reacción protectora para mantener la homeostasis y la integridad de la barrera intestinal y, quizá, un intento de estimular a la población bacteriana y revertir su reducción.

Se puede inferir, entonces, que el tiempo prolongado de consumo de sacarosa modificaría el comportamiento de los linfocitos de las placas de Peyer y la lámina propia, y alteraría a largo plazo la composición microbiana, ocasionando una disbiosis. Se ha reportado que los edulcorantes artificiales ocasionan disbiosis microbiana y efectos metabólicos adversos en los roedores (62) y, a pesar de que la sacarosa no es un edulcorante artificial, podría tener un efecto similar. Por otro lado, los niveles elevados de IL-12 e IL-17 pueden ser una reacción protectora para mantener la homeostasis y la integridad de la barrera intestinal (60) (figura 2) (cuadro 6).

Este efecto coincide con un reporte que indica que las dietas ricas en hidratos de carbono simples, como la sacarosa, reducen notablemente el ecosistema bacteriano (63). Si se toma en cuenta que los azúcares y edulcorantes se absorben activamente en el intestino delgado a través de transportadores de azúcar, y que únicamente entre el 5 y el 30 % de estos llega al intestino grueso (64), resulta congruente que exista mayor interacción en la mucosa y la luz del intestino delgado que en el intestino grueso. Estos azúcares son sustratos muy utilizados que enriquecen a los microbios del intestino delgado en comparación con los del intestino grueso (65). Otro ejemplo es el de los hidratos de carbono, como la fructosa, los alcoholes de azúcar y algunos edulcorantes, entre ellos la sucralosa, que son poco o pasivamente absorbidos en el intestino delgado, por lo que la variación de los microbios encontrados *depende de la* variación de los azúcares o edulcorantes presentes allí (64).

Sucralosa. A las 6 semanas de tratamiento (G6sTx), los linfocitos CD19+ de las placas de Peyer aumentaron significativamente, al igual que las células IgA+, el TGF-beta, la IL-12 y la IL-17. En la lámina propia, en cambio, los linfocitos CD19+ disminuyeron, con un incremento de las células IgA+, el TGF-beta, la IL12 y la IL-17. Estas últimas se incrementaron en

ambos compartimientos, quizá como consecuencia de su interacción con la microbiota modificada constituida por proteobacterias, firmicutes y tenericutes, y géneros diversos como *Helicobacter*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Turicibacter* y *Mycoplasma*.

En el grupo G12sTx, en cambio, se mantuvo en las placas de Peyer el incremento de los linfocitos CD19+ y la secreción de IL-17, pero se redujo la cantidad de células IgA+ y la secreción de TGF-beta e IL-12. En la lámina propia, se observó incremento de CD19+ e IgA+, quizá por el aumento en su migración desde la placa de Peyer y su estimulación por parte del TGF-beta elevado. Como se puede apreciar, a las 12 semanas los cambios en los parámetros inmunitarios en ambos compartimientos podrían indicar que el consumo crónico de sucralosa sí afectó la inmunidad de la mucosa del intestino delgado.

La elevación de los linfocitos BCD19+ y la IL-17 en las placas de Peyer podría ser un mecanismo compensatorio, con una marcada disminución de IgA+, lo cual indicaría que no hubo una activación de los linfocitos BCD19+ hacia células plasmáticas productoras de IgA+, o cambio de isotipo, o que las células migraron aceleradamente hacia la lámina propia, donde su número aumentó. El incremento de TGF-beta, IL-12 e IL-17 puede explicarse por una mayor migración de los linfocitos BCD19+ de las placas de Peyer hacia la lámina propia, con estimulación *in situ* de los linfocitos BCD19+ para la activación y el cambio de isotipo, y con la consecuente estimulación en la secreción de IL-12 e IL-17 en la lámina propia.

Esto puede deberse a la reducción de la diversidad bacteriana que ocasionó poca estimulación de la mucosa intestinal, ya que únicamente se encontraron dos clases de organismos, proteobacterias y firmicutes, y dos géneros, *Pseudomonas* y *Lactobacillus*. Se puede inferir, entonces, que cuanto más prolongado es el tiempo de consumo de la sucralosa, mayor es el daño a la diversidad de la microbiota del intestino delgado y, por ende, mayor la modificación de la población de linfocitos BCD19+ y células IgA+. El tiempo prolongado de consumo sí afecta la composición bacteriana.

No obstante, los resultados aún son contradictorios, ya que ahora se pone en duda que la sucralosa no se metabolice y se excrete sin cambios. Se ha descrito en ratas que la sucralosa se metaboliza en compuestos que son menos polares y, por lo tanto, más lipofílicos que el compuesto original. Se encontró que la sucralosa se retuvo en el tejido adiposo dos semanas después del cese de la ingestión (66). Por lo tanto, el concepto de su inocuidad, no absorción y los posibles efectos crónicos del consumo habitual, se han cuestionado. Los resultados de varios estudios recientes plantean una serie de problemas con respecto a la seguridad potencial de la ingestión crónica de la sucralosa en humanos (67).

Otro hallazgo sugiere que esta tiene mayor tendencia a unirse con bolsas hidrofóbicas en las superficies de las proteínas, lo cual podría provocar su interacción débil con ellas y la desestabilización de sus estructuras (68). Este mecanismo podría influir en la desestabilización de las membranas celulares de algunos tipos de bacterias de la microbiota intestinal y, con ello, disminuir la población bacteriana, lo que ocurrió en este estudio. Se ha documentado que dicho desequilibrio y la reducción en la composición de la microbiota intestinal, son parcialmente responsables de enfermedades como alergias, cáncer gástrico, enfermedad de Crohn, obesidad y enfermedad inflamatoria intestinal (67). Sin embargo, no se ha reportado una relación directa entre el consumo

de sucralosa y estas enfermedades, y se reconoce, más bien, como uno de los factores causales, especialmente en la enfermedad inflamatoria intestinal (69).

En la obesidad sí se ha demostrado que la sucralosa altera la relación huésped-microbio en el intestino (70), pero sigue siendo un hecho que los estudios todavía son contradictorios en este aspecto. Por ejemplo, en el estudio de Abou-Donia, *et al.*, en ratas macho suplementadas durante 12 semanas con Splenda, edulcorante que contiene sucralosa, se reportó una reducción de las bifidobacterias, lactobacilos, *Bacteroides*, clostridios y las bacterias aeróbicas totales, con pérdidas de hasta 79,7 % en los lactobacilos. Los autores concluyeron que la sucralosa administrada como Splenda reduce el número de bacterias intestinales autóctonas y promueve una mayor supresión de anaerobios usualmente benéficos (lactobacilos y bifidobacterias), con menos inhibición para bacterias perjudiciales (enterobacterias) (70).

En el presente estudio, la composición bacteriana en el G6sTx se redujo y modificó, y solo se registraron los géneros *Helicobacter*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Turicibacter*, y *Mycoplasma*, en tanto que, en el G12sTx, se evidenció una pérdida casi total de las comunidades bacterianas, con presencia únicamente de *Pseudomonas* y *Lactobacillus*. La controversia persiste, ya que según Brusick, *et al.*, los resultados en cuanto a la modificación de la microbiota con el consumo de sucralosa no son concluyentes (71), pues se asevera que esta también ocurre como resultado de una variación biológica normal (72). Por último, se plantea que la perturbación de *Bacteroides* por consumo de sucralosa aumenta la posibilidad de afectar la estabilidad de todo el ecosistema bacteriano en el tubo digestivo, ya que esta tiene un papel crítico en la estabilidad y la resistencia de la colonización intestinal (66).

Estevia. El comportamiento de los grupos tratados con estevia fue completamente diferente al de los tratados con sacarosa y sucralosa. En el G6sTx, la estevia se comportó como un estimulador de las placas de Peyer, ya que se incrementó el porcentaje de linfocitos BCD19+, IgA+, TGF-beta e IL-17, lo cual también explicaría la gran diversidad bacteriana que se encontró en este grupo (figura 2). La IL-12 disminuyó significativamente, quizá por no reconocer a la estevia como un patógeno, sino porque permite una adecuada relación simbiótica entre la microbiota y la mucosa del intestino delgado. Ahora bien, en la lámina propia se incrementaron los linfocitos BCD19+ y la IL-17, pero disminuyeron las células IgA+, tal vez debido a que las células de la placa de Peyer no migraron en abundancia, ya que el estímulo no fue reconocido como nocivo, lo que también redujo la secreción de TGF-beta e IL-12.

La diversidad bacteriana incluyó, principalmente, proteobacterias, firmicutes y actinobacterias, con 13 géneros diferentes, entre ellos: *Devosia*, *Caulobacter*, *Rhizobium*, *Methylothera*, *Polaromonas*, *Brevundimonas*, *Albidiferax*, *Masilia*, *Stigmatella*, *Pseudomonas*, *Desulfosporosinus*, *Mycoplasma* y *Athrobacter* (figura 3). El mismo comportamiento se pudo apreciar en el G12sTx (cuadro 6), aunque con modificaciones en la diversidad bacteriana con respecto al G6sTx, ya que continuaron apreciándose las proteobacterias y firmicutes, pero no así las actinobacterias; en su lugar, aparecieron tenericutes y siete géneros: *Helicobacter*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Turicibacter*, *Streptococcus* y *Mycoplasma*.

Entre las propiedades de la estevia estudiadas hasta el momento, se encuentran su actividad antidiabética, anticariogénica, antioxidante,

hipotensiva y antihipertensiva, antiinflamatoria y antitumoral. Como parte de su actividad antimicrobiana, *Estevia rebaudiana* inhibe el crecimiento de ciertas bacterias patógenas, por lo cual se utiliza para tratamiento de heridas, llagas y enfermedades de encías (73). Su actividad bactericida se ha estudiado en extractos acuosos que resultaron efectivos contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y su variedad enterohemorrágica, y *Salmonella typhimurium* (74).

La estevia aparentemente no afecta la microbiota intestinal endémica, lo que se explicaría porque favorece su abundante proliferación y no daña o compite por los sustratos de las bacterias, favoreciendo su abundancia y diversidad. Asimismo, es un hecho que los fructanos derivados de la planta mejoran el crecimiento de cepas microbianas seleccionadas como las bifidobacterias y los lactobacilos, importantes para la función intestinal (75). Los organismos de *Bacteroides* son abundantes en el tubo digestivo y pueden hidrolizar eficientemente el esteviósido y el rebaudiósido A a esteviol, lo que no sucede con los lactobacilos, las bifidobacterias, *Clostridium*, y las especies de coliformes y enterococos, ya que no utilizan glucósidos de esteviol como sustrato (62).

En el presente estudio, no se registró la presencia de *Bacteroides* en ninguno de los tres grupos de estudio, por lo tanto, se puede aseverar que es una especie propia del colon que no es abundante en intestino delgado. Lo cierto es que la estevia aumenta el índice de diversidad de Shannon en el colon debido a su efecto sobre la uniformidad de la comunidad de microbiomas, más que por un impacto en la riqueza de unidades taxonómicas operacionales (75).

Se encontraron, en el presente estudio, proteobacterias del género *Methylobacteria*, las cuales se utilizan como acelerador del crecimiento y están presentes de forma habitual en las hojas de la planta de *E. rebaudiana* (76). La presencia de esta bacteria no se detectó en el grupo de sucralosa, pero sí en el de sacarosa (G6sTx). Además, se ha observado en muestras de heces fecales de ratones de la misma edad y condición una gran proporción de firmicutes y actinobacterias y, en menor proporción, proteobacterias y tenericutes (77). A pesar de que las muestras en este estudio proceden del contenido sólido del intestino delgado, la presencia de firmicutes y la dominancia de proteobacterias fueron constantes, como se ha reportado en otros estudios (78). La elevada prevalencia de proteobacterias se ha interpretado como un posible marcador de disbiosis y, por lo tanto, de riesgo de enfermedad (79).

Lo que se ha podido comprobar, en general, es que el uso de edulcorantes no calóricos puede alterar la proliferación de las proteobacterias en el intestino, particularmente en el colon, comportamiento que en este estudio también se observó en el intestino delgado (80). Otro ejemplo de esta disbiosis es el incremento de las betaproteobacterias, que se relaciona con alteraciones metabólicas como la diabetes mellitus de tipo 2 (81). Lo dicho deja claro el hecho de que el tipo de dieta modifica la composición de la microbiota en ambas porciones del intestino.

El consumo de agua y alimento, y el aporte energético disminuyeron con el consumo de sacarosa a las 12 semanas, sin cambios en el IMC ni la glucemia. El edulcorante más consumido por los ratones fue la sacarosa. Después de 12 semanas de consumo de sacarosa y sucralosa, se incrementaron en las placas de Peyer los porcentajes de CD19+ e IL-17, con disminución de

IgA+ y de TGF- β , así como de la diversidad bacteriana, especialmente con el consumo de sucralosa. Por el contrario, la estevia mejoró el porcentaje de linfocitos BCD19+, IgA+, TGF- β , IL-12 e IL-17, y mantuvo niveles favorables de diversidad bacteriana. La estevia interactuó de forma saludable con la mucosa intestinal, comparada con la sacarosa y la sucralosa.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca de doctorado concedida y a la Universidad Autónoma del Estado de México, por el financiamiento de este proyecto.

Referencias

1. Gil-Campos M, San José-González MA, Díaz Martín JJ. Uso de azúcares y edulcorantes en la alimentación del niño. Recomendaciones del Comité de Nutrición de la Asociación Española de Pediatría. *Anales de Pediatría*. 2015;83:353.e1-e7. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2015.02.013>
2. García-Almeida JM, Casado-Fernández GM, García-Alemán J. Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. *Nutr Hosp*. 2013;28:17-31. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.sup4.6793>
3. Durán-Agüero S, Cornwall JR, Vega CE, Salazar de Ariza J, Arrivillaga KC, del Pilar M, *et al.* Consumo de edulcorantes no nutritivos en bebidas carbonatadas en estudiantes universitarios de algunos países de Latinoamérica. *Nutr Hosp*. 2015;31:959-65. <http://doi.org/10.3305/nh.2015.31.2.8026>
4. Johnston CA, Stevens B, Foreyt JP. The role of low-calorie sweeteners in diabetes. *Eur Endocrinol*. 2013;9:96-8. <https://doi.org/10.17925/EE.2013.09.02.96>
5. Betton GR. A review of the toxicology and pathology of the gastrointestinal tract. *Cell Biol Toxicol*. 2013;29:321-38. <https://doi.org/10.1007/s10565-013-9257-y>
6. Volk N, Lacy B. Anatomy and physiology of the small bowel. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2017;27:1-13. <https://doi.org/10.1016/j.giec.2016.08.001>
7. Rubio CA, Schmidt PT. Gut-associated lymphoid tissue (GALT) carcinoma or dome carcinoma? *Anticancer Res*. 2016;36:5385-87. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11113>
8. Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Castellote C, Franch A, Castell M. El intestino: pieza clave del sistema. *Rev Esp Enferm Dig*. 2008;100:29-34. <https://doi.org/10.4321/s1130-01082008000100006>
9. Rinninella E, Cintoni M, Raoul P, Lopetuso LR, Scaldaferri F, Pulcini G, *et al.* Food components and dietary habits: Keys for a healthy gut microbiota composition. *Nutrients*. 2019;11:2393. <https://doi.org/10.3390/nu11102393>
10. Macpherson AJ, Geuking MB, McCoy KD. Homeland security: IgA immunity at the frontiers of the body. *Trends Immunol*. 2012;33:160-7. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.02.002>
11. Honda K, Littman DR. The microbiome in infectious disease and inflammation. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:759-95. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074937>
12. Kamada N, Núñez G. Role of the gut microbiota in the development and function of lymphoid cells. *J Immunol*. 2013;190:1389-95. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203100>
13. Fagarasan S, Muramatsu M, Suzuki K, Nagaoka H, Hiai H, Honjo T. Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science*. 2002;298:1424-7. <https://doi.org/10.1126/science.1077336>
14. Albright AR, Kabat J, Li M, Raso F, Reboldi A, Muppidi JR. TGF- β signaling in germinal center B cells promotes the transition from light zone to dark zone. *J Exp Med*. 2019;216:2531-45. <https://doi.org/10.1084/jem.20181868>
15. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 2000;117:1162-72. <https://doi.org/10.1378/chest.117.4.1162>
16. Talaat RM, Mohamed SF, Bassyouni IH, Raouf AA. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. *Cytokine*. 2015;72:146-53. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.12.027>

17. Lochner M, Bérard M, Sawa S, Hauer S, Gaboriau-Routhiau V, Fernández TD, *et al.* Restricted microbiota and absence of cognate TCR antigen leads to an unbalanced generation of Th17 cells. *J Immunol.* 2011;186:1531-7. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001723>
18. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:821-52. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141557>
19. Behzadi P, Behzadi E, Ranjbar R. IL-12 family cytokines: General characteristics, pathogenic microorganisms, receptors, and signalling pathways. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2016;63:1-25. <https://doi.org/10.1556/030.63.2016.1.1>
20. Rosales-Gómez CA, Martínez-Carrillo BE, Reséndiz-Albor AA, Ramírez-Durán N, Valdés-Ramos R, Mondragón-Velásquez T, *et al.* Chronic consumption of sweeteners and its effect on glycaemia, cytokines, hormones, and lymphocytes of GALT in CD1 mice. *Biomed Res Int.* 2018;1345282. <https://doi.org/10.1155/2018/1345282>
21. Martínez-Carrillo BE, Rosales-Gómez CA, Ramírez-Durán N, Reséndiz-Albor AA, Escoto-Herrera JA, Mondragón-Velásquez T, *et al.* Effect of chronic consumption of sweeteners on microbiota and immunity in the small intestine of young mice. *Int J Food Sci.* 2019;2019:9619020. <https://doi.org/10.1155/2019/9619020>
22. de Aluja AS. Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gac Med Mex.* 2002;138:295-8.
23. Arriola-Peñalosa MA. Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Métodos de prueba. Norma Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011. Diario Oficial de la Federación, 10 de febrero de 2012. Fecha de consulta: 20 de febrero de 2021. Disponible en: <http://dof.gob.mx/normasOficiales/4643/salud/salud.htm>
24. Novelli EL, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Mani F, *et al.* Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim.* 2007;41:111-9. <https://doi.org/10.1258/00236770779399518>
25. Diniz YS, Burneiko RM, Seiva FR, Almeida FQ, Machado-Galhardi C, Novelli-Filho JL, *et al.* Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. *Int J Cardiol.* 2008;124:92-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2006.12.025>
26. Frank J, Wallace JF, Pardo S, Parkes JL. Performance of the CONTOUR® TS Blood Glucose Monitoring System. *J Diabetes Sci Technol.* 2011;5:198-205. <https://doi.org/10.1177/193229681100500128>
27. Goodyear AW, Kumar A, Dow S, Ryan EP. Optimization of murine small intestine leukocyte isolation for global immune phenotype analysis. *J Immunol Methods.* 2014;405:97-108. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.01.014>
28. Reséndiz-Albor AA, Esquivel R, López-Revilla R, Verdín L, Moreno-Fierros L. Striking phenotypic and functional differences in lamina propria lymphocytes from the large and small intestine of mice. *Life Sci.* 2005;76:2783-803. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.08.042>
29. Arciniega-Martínez IM, Campos-Rodríguez R, Drago-Serrano ME, Sánchez-Torres LE, Cruz-Hernández TR, Reséndiz-Albor AA. Modulatory effects of oral bovine lactoferrin on the IgA response at inductor and effector sites of distal small intestine from BALB/c mice. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2016;64:57-63. <https://doi.org/10.1007/s00005-015-0358-6>
30. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol.* 2013; 79:5112-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>
31. Quast C, Priesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:D590-6. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
32. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *Peer J.* 2016;4:e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
33. Flynn JM, Brown EA, Chain FJ, MacIsaac HJ, Cristescu ME. Toward accurate molecular identification of species in complex environmental samples: Testing the performance of sequence filtering and clustering methods. *Ecol Evol.* 2015;5:2252-66. <https://doi.org/10.1002/ece3.1497>

34. Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Pruesse E, Quast C, *et al.* The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:D643-8. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>
35. Aguirre-Garrido JF, Montiel-Lugo D, Hernández-Rodríguez C, Torres-Cortes G, Millan V, Toro N. Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central México. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2012;101:891-904. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9705-3>
36. Gearhardt AN, Grilo CM, DiLeone RJ, Brownell KD, Potenza MN. Can food be addictive? Public health and policy implications. *Addiction.* 2011;106:1208-12. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2010.03301.x>
37. de Jesús Díaz-Reséndiz FJ, Franco-Paredes K, Martínez-Moreno AG, López-Espinoza A, Aguilera-Cervantes VG. Efectos de variables ambientales sobre la ingesta de alimento en ratas: una revisión histórico-conceptual. *Univ Psychol.* 2009;8:519-32.
38. Glendinning JI, Hart S, Lee H, Maleh J, Ortiz G, Ryu YS, *et al.* Low-calorie sweeteners cause only limited metabolic effects in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2020;318:R70-R80. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00245.2019>
39. Imberti S, McLain SE, Rhys NH, Bruni F, Ricci MA. Role of water in sucrose, lactose, and sucralose taste: The sweeter, the wetter? *ACS Omega.* 2019;4:22392-8. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02794>
40. Avena NM, Rada P, Hoebel BG. Evidence for sugar addiction: Behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008;32:20-39. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.04.019>
41. Mohammed-Jawad RA, Hutchinson CV, Prados J. Dissociation of place preference and tolerance responses to sucrose using a dopamine antagonist in the planarian. *Psychopharmacology (Berl).* 2018;235:829-36. <https://doi.org/10.1007/s00213-017-4801-8>
42. Ahmad SY, Friel JK, Mackay DS. Effect of sucralose and aspartame on glucose metabolism and gut hormones. *Nutr Rev.* 2020;78:725-46. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuz099>
43. Stamatakis NS, Scott C, Elliott R, McKie S, Bosscher D, McLaughlin JT. Stevia beverage consumption prior to lunch reduces appetite and total energy intake without affecting glycemia or attentional bias to food cues: A double-blind randomized controlled trial in healthy adults. *J Nutr.* 2020;150:1126-34. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa038>
44. Figlewicz DP, Ioannou G, Bennett Jay J, Kittleson S, Savard C, Roth CL. Effect of moderate intake of sweeteners on metabolic health in the rat [published correction appears in *Physiol Behav.* 2010 Apr 19; 99:691]. *Physiol Behav.* 2009;98:618-24. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.09.016>
45. Dhingra R, Sullivan L, Jacques PF, Wang TJ, Fox CS, Meigs JB, *et al.* Soft drink consumption and risk of developing cardiometabolic risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community (Published correction appears in *Circulation.* 2007;116:e557). *Circulation.* 2007;116:480-8. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.689935>
46. Nishikawa S, Yasoshima A, Doi K, Nakayama H, Uetsuka K. Involvement of sex, strain and age factors in high fat diet-induced obesity in C57BL/6J and BALB/cA mice. *Exp Anim.* 2007;56:263-72. <https://doi.org/10.1538/expanim.56.263>
47. South T, Huang X. Phenotypic variations between a fat-preferring strain and a macronutrient non-preferring strain of mouse. *Diabetes Obes Metab.* 2006;8:302-10. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2005.00506.x>
48. Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann S, Moore MC, Renner S, Woods SC, *et al.* Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14:140-62. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.161>
49. Rogers PJ, Ferriday D, Irani B, Hei Hoi JK, England CY, Bajwa KK, *et al.* Sweet satiation: Acute effects of consumption of sweet drinks on appetite for and intake of sweet and non-sweet foods. *Appetite.* 2020;149:104631. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2020.104631>
50. Mitsutomi K, Masaki T, Shimasaki T, Gotoh K, Chiba S, Kakuma T, *et al.* Effects of a non-nutritive sweetener on body adiposity and energy metabolism in mice with diet-induced obesity. *Metabolism.* 2014; 63:69-78. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.09.002>
51. Dalenberg JR, Patel BP, Denis R, Veldhuizen MG, Nakamura Y, Vinke PC, *et al.* Short-term consumption of sucralose with, but not without, carbohydrate impairs neural and metabolic sensitivity to sugar in humans. *Cell Metab.* 2020;31:493-502.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.01.014>

52. Grotz VL, Pi-Sunyer X, Porte D Jr, Roberts A, Trout JR. A 12-week randomized clinical trial investigating the potential for sucralose to affect glucose homeostasis. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2017;88:22-33. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.05.011>
53. Icaza-Chávez ME. Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Rev Gastroenterol México*. 2013;78:240-8. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2013.04.004>
54. El Aidy S, van den Bogert B, Kleerebezem M. The small intestine microbiota, nutritional modulation and relevance for health. *Curr Opin Biotechnol*. 2015;32:14-20. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.09.005>
55. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*. 2010;90:859-904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>
56. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015; 21:8787-803. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>
57. Ermund A, Schütte A, Johansson ME, Gustafsson JK, Hansson GC. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. I. Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer's patches. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013;305:G341-7. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00046.2013>
58. de Vos WM, de Vos EA. Role of the intestinal microbiome in health and disease: From correlation to causation. *Nutr Rev*. 2012;70:S45-S56. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00505.x>
59. Konkel JE, Chen W. Balancing acts: The role of TGF- β in the mucosal immune system. *Trends Mol Med*. 2011;17:668-76. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.07.002>
60. Nettleton JE, Reimer RA, Shearer J. Reshaping the gut microbiota: Impact of low calorie sweeteners and the link to insulin resistance? *Physiol Behav*. 2016;164:488-93. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.04.029>
61. Gerasimidis K, Bryden K, Chen X, Papachristou E, Verney A, Roig M, *et al*. The impact of food additives, artificial sweeteners and domestic hygiene products on the human gut microbiome and its fibre fermentation capacity. *Eur J Nutr*. 2020;59:3213-30. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-02161-8>
62. Sonnenburg ED, Smits SA, Tikhonov M, Higginbottom SK, Wingreen NS, Sonnenburg JL. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature*. 2016;529:212-15. <https://doi.org/10.1038/nature16504>
63. Di Rienzi SC, Britton RA. Adaptation of the gut microbiota to modern dietary sugars and sweeteners. *Adv Nutr*. 2020;11:616-29. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz118>
64. Zoetendal EG, Raes J, van den Bogert B, Arumugam M, Booijink CC, Troost FJ, *et al*. The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. *ISME J*. 2012;6:1415-26. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.212>
65. Bornemann V, Werness SC, Buslinger L, Schiffman SS. Intestinal metabolism and bioaccumulation of sucralose in adipose tissue in the rat. *J Toxicol Environ Health A*. 2018;81:913-23. <https://doi.org/10.1080/15287394.2018.1502560>
66. Schiffman SS, Rother KI. Sucralose, a synthetic organochlorine sweetener: Overview of biological issues. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2013;16:399-451. <https://doi.org/10.1080/10937404.2013.842523>
67. Shukla N, Pomarico E, Hecht CJ, Taylor EA, Chergui M, Othon CM. Hydrophobic interactions of sucralose with protein structures. *Arch Biochem Biophys*. 2018;639:38-43. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.12.013>
68. Qin X. What caused the recent worldwide increase of inflammatory bowel disease: Should sucralose be added as a suspect? *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:E139. <https://doi.org/10.1002/ibd.21823>
69. Palmnäs MS, Cowan TE, Bomhof MR, Su J, Reimer RA, Vogel HJ, *et al*. Low-dose aspartame consumption differentially affects gut microbiota-host metabolic interactions in the diet-induced obese rat. *PLoS ONE*. 2014; 9:e109841. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109841>
70. Abou-Donia MB, El-Masry EM, Abdel-Rahman AA, McLendon RE, Schiffman SS. Splenda alters gut microflora and increases intestinal p-glycoprotein and cytochrome p-450 in male rats. *J Toxicol Environ Health A*. 2008;71:1415-29. <https://doi.org/10.1080/15287390802328630>

71. Brusick D, Grotz VL, Slesinski R, Kruger CL, Hayes AW. The absence of genotoxicity of sucralose. *Food Chem Toxicol.* 2010;48:3067-72. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.047>
72. Schiffman SS, Abou-Donia MB. Sucralose revisited: Rebuttal of two papers about Splenda safety. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2012;63:505-13. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.05.002>
73. Ruiz-Ruiz JC, Moguel-Ordóñez YB, Segura-Campos MR. Biological activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni and their relationship to health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;57:2680-90. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1072083>
74. Sanches Lopes SM, Francisco MG, Higashi B, Ribeiro de Almeida RT, Krausová G, Pilau EJ, *et al.* Chemical characterization and prebiotic activity of fructo-oligosaccharides from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) roots and in vitro adventitious root cultures. *Carbohydr Polym.* 2016;152:718-25. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.043>
75. Gardana C, Simonetti P, Canzi E, Zanchi R, Pietta P. Metabolism of stevioside and rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* extracts by human microflora. *J Agric Food Chem.* 2003;51:6618-22. <https://doi.org/10.1021/jf0303619>
76. López-Díaz S, Barajas-González JA. Co-inoculation of *Glomus* sp and *Methylobacterium* sp to accelerate seed germination, plant growth promotion and induction of systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum* var verome) / Co-inoculación de *Glomus* sp. *Mexican Journal of Biotechnology.* 2016;1:96-106.
77. Murphy EF, Cotter PD, Healy S, Marques TM, O'Sullivan O, Fouhy F, *et al.* Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: Relationship to diet, obesity and time in mouse models. *Gut.* 2010;59:1635-42. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.215665>
78. Mirpuri J, Raetz M, Sturge CR, Wilhelm CL, Benson A, Savani RC, *et al.* Proteobacteria-specific IgA regulates maturation of the intestinal microbiota. *Gut Microbes.* 2014;5:28-39. <https://doi.org/10.4161/gmic.26489>
79. Shin NR, Whon TW, Bae JW. *Proteobacteria*: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* 2015;33:496-503. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>
80. Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaïs CA, Maza O, *et al.* Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature.* 2014;514:181-6. <https://doi.org/10.1038/nature13793>
81. Zhang X, Shen D, Fang Z, Jie Z, Qiu X, Zhang C, *et al.* Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS ONE.* 2013;8:e71108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071108>

Artículo original

Subtipos del carcinoma luminal de mama según el consenso de Saint Gallen en un grupo de pacientes venezolanas

Ángel Fernández-Tortolero^{1,2}, Aldo Reigosa-Yániz¹

¹ Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela

² Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela

Introducción. El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente en las mujeres de todo el mundo. Los distintos subtipos intrínsecos tienen pronósticos diferentes y su prevalencia varía significativamente según los criterios establecidos en el Consenso de Saint Gallen.

Objetivo. Clasificar los subtipos luminales del carcinoma de mama en una población de pacientes venezolanas según los consensos de Saint Gallen del 2009, 2011, 2013 y 2015.

Materiales y métodos. Se hizo un estudio retrospectivo en 209 pacientes con carcinoma ductal infiltrante de mama, atendidas en el Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño” de Valencia, Venezuela.

Resultados. La distribución de los subtipos luminal A y B cambió después de reclasificar los casos según los consensos de 2011, 2013 y 2015; el subtipo luminal B fue el más común en la serie de estudio.

Conclusiones. Mediante la clasificación basada en los últimos criterios de Saint Gallen, se determinó un número mayor de tumores luminales B, lo que ayudaría a seleccionar a aquellas pacientes que no requieran la quimioterapia adyuvante y a quienes puedan beneficiarse de la terapia hormonal adyuvante en la práctica clínica.

Palabras clave: adenocarcinoma; neoplasias de la mama; Venezuela.

Subtypes of luminal breast carcinoma according to the Saint Gallen Consensus in a group of Venezuelan patients

Introduction: Breast cancer is the most frequent malignancy in women worldwide. Different intrinsic subtypes have different prognoses and their prevalence varies significantly according to the criteria established in the Saint Gallen Consensus.

Objective: To classify the luminal subtypes of breast carcinoma according to Saint Gallen 2009, 2011, 2013, and 2015 consensuses in a group of Venezuelan patients.

Materials and methods: We conducted a retrospective study in 209 patients with infiltrating ductal carcinoma of the breast followed up at the Institute of Oncology “Dr. Miguel Pérez Carreño” in Valencia, Venezuela.

Results: The distribution of the luminal A and B subtypes changed after the reclassification of the cases according to 2011, 2013, and 2015 Saint Gallen Consensuses. The luminal B subtype was the most common in the study series.

Conclusions: With the use of a classification based on the latest Saint Gallen criteria we identified more luminal B tumors. This could contribute to selecting those patients who can avoid adjuvant chemotherapy and/or benefit from the adjuvant hormonal therapy in clinical practice.

Keywords: Adenocarcinoma; breast neoplasms; Venezuela.

El carcinoma de mama es el cáncer más común en las mujeres a nivel mundial. En la práctica clínica se usa ampliamente la clasificación de los subtipos intrínsecos del carcinoma de mama determinados mediante inmunohistoquímica. Los tumores de mama poseedores de receptores de estrógeno (RE) o de progesterona (RP) se clasifican como luminal A o luminal B, y con expresión del receptor HER2 o sin ella. El subtipo luminal A se caracteriza por expresar gran cantidad de receptores de estrógeno y tener un pronóstico favorable, mejor que el del subtipo luminal B (1).

Los carcinomas luminales representan alrededor de dos tercios de todos los carcinomas de mama a nivel mundial. Este tipo de cáncer es muy heterogéneo e incluye perfiles de expresión génica y patrones de mutación

Recibido: 06/04/2020
Aceptado: 05/05/2021
Publicado: 11/05/2021

Citación:

Fernández-Tortolero Ángel, Reigosa-Yániz A.
Subtipos del carcinoma luminal de mama según el consenso de Saint Gallen en un grupo de pacientes venezolanas. Biomédica. 2021;41:531-40.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.5496>

Correspondencia:

Ángel Fernández-Tortolero, Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela
Telephone: (+58) (0241) 866 6243
angelbiouc@gmail.com

Contribución de los autores:

Ambos autores participaron en la concepción y el diseño del estudio; la obtención e interpretación de los datos, y la escritura del manuscrito.

Financiación:

El estudio fue financiado por los autores.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses.

cuyo curso clínico y respuestas al tratamiento sistémico son muy variadas. En la actualidad, se han propuesto varias terapias individualizadas según las características biológicas de cada subtipo luminal. Por lo tanto, la diferenciación de los tumores luminales conlleva importantes implicaciones terapéuticas (2).

La caracterización fenotípica de estos tumores se basa en los criterios del consenso de Saint Gallen, a partir del análisis de la expresión de RE, RP y HER2, y la medición del índice de proliferación (Ki-67), un marcador nuclear de la proliferación celular que se expresa en todas las fases del ciclo celular, excepto en la G0 (3). En el consenso de Saint Gallen del 2009, se enfatizó sobre la importancia de los marcadores de proliferación y se sugirieron para guiar la elección de la quimioterapia adyuvante en el tratamiento de pacientes con receptores hormonales positivos. Sin embargo, hay muchas limitaciones asociadas con la interpretación del marcador y las diferencias en los valores de corte, así como en los métodos de interpretación, la variabilidad entre observadores y la heterogeneidad de la expresión de Ki-67 (4,5).

Los resultados variables de la interpretación inmunohistoquímica de Ki-67 pueden deberse, principalmente, a la falta de consenso en torno a la metodología. Por esta razón, en el consenso de Saint Gallen del 2011 se sugirieron diferentes pautas para la diferenciación inmunohistoquímica de los carcinomas luminales A y B. El punto de corte de Ki-67 por debajo del 14 % fue el que mejor se correlacionó con la determinación de la expresión génica del subtipo luminal A. Por otra parte, se consideró un índice Ki-67 de 14 % o más para caracterizar el subtipo luminal B negativo para HER2 (5).

En el consenso de Saint Gallen del 2013, el panel de expertos recomendó que la distinción entre los tumores de subtipo luminal A y B podría mejorarse con la inclusión de una expresión del $RP \geq 20\%$ como criterio para definir el subtipo luminal A. Asimismo, se eliminó el valor de umbral para el “Ki-67 alto” en la definición del subtipo luminal B. Se propuso un Ki-67 de 14 % o más para distinguir entre los tumores luminal B y los A, pero al considerar los estudios génicos, la mayoría del panel votó por un punto de corte de $\geq 20\%$, aunque no lo recomendó explícitamente (6). En el último consenso de Saint Gallen, en el 2015, la mayoría del panel aceptó un umbral con un rango de 20 a 29 % para distinguir entre los subtipos luminal A y B (3).

Considerando que los carcinomas luminales de mama conforman al menos la mitad de todos los nuevos diagnósticos, determinar si un tumor es luminal A o B y cuál es la mejor forma de abordar el tratamiento, resulta clínicamente importante (7). Cabe destacar que el subtipo luminal A presenta una alta tasa de mejoría con el tratamiento hormonal y, en general, no se beneficia del uso de agentes quimioterapéuticos. Por otra parte, el tratamiento hormonal es menos efectivo en el subtipo luminal B, aunque estos tumores sí mejoran con la quimioterapia convencional y con aquella contra la HER2 (2,4).

En este contexto, en el presente estudio se analizó una serie de mujeres venezolanas con carcinoma de mama y se clasificaron los casos de acuerdo con las definiciones de los subtipos intrínsecos propuestas en los consensos internacionales de cáncer de mama de Saint Gallen, con el propósito de contribuir a identificar aquellas pacientes que podrían evitarse la quimioterapia adyuvante o beneficiarse de la terapia hormonal adyuvante, en la práctica clínica.

Materiales y métodos

El estudio se llevó a cabo en mujeres atendidas en el Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño” (IOMPC) de Valencia, Venezuela entre el 2014 y el 2016. Con la aprobación del Comité de Ética y de la Comisión de Investigación del IOMPC, se conformó una serie no aleatoria, de tipo intencional, de 209 pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama con fenotipo luminal. Los tumores se clasificaron según los criterios de los consensos de Saint Gallen de 2009, 2011, 2013 y 2015 (cuadro 1).

Los datos de interés para la investigación se tomaron de las historias clínicas, establecidas por el Servicio de Patología Mamaria del IOMPC. Para la supervivencia global en meses, se consideró como punto de corte un seguimiento de hasta 60 meses (5 años) y un mínimo de 36; la supervivencia se evaluó estableciendo el tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta la fecha de la muerte en caso de haber ocurrido antes de los 60 meses. En cuanto a los estudios de supervivencia y su relación con las variables clínico-patológicas y los marcadores inmunohistoquímicos, se tuvo en cuenta la definición de tumores luminales establecida en el consenso de Saint Gallen del 2009.

Construcción de la matriz de tejidos

Las muestras tisulares se fijaron en formol y se incluyeron en parafina, siguiendo los métodos convencionales. De los bloques de parafina se obtuvieron secciones histológicas de 4 µm de espesor que, posteriormente, se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se revisaron las preparaciones histológicas y se seleccionaron cuidadosamente las zonas con tumor, marcándolas en el bloque de parafina para construir las matrices de tejido según lo descrito en la literatura (8,9).

Inmunohistoquímica

La ‘desparafinación’ de los cortes histológicos, su incubación con el anticuerpo primario (cuadro 2) y el posterior procesamiento de las muestras, se hicieron de acuerdo con lo establecido en investigaciones previas (8,9). Cada anticuerpo fue comparado con los controles adecuados, positivo o negativo, según lo establecido por la marca comercial. Para los receptores hormonales se consideró positivo cualquier tipo de inmunoexpresión, y se refirió el resultado como positivo o negativo para efectos del análisis estadístico. La expresión de la HER2 se evaluó según el patrón establecido en el estuche comercial Herceptest™.

Cuadro 1. Definición del subtipo luminal por inmunohistoquímica según los consensos de Saint Gallen

Consenso de Saint Gallen	Luminal A	Luminal B
2009	RE (+), RP (+) y HER2 (–)	RE (+), RP (+) y HER2 (+)
2011	RE (+), RP (+), HER2 (–) y Ki-67 (<14 %)	RE (+), RP (+), HER2 (+) y cualquier Ki-67 RE (+), RP (+), HER2 (–) y Ki-67 (≥14 %)
2013	RE (≥1 %), RP (≥20 %), HER2 (–) y Ki-67 (<14 %)	RE (≥1 %), HER2 (+) y cualquier RP y Ki-67 RE (≥1 %), HER2 (–) y Ki-67 (≥14 %) o RP (<20 %)
2015	RE (≥1 %), RP (≥20 %), HER2 (–) y Ki-67 (<20 %)	RE (≥1 %), HER2 (+) y cualquier RP y Ki-67 RE (≥1 %), HER2 (–) y Ki-67 (≥20 %) o RP (<20 %)

RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona; HER2: receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2

Para la cuantificación del Ki-67, se tomaron cuatro microfotografías de cada caso, dos de cada cilindro, en un microscopio Zeiss Axiostar plus con cámara Canon incorporada y conectada al ordenador con el programa Axiovision. Luego se contaron los núcleos positivos y negativos en cada imagen, utilizando el programa Bionce, diseñado por el ingeniero Víctor Barrios de la Universidad de Carabobo. Se sumaron las cifras de los cuatro conteos y se obtuvo el índice de proliferación como promedio del porcentaje de positividad en cada caso.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico SPSS™, versión 22. La asociación entre las variables se analizó con la prueba de ji al cuadrado y el test exacto de Fisher. El estudio de supervivencia se hizo mediante el método de Kaplan-Meier y se probó utilizando la prueba de *log-rank*. En los análisis multivariantes, se empleó el modelo de riesgo proporcional de Cox. Se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

Resultados

La edad media de las pacientes en el momento del diagnóstico era de 51,6 años. El estadio clínico más frecuente fue el III e, histológicamente, la mayoría de los tumores fue moderadamente diferenciada. La mayoría de las pacientes continuaba con vida al final del seguimiento. Los principales datos clínico-patológicos de las pacientes incluidas en este estudio se detallan en el cuadro 3.

Cuadro 2. Dilución, clon y fuente de anticuerpos utilizados

Marcador	Dilución	Clon	Marca comercial	Localización del marcaje
RE	1/50	GF 11	Novocastra	Nuclear
RP	1/100	636	Dako	Nuclear
HER2	Prediluido	Herceptest	Dako	Membrana
Ki-67	1/100	MIB-1	Dako	Nuclear

RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona; HER2: receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2

Cuadro 3. Características clínico-patológicas de la serie

Variable	n	(%)
Edad (años): media (rango)	---	51,6 (27-85)
Número total de casos	---	209 (100)
Edad en años	<50	84 (40,2)
	≥50	125 (59,8)
Estadio clínico	I	6 (2,9)
	II	84 (40,2)
	III	110 (52,6)
	IV	9 (4,3)
Grado histológico	I	49 (23,4)
	II	121 (57,9)
	III	39 (18,7)
RP	<20 %	57 (27,3)
	≥20 %	152 (72,7)
HER2	Negativo	182 (87,1)
	Positivo	27 (12,9)
Ki-67	<14 %	74 (35,4)
	14-19 %	37 (17,7)
	≥20 %	98 (46,9)
Supervivencia global (meses)	---	50,1
Estado	Viva	109 (52,2)
	Fallecida	100 (47,8)

RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona; HER2: receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2

Cuadro 4. Distribución del subtipo luminal según lo establecido en los consensos de Saint Gallen

Consenso de Saint Gallen	Subtipo molecular	
	Luminal A n (%)	Luminal B n (%)
2009	152 (72,7)	57 (27,3)
2011	61 (29,2)	148 (70,8)
2013	56 (26,8)	153 (73,2)
2015	78 (37,3)	131 (62,7)

Cuadro 5. Cambios en la supervivencia global de pacientes con tumores luminales según lo establecido en los consensos de Saint Gallen

Consenso Saint Gallen	Supervivencia global (media de meses $\pm$ DE)		p
	Luminal A	Luminal B	
2009	51,0 $\pm$ 1,9	49,7 $\pm$ 1,1	0,227
2011	57,9 $\pm$ 0,9	46,9 $\pm$ 1,2	<0,001
2013	58,1 $\pm$ 0,9	47,1 $\pm$ 1,2	<0,001
2015	57,1 $\pm$ 0,9	45,9 $\pm$ 1,3	<0,001

DE: desviación estándar

Cuadro 6. Supervivencia global de pacientes con tumores luminales según lo establecido en el consenso de Saint Gallen del 2009 y en relación con los marcadores inmunohistoquímicos

Marcador		Supervivencia global (media de meses $\pm$ DE)			
		Luminal A	p	Luminal B	p
Ki-67	<20	56,6 $\pm$ 1,1	<0,001	54,7 $\pm$ 1,6	0,019
	$\geq$ 20	44,0 $\pm$ 1,7		40,8 $\pm$ 3,2	
RP	<20	48,9 $\pm$ 3,8	0,780	48,0 $\pm$ 2,5	0,735
	$\geq$ 20	51,5 $\pm$ 1,1		45,3 $\pm$ 3,8	
HER2	Negativo	---	---	50,1 $\pm$ 2,6	0,015
	Positivo	---		42,8 $\pm$ 3,3	

RP: receptor de progesterona; DE: desviación estándar; HER2: receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2

Las distribuciones de los subtipos luminal A y B cambiaron según lo establecido en los consensos de Saint Gallen. Con base en los criterios del 2009, los tumores luminales A fueron los más comunes. Sin embargo, después de la reclasificación de los casos según los consensos del 2011, 2013 y 2015, la proporción de los tumores del subtipo luminal A disminuyó drásticamente, en tanto que la de los de subtipo luminal B tuvo un aumento significativo (cuadro 4). A pesar de ello, en el estudio de supervivencia se evidenció que el subtipo luminal A se relacionó con una mayor supervivencia global que el luminal B, independientemente del criterio de clasificación, pero con significación estadística según lo establecido en los consensos de Saint Gallen del 2011, 2013 y 2015 (cuadro 5).

Para verificar si las modificaciones individuales habían mejorado la clasificación inicial de los tumores, en los siguientes análisis se tuvieron en cuenta los criterios de clasificación del subtipo luminal del consenso de Saint Gallen del 2009. Se evaluó la categorización de las pacientes en función de la supervivencia global con los valores de Ki-67 (<20 % Vs. $\geq$ 20 %) y receptores de progesterona (<20 % Vs. $\geq$ 20 %) en los tumores luminales A y, además, el estado de la HER2 en los casos del subtipo luminal B. Solo el Ki-67 (luminales A y B) y la HER2 (luminal B) tuvieron significación estadística en la subclasificación de los tumores (cuadro 6), con un valor independiente del resto de las variables clínico-patológicas valoradas (cuadro 7).

Por último, en la figura 1 se muestra la relación entre la supervivencia global y los tumores del subtipo luminal A, según el porcentaje de expresión del Ki-67 con el punto de corte en 20 %. Por su parte, en la figura 2 se

evidencia la relación estadísticamente significativa entre la supervivencia global y los tumores del subtipo luminal B (negativos o positivos para HER2), según si el porcentaje de expresión de Ki-67 es menor o mayor del 20 %, pero sin significación estadística (figura 3).

Cuadro 7. Análisis multivariante de la supervivencia global de pacientes con tumores luminales establecido en el consenso de Saint Gallen del 2009, y variables clínico-patológicas y moléculas estudiadas

Variable	Supervivencia global (media de meses $\pm$ DE)			p
	Luminal A CR (IC al 95 %)	p	Luminal B CR (IC al 95 %)	
Ki-67 20 %	4,487 (2,619-7,687)	<0,001	3,172 (1,445-6,964)	0,004
RP 20 %	1,221 (0,572-2,606)	0,605	0,975 (0,0446-2,133)	0,950
HER2	---	---	2,428 (1,136-5,188)	0,022
Edad	0,842 (0,520-1,364)	0,485	0,909 (0,436-1,895)	0,799
GH	1,263 (0,828-1,927)	0,279	2,246 (1,192-4,232)	0,012
EC	1,951 (1,196-3,183)	0,007	4,537 (1,962-10,492)	<0,001

CR: cociente de riesgo; IC: intervalo de confianza; RP: receptor de progesterona; HER2: receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2; DE: desviación estándar; GH: grado histológico; EC: estadio clínico

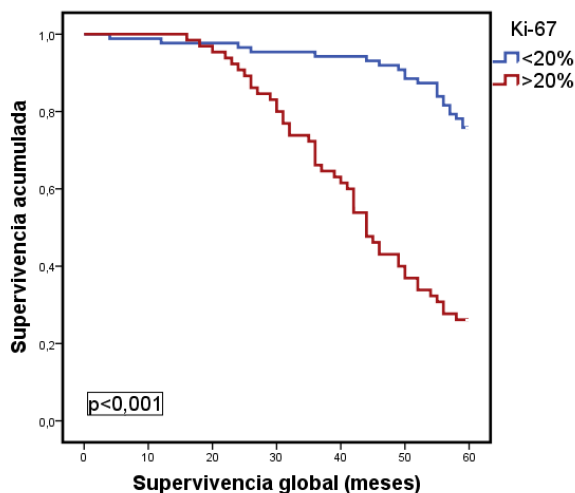


Figura 1. Relación entre la supervivencia global y la de pacientes con el subtipo luminal A, según el consenso de Saint Gallen del 2009 y el porcentaje de expresión de Ki-67 con el punto de corte en 20 %

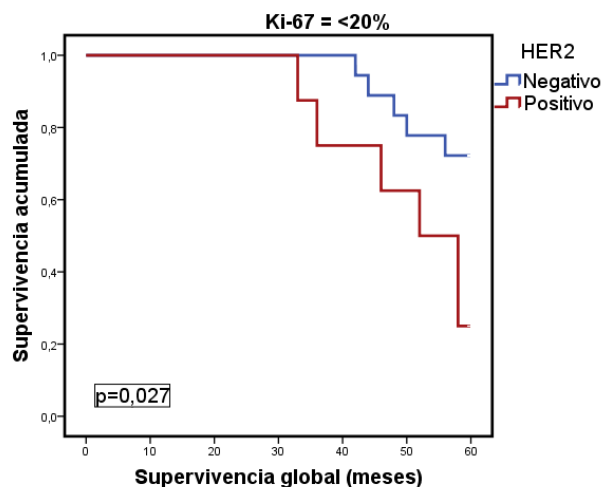


Figura 2. Relación entre la supervivencia global y la de pacientes con el subtipo luminal B, según el consenso de Saint Gallen del 2009, el estado de HER2 y un porcentaje de expresión de Ki-67 de <20%

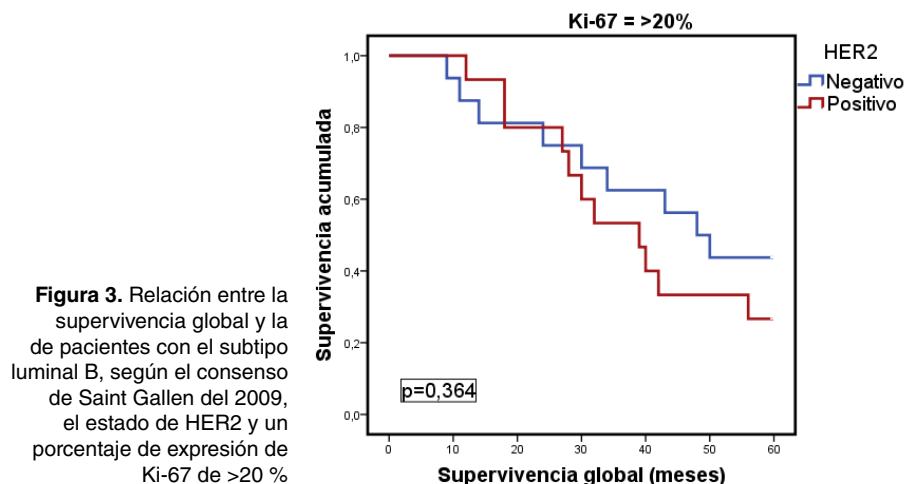


Figura 3. Relación entre la supervivencia global y la de pacientes con el subtipo luminal B, según el consenso de Saint Gallen del 2009, el estado de HER2 y un porcentaje de expresión de Ki-67 de >20 %

Discusión

En el presente estudio, se observó que el fenotipo molecular predominante fue el luminal A frente al luminal B, según los criterios previos al consenso de Saint Gallen del 2011. Este predominio ha sido reportado ampliamente en la literatura médica, aunque con discrepancias en los porcentajes que representan cada subtipo molecular; posiblemente, esto se deba al método de clasificación utilizado, pues en varios de los estudios solo se consideraron como luminal B los casos que coexpresaban receptores hormonales y la HER2, o, también, al tipo de población incluida en dichos estudios (9,10). En este sentido, en un estudio se evidenció que los hispanos y latinos tenían una prevalencia relativamente baja de tumores del subtipo luminal A comparados con los afroamericanos, y un aumento de las tasas de los tumores del subtipo luminal B y positivos para HER2 (11).

En consonancia con lo expuesto y después de la reclasificación de los tumores de este estudio, el subtipo luminal B fue el más común según los criterios de los consensos de Saint Gallen del 2011, 2013 y 2015. En dos estudios recientes se encontró una mayor prevalencia del subtipo luminal B en mujeres europeas (57,1 %) y chinas (68,5 %), al clasificar el cáncer de mama siguiendo las recomendaciones de Saint Gallen del 2013 (6,12). En otros estudios en Italia, se registraron hallazgos similares (34 % de luminal A y 36 % de luminal B), así como en Arabia Saudita (3,9 % de luminal A y 16 % de luminal B) (13,14). En Latinoamérica, Gómez, *et al.* (15) reportaron en su estudio que el luminal B representaba más del 50 % de los subtipos intrínsecos y Serrano-Gómez, *et al.* (16) informaron una frecuencia de 26,2 % para el luminal A y de 37,2 % para el luminal B.

Asimismo, los estudios de supervivencia revelan que la clasificación basada en los consensos de Saint Gallen se relaciona con la biología del tumor, pues ambos subtipos moleculares mostraron patrones de supervivencia similares a los descritos en los estudios pioneros de Perou y Sorlie (17-19), validados por la gran mayoría de las publicaciones posteriores. En este estudio, el subtipo molecular luminal A presentó un mejor pronóstico frente al luminal B, con una diferencia estadísticamente significativa según lo establecido en las reuniones de expertos del 2011 al 2015 y en consonancia con otros estudios previos (15,16).

Es importante destacar que la aplicación de los criterios de Saint Gallen del 2013 en este estudio, y en otros, resultó en una mayor frecuencia de tumores del subtipo luminal B después de emplear un valor de corte para el índice de proliferación Ki-67 de ≥ 14 % y una expresión de RP de < 20 % en el subtipo luminal B negativo para HER2. En la serie se encontraron dos grandes factores de discriminación del valor de pronóstico de la evolución. El índice de proliferación ya se ha reportado como un importante factor de pronóstico (20,21), tanto así que, en estudios previos, ya se había sugerido que aquellos casos con un índice mayor a 14 % debían clasificarse como luminal B en lugar de luminal A (21,22). Se observaron diferencias significativas en la evolución, tanto con un punto de corte de 14 % como con uno de 20 %. En relación con el luminal A, se establecieron dos subgrupos con significado pronóstico independiente: el grupo con expresión únicamente de RE y RP y Ki-67 < 20 % presentaba un mejor pronóstico, y los grupos de luminal A con Ki-67 ≥ 20 %, un peor pronóstico.

Por su parte, en el subtipo luminal B, la expresión del Ki-67 también demostró tener un valor pronóstico independiente con el punto de corte en

20 %, similar a lo reportado en otro estudio (23). Los diferentes subtipos de esta clase, establecidos según la expresión de HER2, también mostraron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia a los cinco años, resultados similares a los de otros autores que han reportado un peor pronóstico para los casos con expresión de HER2, aunque independientemente del estado del Ki-67 (22,24-26).

Asimismo, en la reunión del consenso de Saint Gallen del 2013, se agregó la expresión de PR con el punto de corte en 20 % para distinguir entre los tumores de subtipo luminal A y luminal B negativos para HER2. A este respecto, en otro estudio se encontró que la expresión de receptores de progesterona era significativamente mayor en el subtipo luminal A y que la presencia de más del 20 % de células tumorales poseedoras de estos receptores tenía un valor estadísticamente significativo para predecir diferencias en la supervivencia de los pacientes con este subgrupo de tumores (27). En los carcinomas de subtipo luminal B, autores como Konecny, *et al.* (28), y Kim, *et al.* (29), han informado hallazgos similares, los cuales difieren de lo encontrado en el presente estudio, en el que la expresión de receptores de progesterona con el punto de corte en 20 % no registró diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia de las mujeres incluidas en la serie.

En resumen, los hallazgos del estudio indican que el uso de una clasificación basada en los criterios de Saint Gallen del 2013, y no exclusivamente en los marcadores RE, RP y HER2, de pacientes venezolanas, permitió clasificar más tumores del subtipo luminal B, los cuales están asociados con un mal pronóstico, lo que permitiría que se beneficiaran de un tratamiento más agresivo para reducir la probabilidad de recurrencias. Si la gran prevalencia de tumores del subtipo luminal B es una característica intrínseca de nuestra población, el desarrollo de esquemas quimioterapéuticos específicos para estas pacientes mejoraría su supervivencia.

Estos hallazgos deben interpretarse en el contexto de las limitaciones del estudio, entre ellas, el hecho de que las pacientes eran tratadas en un solo centro de salud (IOMPC) en Venezuela, así como el tamaño de la muestra considerada para los análisis de supervivencia global.

Agradecimientos

A todo el personal del Servicio de Anatomía Patológica del Instituto de Oncología “Dr. Miguel Pérez Carreño” de Valencia, Venezuela.

Referencias

1. Ono M, Tsuda H, Yoshida M, Shimizu C, Kinoshita T, Tamura K. Prognostic significance of progesterone receptor expression in estrogen-receptor positive, HER2-negative, node-negative invasive breast cancer with a low Ki-67 labeling index. *Clin Breast Cancer*. 2017;17:41-7. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2016.06.012>
2. Ignatiadis M, Sotiriou C. Luminal breast cancer: From biology to treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10:494-506. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.124>
3. Focke CM, van Diest PJ, Decker T. St Gallen 2015 subtyping of luminal breast cancers: Impact of different Ki67-based proliferation assessment methods. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;159:257-63. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3950-5>
4. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ, *et al.* Thresholds for therapies: Highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol*. 2009;20:1319-29. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp322>

5. Ahn HJ, Jung SJ, Kim TH, Oh MK, Yoon HK. Differences in clinical outcomes between luminal A and B type breast cancers according to the St. Gallen Consensus 2013. *J Breast Cancer*. 2015;18:149-59. <https://doi.org/10.4048/jbc.2015.18.2.149>
6. Maisonneuve P, Disalvatore D, Rotmensz N, Curigliano G, Colleoni M, Dellapasqua S, *et al*. Proposed new clinicopathological surrogate definitions of luminal A and luminal B (HER2-negative) intrinsic breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res*. 2014;16:R65. <https://doi.org/10.1186/bcr3679>
7. Gao JJ, Swain SM. Luminal A breast cancer and molecular assays: A review. *Oncologist*. 2018;23:556-65. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0535>
8. Fernández Á, Reigosa A, Caleiras E, Saldivia F, Hardisson D, Sanz F. Cadherins E and P expression in the molecular types of breast cancer. *Invest Clin*. 2015;56:155-68.
9. Reigosa A, Hardisson D, Sanz F, Caleiras E, Saldivia F, Fernández A. Subclassification of the molecular types of breast cancer based on the expression of immunohistochemical markers and evolution. *Invest Clin*. 2016;57:187-216.
10. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, *et al*. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: A collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med*. 2010;7:e1000279. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000279>
11. Sweeney C, Bernard PS, Factor RE, Kwan ML, Habel LA, Quesenberry CP Jr, *et al*. Intrinsic subtypes from PAM50 gene expression assay in a population-based breast cancer cohort: Differences by age, race, and tumor characteristics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23:714-24. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-1023>
12. Li AQ, Zhou SL, Li M, Xu Y, Shui RH, Yu BH, *et al*. Clinicopathologic characteristics of oestrogen receptor-positive/progesterone receptor-negative/Her2-negative breast cancer according to a novel definition of negative progesterone receptor status: A large population-based study from China. *PloS ONE*. 2015;10:e0125067. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125067>
13. Caldarella A, Buzzoni C, Crocetti E, Bianchi S, Vezzosi V, Apicella P, *et al*. Invasive breast cancer: A significant correlation between histological types and molecular subgroups. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013;139:617-23. <https://doi.org/10.1007/s00432-012-1365-1>
14. Al Tamimi DM, Shawarby MA, Ahmed A, Hassan AK, AlOdaini AA. Protein expression profile and prevalence pattern of the molecular classes of breast cancer—a Saudi population based study. *BMC Cancer*. 2010;10:223. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-223>
15. Gomez R, Ossa CA, Montoya ME, Echeverri C, Ángel G, Ascuntar J, *et al*. Impact of immunohistochemistry-based molecular subtype on chemosensitivity and survival in Hispanic breast cancer patients following neoadjuvant chemotherapy. *Ecancermedicalscience*. 2015;9:562. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2015.562>
16. Serrano-Gómez SJ, Sanabria-Salas MC, Hernández-Suárez G, García O, Silva C, Romero A, *et al*. High prevalence of luminal B breast cancer intrinsic subtype in Colombian women. *Carcinogenesis*. 2016;37:669-76. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgw043>
17. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, *et al*. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406:747-52. <https://doi.org/10.1038/35021093>
18. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, *et al*. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:10869-74. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>
19. Sørlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, *et al*. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:8418-23. <https://doi.org/10.1073/pnas.0932692100>
20. Bhargava R, Striebel J, Beriwal S, Flickinger JC, Onisko A, Ahrendt G, *et al*. Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular classes using immunohistochemical surrogate markers. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009;2:444-55.
21. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, *et al*. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101:736-50. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp082>
22. Piccart-Gebhart MJ. New developments in hormone receptor-positive disease. *Oncologist*. 2011;16:40-50. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2011-S1-40>

23. Bustreo S, Osella-Abate S, Cassoni P, Donadio M, Airolidi M, Pedani F, *et al.* Optimal Ki67 cut-off for luminal breast cancer prognostic evaluation: A large case series study with a long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;157:363-71. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3817-9>
24. Payne SJL, Bowen RL, Jones JL, Wells CA. Predictive markers in breast cancer – the present. *Histopathology.* 2008;52:966-78. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2007.02897.x>
25. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, *et al.* Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA.* 2006;295:2492-502. <https://doi.org/10.1001/jama.295.21.2492>
26. Raica M, Jung I, Cîmpean AM, Suciuc C, Mureșan AM. From conventional pathologic diagnosis to the molecular classification of breast carcinoma: Are we ready for the change? *Rom J Morphol Embryol.* 2009;50:5-13.
27. Prat A, Cheang MC, Martín M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, *et al.* Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31:203-9. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.4134>
28. Konecny G, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, *et al.* Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:142-53. <https://doi.org/10.1093/jnci/95.2.142>
29. Kim HJ, Cui X, Hilsenbeck SG, Lee AV. Progesterone receptor loss correlates with human epidermal growth factor receptor 2 overexpression in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12:1013s-8s. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2128>

Original article

Worldwide evidence about infant stunting from a public health perspective: A systematic review

Paola Rueda-Guevara¹, Natalia Botero-Tovar¹, Kenny Margarita Trujillo², Andrea Ramírez³

¹ Salud Poblacional, Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia

² Nutrición Social, Bogotá, D.C., Colombia

³ Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia

Introduction: According to the World Health Organization (WHO) global estimates for 2017, 9.6% of children under 5 years old are stunted. Worldwide evidence shows that actions for preventing stunting and catching-up growth are relevant if addressed by all the sectors involved. Therefore, there is a need to identify 'intersectoral actions' to address the risk of stunting during pregnancy and the first 2 years of life.

Objective: To identify and describe worldwide evidence for prevention, nutritional interventions, and 'intersectoral collaboration' efforts against stunting in infants.

Materials and methods: We conducted a systematic review in 2019 (PROSPERO CRD42019134431). The search included PubMed, OVID, and Web of Science, as well as WHO and the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) official documents and expert recommendations.

Results: We selected 231 studies: 86.1% described prevention-related factors, 30.7%, nutritional interventions, and 52.8% intersectoral collaboration efforts; 36.4% of the studies were conducted in multiple regions; 61% of the studies described the importance of interventions during pregnancy, 71.9% from birth up to 6 months old, and 84.8% from 6 months up to 2 years old. The most frequent variables described were antenatal care, nutritional counseling for the mother and the newborn, and counseling on micronutrient supplementation.

Conclusions: Evidence-based understanding of actions geared towards monitoring the risk of stunting-associated factors from pregnancy up to 2 years old is critical.

Keywords: Child development, failure to thrive, malnutrition, intersectoral collaboration, health status indicators, primary prevention

Evidencia mundial sobre el retraso del crecimiento infantil desde una perspectiva de salud pública: revisión sistemática

Introducción. Según estimaciones mundiales de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el 2017, el 9,6 % de los niños menores de cinco años padecen retraso del crecimiento. La evidencia mundial ha demostrado que las acciones para prevenir el retardo del crecimiento o para tratarlo adquieren relevancia si las abordan todos los sectores involucrados. Por lo tanto, es necesario determinar las acciones intersectoriales para atender el riesgo de retraso del crecimiento durante el embarazo y los dos primeros años de vida.

Objetivo. Rastrear y describir la evidencia mundial para la prevención, las intervenciones nutricionales y los esfuerzos de colaboración intersectorial contra el retraso del crecimiento en los lactantes.

Materiales y métodos: Se hizo una revisión sistemática en el 2019 (PROSPERO CRD42019134431). La búsqueda incluyó PubMed, OVID y Web of Science, así como documentos oficiales de la OMS y la Organización para la Agricultura y la Alimentación de Naciones Unidas (FAO) y recomendaciones de expertos.

Resultados. Se seleccionó un total de 231 estudios: 86,1 % describían factores relacionados con la prevención, 30,7 %, intervenciones nutricionales, y 52,8 %, esfuerzos de colaboración intersectorial; 36,4 % de ellos se llevaron a cabo en múltiples regiones. Del total, el 61 % de los estudios se enfocaba en la importancia de las intervenciones durante el embarazo, el 71,9 % desde el nacimiento hasta los seis meses y el 84,8 % desde los seis meses hasta los dos años. Las variables descritas con mayor frecuencia fueron la atención prenatal, el asesoramiento nutricional para la madre y el recién nacido, y el asesoramiento sobre la suplementación con micronutrientes.

Conclusiones. La comprensión basada en la evidencia de las acciones orientadas a monitorear el riesgo de factores asociados al retraso del crecimiento desde el embarazo hasta los dos años, es fundamental.

Palabras clave: desarrollo infantil, insuficiencia de crecimiento, desnutrición, colaboración intersectorial, indicadores de salud, prevención primaria.

Received: 28/02/21

Accepted: 13/05/21

Published: 26/05/21

Citation:

Rueda-Guevara P, Botero-Tovar N, Trujillo KM, Ramírez A. Worldwide evidence about infant stunting from a public health perspective: A systematic review. *Biomédica*. 2021;41:541-54.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.6017>

Corresponding author:

Paola Rueda, Carrera 7b No 123 90, piso 3, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 603 0303, extensión 5730
yenny.rueda@fsfb.org.co

Author contributions:

Paola Rueda-Guevara and Natalia Botero-Tovar: writing of the original draft, reviewing and editing of subsequent drafts
Kenny Margarita-Trujillo and Andrea Ramírez-Varela: conceptualization, supervision, validation, and methodology of the study
Andrea Ramírez-Varela: writing of the original draft
All authors participated in the formal analysis

Funding:

Fundación Éxito and Fundación Santa Fe de Bogotá.

Conflicts of interest:

None

Stunting is a form of malnutrition. It is an important limitation to human development during the first crucial 1,000 days of life from pregnancy to 2 years of age. According to the World Health Organization (WHO), stunting affects around 162 million children under the age of 5 globally. Stunting in 0 to 59 month-old infants is defined as a height/length-for-age less than two standard deviations (-2 SD) below the median of reference (1,2). According to WHO global estimates for 2017, 9.6% of children under 5 are stunted (3). Furthermore, projections indicate that 127 million children in this age group around the world will be stunted by 2025. Thus, intersectoral actions are necessary to accomplish the 2025 target of a 40% global reduction in the number of stunted children under 5 (1).

Several studies have shown that stunting has negative effects on the life course of children from pregnancy to adulthood with short-term consequences such as increased susceptibility to infectious diseases like acute diarrheal disease and acute respiratory infection both of which contribute to infant mortality (4). Studies have also shown that stunting can affect learning potential preventing adequate cognitive development and limiting learning capacity (5), which in turn increases the probability of late incorporation to school, school failure, dropout, and low academic performance (6). Stunting can lead to the loss of 2 or 3 years of schooling and a subsequent income reduction of 23% in adulthood compared to children with adequate growth (7). An association with an increased risk of chronic non-communicable diseases such as diabetes, hypertension, and cardiovascular disease has also been reported (8). As for national development, stunting reduces the gross domestic product by up to 3% (9).

Based on the available evidence on highly cost-effective actions in the prevention and management of stunting, various measures have been proposed to reduce the irreversible physical and cognitive effects of the deficit in height gain in the first years of life. Bhutta, *et al.* demonstrated the potential effect of 10 specific nutritional actions on children's health that could limit growth and severe acute malnutrition. Examples of the interventions that could reduce stunting by 20.3% if scaled up to a 90% coverage include folic acid supplementation in the preconception period, maternal food supplementation, maternal calcium supplementation, maternal multiple micronutrient supplementation, and the promotion of breastfeeding, among others (10).

Worldwide evidence shows that these actions for the prevention of stunting and promotion of catch-up growth are relevant if addressed by all the sectors involved. The WHO defines intersectoral actions as:

a recognized relationship between part or parts of the health sector and part or parts of another sector, that has been formed to take action on an issue or to achieve health outcomes in a way that is more effective, efficient or sustainable than could be achieved by the health sector working alone. (1)

Therefore, there is a need to identify actions under way to monitor prevalence, nutritional interventions, and intersectoral collaboration to address the risk of stunting during pregnancy and the first 2 years of life. Prevention of and interventions against stunting and contributing risk factors depend upon the identification of those actions that improve a child's age-related growth and height/length gain based on an inter-sector coordination approach (11). Through a systematic review of the literature, we aimed at identifying and describing evidence about infant stunting prevention, associated factors, nutritional interventions, and intersectoral collaboration efforts worldwide.

Materials and methods

We conducted a systematic review following the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines registered at the International Register of Systematic Prospective Reviews (PROSPERO) and approved under registration number CRD42019134431.

Search strategy

The search was conducted on February 27, 2019, in MEDLINE (using the free access tool PubMed® and OVID) and Web of Science. The search terms were “Malnutrition/prevention & control*” OR stunting, AND “infant” OR “child”, AND “prevention” OR “treatment” OR “intervention” OR “primary care” selected from the Medical Subject Headings (MeSH) and Health Sciences Descriptors (DeCS). Terms could be found anywhere in the article, title, or abstract. We refined the search by including the term “birth-23 months”.

We also conducted a search of gray literature to identify the evidence on intersectoral collaboration and stunting. We searched in MEDLINE (using the free access tool PubMed® and OVID), Web of Science, and Google for eligible studies using the terms Malnutrition/prevention & control* OR stunting OR undernutrition AND public-private OR Public Health* OR Public Sector* OR Public-Private Sector Partnerships* OR inter-sectoral OR multi-sectoral AND partnerships OR collaboration OR consolidation OR cooperation OR planning AND infant OR child. We searched as well secondary data sources such as the WHO, FAO, World Bank, and the United Nations International Children’s Emergency Fund (UNICEF) websites to find eligible documents using the terms “stunting” and/or “chronic undernutrition.”

We did not restrict the search by language or year of publication. The search equations used for each of the databases are included in Supplementary document 1. We used the EndNote X7 software to manage references, remove the duplicates, and obtain full documents to review.

Inclusion and exclusion criteria

Original articles were included using the following criteria: (a) any study on stunting prevention, associated factors, or nutritional interventions; (b) any study on stunting intersectoral collaboration; (c) evidence on interventions was restricted to infants (children under 2 years old), and (d) documents on public health policies, national guidelines, infographics, systematic reviews, meta-analyses, observational studies, and experimental studies. No language or country restrictions were applied.

Exclusion criteria included: (a) clinical studies; (b) interventions in children older than 2 years, and (c) studies that did not explain intersectoral collaboration among sectors, or that were not oriented towards stunting prevention or catch-up growth.

Three researchers conducted the screening process independently (AR, NB, and PR), applying pre-established inclusion and exclusion criteria to select studies for complete reading; they also conducted the extraction. The senior researcher (AR) solved doubts while disagreements were resolved through consensus.

Data extraction

The three independent researchers extracted the data from the studies using a standardized data extraction format. Characteristics included: (a) publication (title, author[s], journal, year, study site [country]); (b) study characteristics (design, sample size); (c) stunting prevention, nutritional interventions, or intersectoral collaboration; (d) evidence on health, social assistance, caregivers' education, community empowerment for stunting prevention, catch-up growth, or intersectoral collaboration. We grouped the study countries according to WHO regions.

Variables of interest

The main outcome was infant stunting defined as height/length-for-age at least two standard deviations below the median of reference.

Independent variables included stunting-associated protective and risk factors, prevention strategies, nutrition interventions, and intersectoral collaboration along the life course. Table 1 shows study characteristics by stunting prevention or management strategies. Data syntheses were done for the following topics: (a) Poor nutrition during pregnancy and the first 2 years of life; (b) lack of breastfeeding; (c) poor complementary feeding; (d) micronutrient supplementation; (d) poor health services for antenatal care; (e) child development and growth consultations including height-for-age assessment and documentation of risk or chronic undernutrition in children under 2; (f) community, parent, and caregiver education on chronic undernutrition in children under 2, and (g) social and health workers training on chronic undernutrition in children under 2.

Study quality evaluation

Study quality was measured according to the checklist proposed by Downs and Black (1998). We evaluated reporting, external validity, internal validity bias, internal validity confounding, and power of studies based on 27 items if applicable (Supplementary table 1). Reviewers independently assessed the risk of bias while disagreements were resolved through consensus.

Table 1. Characteristics of the studies included according to the strategies to prevent or treat stunting by life-course

	Prevention		Interventions		Intersectoral collaboration	
	n	%	n	%	n	%
Pregnancy	111	48	26	11	80	35
Health attention	101	44	18	8	61	26
Social attention	37	16	5	2	49	21
Health education or counselling	45	19	7	3	30	13
Empowerment community	36	16	10	4	49	21
Up to 6 months old	135	58	51	22	92	40
Health attention	106	46	32	14	68	29
Social attention	45	19	10	4	51	22
Health education or counselling	65	28	25	11	37	16
Empowerment community	46	20	15	6	53	23
Up to 1 year old	166	72	55	24	115	50
Health attention	142	61	35	15	86	37
Social attention	65	28	14	6	61	26
Health education or counselling	87	38	22	10	45	19
Empowerment community	57	25	17	7	75	32

N=231

Table 2. Characteristics of the studies included in the systematic review

	Prevention		Interventions		Intersectoral collaboration	
	n	%	n	%	n	%
Total studies	231		199	86.1	71	30.7
World Health Organization region covered						
The Americas-PAHO	28	12.1	26	13.1	6	8.5
Africa-AFRO	51	22.1	41	20.6	18	25.4
Western Pacific-WPRO	15	6.5	14	7.0	4	5.6
Europe-EURO	2	0.9	2	1.0	1	1.4
Eastern Mediterranean-EMRO	7	3.0	3	1.5	2	2.8
Southeast Asia-SEARO	44	19.0	39	19.6	20	28.2
Multiple regions	84	36.4	74	37.2	20	28.2
Study design						
Cross sectional	54	23.4	53	98.1	18	35.3
Cohort	7	3.0	6	85.7	4	57.1
Case control	2	0.9	1	50.0	0	0.0
Intervention	53	22.9	45	84.9	18	34.0
Systematic review	10	4.3	10	90.9	5	45.5
Theoretical and conceptual document	65	28.1	56	86.2	20	30.8
Qualitative study	12	5.2	9	75.0	3	25.0
Other: Health policies, infographics, national guidelines	27	11.7	20	76.9	4	15.4
Lifecycle stages						
Pregnancy	141	61.0	112	79.4	25	17.7
Birth to 6 months	166	71.9	137	82.5	50	30.1
6 months to 24 months	196	84.8	165	84.2	55	28.1

Data analysis

Descriptive statistics (i.e., frequencies, means, ranges, and percentages) were used to report the variables of interest. Table 2 shows the characteristics of the documents included in the review.

Results

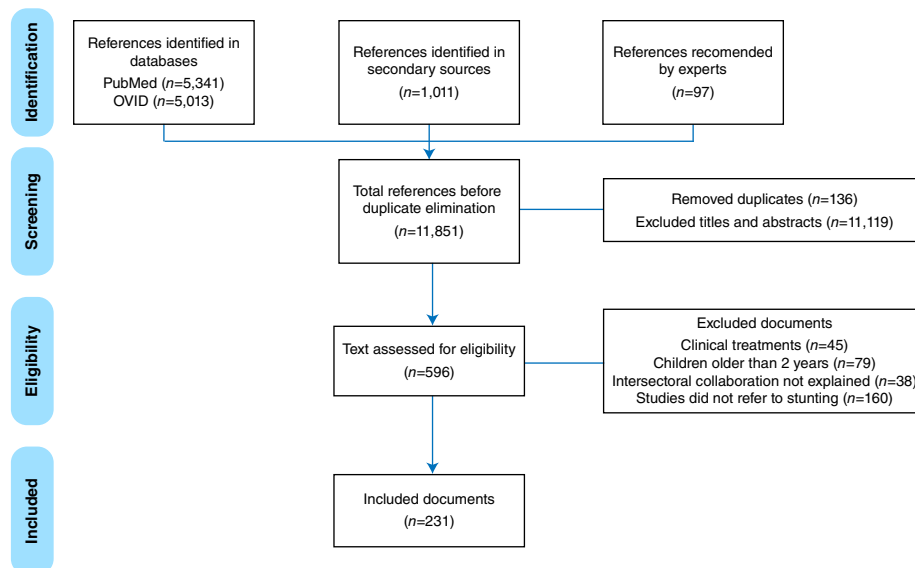
Data synthesis

The search strategy resulted in 11,851 titles to examine. After removing duplicates (n=136 documents) and excluding 11,119 by title and abstracts, a list of 596 unique citations was assessed for eligibility. We identified 231 articles for full-text review (figure 1).

The characteristics of the documents included in the review are presented in table 2. Most of the studies were conducted in multiple regions (n=84), followed by those in Africa (n=51) and Southeast Asia (n=44). The most frequent topics were stunting prevention (n=199), intersectoral collaboration (n=122), and nutritional interventions (n=71). Regarding the type of study, interventions were the most frequent (n=53), followed by cross-sectional (n=51), cohort (n=7), and cases and controls (n=2) studies. The sample size of the observational studies ranged from 48 to 699,686 participants. Data also included systematic reviews (n=10), qualitative studies (n=12), theoretical and conceptual documents (n=65), and health policies, infographics, and national guidelines (n=27).

Among life-course risk factors and interventions to prevent stunting, the most frequent was from 6 to 24 months (n = 196), followed by birth to 6 months (n=166), and pregnancy (n=141). We present here the results on stunting prevention, nutritional interventions, and intersectoral collaboration

efforts evidenced in the literature. Table 3 shows study characteristics and life-course stages from pregnancy up to 24 months by region.



Note: Taken from PRISMA (2009)

Figure 1. Flowchart of studies selection

Table 3. Prevention of stunting in children under 2 years of age by life-course stage

	N = 231		AFRO (1)		EMRO (2)		EURO (3)		PAHO (4)		SEARO (5)		WPRO (6)		Multiple regions	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Pregnancy	141	61.0	24	17.0	4	2.8	0	0.0	15	10.6	33	23.4	7	5.0	58	41.1
Antenatal care	33	23.4	2	6.1	1	3.0	0	0.0	7	21.2	8	24.2	4	12.1	11	33.3
Education or counseling in nutrition for mothers and newborns	45	31.9	8	17.8	1	2.2	0	0.0	1	2.2	12	26.7	3	6.7	20	44.4
Mother's height	11	7.8	1	9.1	0	0.0	0	0.0	1	9.1	4	36.4	0	0.0	5	45.5
Micronutrient supplements	55	39.0	5	9.1	0	0.0	0	0.0	6	10.9	13	23.6	4	7.3	27	49.1
Adequate weight gain	15	10.6	4	26.7	0	0.0	0	0.0	0	0.0	3	20.0	1	6.7	7	46.7
Birth until 6 months of age	166	71.9	29	17.5	4	2.4	1	0.6	17	10.2	33	19.9	14	8.4	68	41.0
Low birth weight	19	11.4	3	15.8	0	0.0	0	0.0	3	15.8	3	15.8	2	10.5	8	42.1
Low height for age	6	3.6	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	16.7	2	33.3	1	16.7	2	33.3
Breastfeeding practices	71	42.8	9	12.7	3	4.2	0	0.0	6	8.5	16	22.5	3	4.2	34	47.9
Counseling in breastfeeding and nutrition	62	37.3	11	17.7	1	1.6	0	0.0	4	6.5	12	19.4	3	4.8	31	50.0
Micronutrient supplements	33	19.9	6	18.2	1	3.0	0	0.0	3	9.1	5	15.2	5	15.2	13	39.4
Early detection of infants at risk or with low HAZ	17	10.2	1	5.9	0	0.0	1	5.9	3	17.6	6	35.3	1	5.9	5	29.4
Growth and development control	33	19.9	4	12.1	0	0.0	1	3.0	6	18.2	8	24.2	2	6.1	12	36.4
Vaccines	21	12.7	3	14.3	2	9.5	0	0.0	1	4.8	4	19.0	2	9.5	9	42.9
6 to 24 months of age	196	84.8	37	18.9	6	3.1	2	1.0	22	11.2	36	18.4	13	6.6	80	40.8
Complementary feeding	100	51.0	16	16.0	2	2.0	1	1.0	6	6.0	19	19.0	7	7.0	49	49.0
Counseling in nutrition	83	42.3	15	18.1	1	1.2	1	1.2	5	6.0	12	14.5	7	8.4	42	50.6
Breastfeeding	52	26.5	8	15.4	1	1.9	0	0.0	5	9.6	12	23.1	3	5.8	23	44.2
Micronutrient supplements	72	36.7	13	18.1	2	2.8	0	0.0	8	11.1	15	20.8	5	6.9	29	40.3
Deworming	12	6.1	2	16.7	0	0.0	0	0.0	1	8.3	3	25.0	1	8.3	5	41.7
Early detection of infants at risk or with low HAZ	17	8.7	3	17.6	0	0.0	0	0.0	3	17.6	4	23.5	3	17.6	4	23.5
Growth and development control	41	20.9	8	19.5	0	0.0	1	2.4	7	17.1	8	19.5	4	9.8	13	31.7
Vaccines	23	11.7	3	13.0	1	4.3	0	0.0	1	4.3	3	13.0	4	17.4	11	47.8

HAZ: Height for age

Stunting prevention

Out of the studies reviewed, 199 discussed stunting prevention factors and were mainly documented in Africa (n=41), Southeast Asia (n=39), and the Americas (n=26) (table 2).

Table 3 shows the evidence-supported strategies for stunting prevention during the window of opportunity known as the first 1,000 days of life, from gestation up to 2 years old. The topics mostly addressed in studies discussing stunting prevention during pregnancy were micronutrient supplements (n=55); education or counseling in nutrition for mothers and newborns (n=45); antenatal care (n=33) with more than 23.6% of the evidence originated in Southeast Asia, and adequate maternal weight gain (n=15) Africa being the region with the highest number of strategies focusing on adequate gestational weight-gain to prevent stunting. The least-reported topic was maternal height (n=11). From birth up to 6 months, studies on stunting prevention mostly focused on the following topics: breastfeeding practices (n=71); counseling on breastfeeding and nutrition (n=62), and growth and development control (n=33) again with the largest amount of evidence originated in Southeast Asia. The least-reported topic was low height for age (n=6). Finally, studies discussing stunting prevention from 6 to 24 months were mostly concerned with the following topics: complementary feeding (n=100); counseling in nutrition (n=83), and micronutrient supplements (n=72) with the largest amount of studies conducted in Africa.

Nutritional interventions to address stunting and achieve catch-up growth

Seventy-one of the studies reported evidence on nutritional interventions to address stunting (table 2); those discussing catch-up growth were mainly documented in Southeast Asia (n=20), Africa (n=18), and the Americas (n=6). Studies on nutritional interventions during pregnancy were mostly concerned with micronutrient supplements (n=55) and antenatal care (n=33). From birth to 6 months, studies were mostly concerned with breastfeeding practices (n=71) and micronutrient supplements (n=33) while from 6 to 24 months they were mostly focused on complementary feeding (n=100) and micronutrient supplements (n=72).

In addition, 122 studies reported on intersectoral collaboration for stunting prevention and nutritional interventions. Intersectoral collaboration studies were mainly from Southeast Asia (n=22), Africa (n=21), and the Americas (n=11). It was also evident in these studies that intersectoral actions during pregnancy, in children under 6 months and under 2 years are necessary for stunting prevention. It was also evident in these studies that intersectoral actions during pregnancy in children under 6 months and under 2 years are necessary for stunting prevention (Table 4).

Table 4. Intersectoral collaboration to address stunting or its risks by sectors.

Agriculture	Improve nutrition messages by coordination between community workers from the health and agriculture sectors Guarantee food security
Health	Implement antenatal control to prevent stunting Surveillance of linear growth and development Guarantee micronutrient supplementation Develop programs for adequate breastfeeding practices in coordination with the social assistance sector
Education	Develop health literacy and nutrition knowledge Develop strategies to reduce adolescent pregnancy and promote higher education and women's empowerment
Social assistance	Implement conditional cash transfers to increase the use of health services and stunting surveillance Offer nutritional complementation for vulnerable homes with food insecurity
Economic development	Promoting community workers for stunting surveillance
Government	Integrate nutrition into the national development agenda Develop national nutritional policies and/or dietary guidelines Implement policies for the protection, promotion, and support of optimal breastfeeding practices Ensure a common understanding between sectors regarding the severity of stunting Ensure a mechanism for local delivery of nutrition services Promote and support local ownership of nutrition programs and their outcomes Monitor intersectoral collaboration with indicators at national, provincial, and district levels
Private	Participate in public-private partnerships aligned with policies to improve child growth and development Integrate nutrition in company policies Provide experience in communication and financial support for a communication plan aimed at reducing stunting

Discussion

This systematic review of the literature is the first one to identify and describe stunting prevention strategies, associated factors, nutritional interventions, and intersectoral collaboration in children up to 2 years of age worldwide. It is useful for informing public health and policy decision-makers. Key findings indicated that:

- Most stunting prevention strategies, nutritional interventions, and intersectoral collaboration were conducted in low- and middle-income countries, mainly in the Africa (AFRO), Southeast Asia (SEARO), and the Americas (PAHO) WHO regions.
- The evidence on stunting prevention in children up to 2 years by life-course stage and region showed the need to wage actions to strengthen the design and implementation of nutritional interventions.
- The specific interventions for catch-up growth were the least prevalent topic in this review.

There are knowledge gaps on intersectoral coordination for stunting prevention and/or intervention.

The strengths of this study are twofold: First, we complemented the collection and analysis of the most updated and high-quality data available with the revision of WHO, PAHO, and FAO official documents, as well as expert recommendations. Second, we characterized the evidence according to the life course from pregnancy to 2 years of age focused on prevention strategies, nutritional interventions, and intersectoral collaboration against stunting.

It has been suggested that stunting is an accurate indicator of inequalities in human development and that height-for-age is the best indicator of children's well-being (12). The evidence found in this systematic review came mostly from the AFRO, SEARO, and PAHO regions where most interventions were conducted. Our findings show a region-specific description of actions to address stunting, where relevance and use depend on the country-specific context. Stunting tendencies from 1990 to 2012 showed that the number of stunted children under 5 was halved in Asia and the Latin America/Caribbean region, but its burden in Africa increased by 24% (1). As various authors have argued, factors contributing to stunting correlate with poverty and socio-economic development (13-16). Black, *et al.*, for example, concluded that in most countries, the prevalence of stunting among children under 5 was 2.5 times higher in the low-wealth quintile compared with the highest wealth quintile (8). Moreover, studies have demonstrated that a one-dollar increase in the *per capita* GDP was associated with a 0.003-unit decrease in stunting ($p < .001$) (17) and previous research using these platforms concluded that low stunting magnitudes were found in low- and middle-income countries with strong nutrition governance (17), which might be due to the existence of an intersectoral mechanism to address nutrition, the existence and adoption of a nutritional strategic plan, and national nutritional policies and/or dietary guidelines. These programs counted with resource allocation for the national nutrition plan, strategies, or policies, as well as the inclusion of nutrition monitoring and surveillance components in health budgets (17).

Critical sectors mentioned for stunting interventions were agriculture, health, education, social assistance programs, employment, and government (18). Several studies identified intersectoral coordination between health and other sectors. As an example of coordination between health and social sectors, conditional cash transfers were found to increase the use of health services and stunting surveillance (19) while social assistance programs allowed nutritional complementation for vulnerable homes with food insecurity (20) and were considered helpful to reduce some of the limitations of families to invest optimally in their children. Such programs improved parents' knowledge about ideal practices to promote parenting and, also, had large impacts on parental behaviors and children's development in various contexts.

In some cases, social assistance programs including nutrition-specific objectives aligned with local needs and health services to increase access to food and nutritional supplements (21). Health literacy and nutrition knowledge were documented as activities where different sectors could participate and government actions geared towards the promotion of breastfeeding (20). Researchers also evidenced coordination between community workers from the health and agriculture sectors to improve nutrition messages (22).

As for the evidence on stunting prevention by life-course, stage, and region, studies have shown that actions are required to strengthen the design and implementation of nutritional interventions. Stunting often begins in utero, according to India's National Family Health Survey 2005–2006 (12). Antenatal control constitutes one of the most important factors to reduce stunting risk, as a pregnant woman who has at least one antenatal control has a 4.11% reduction in stunting odds (23). Antenatal control is also a critical action to control adequate weight gain during pregnancy; its inadequacy is a strong predictor of low birth weight and other conditions related to malnourishment (23).

The importance of adequate weight gain to prevent stunting was documented in pregnant women in Mozambique in the framework of research coordinated by the Ministries of Health and Women and Social Action. These recommendations are supported by scientific evidence and, furthermore, they are inexpensive and easy to implement at the primary healthcare level in any country. Micronutrient supplementation for pregnant women (i.e., iron and folic acid) has been found to prevent micronutrient deficiencies and contribute to linear growth improvement in many studies (20,24-26).

A prevalent topic was adequate breastfeeding practices, particularly exclusive breastfeeding, during the first 6 months of life. Global strategies, such as Scaling Up Nutrition, 1000 Days, the Zero Hunger Challenge, and the Nutrition for Growth Summit, have demonstrated that early introduction of breastfeeding in the first hour after birth is a determinant factor for stunting prevention (27,28). Individual or group-based counseling sessions to promote exclusive breastfeeding were reported as important interventions to scale up (29). Other studies described the importance of the protection, promotion, and support of optimal breastfeeding practices, such as the initiation of breastfeeding within 1 hour of birth, exclusive breastfeeding counseling, lay support for breastfeeding through community-based and facility-based contacts, and additional control of the marketing of breastfeeding substitutes (30).

Other important interventions, such as the surveillance of low birth weight and low birth height/length, were important for the early detection of infants at risk, as were low height for age, vaccination status, and close growth monitoring (9). Maternal health literacy and education (31,32), as well as family nutrition practices based on the WHO infant and young child feeding guidelines (33), prevented stunting.

Researchers have acknowledged the difficulties associated with the diagnosis of stunting despite the global consensus on how to define and measure it (12). In some communities, short stature is the norm and linear growth is not routinely assessed in primary healthcare settings (12). In this context, surveillance of stunted infants is critical because they are seemingly healthy. For this reason, the literature supports raising awareness and informing caregivers that short stature is a nutrition-related problem and linear growth is associated with adequate care (34).

Interventions to address stunting are multifaceted (30); they include breastfeeding education and counseling, appropriate complementary feeding, micronutrient supplementation of pregnant women, nutrition counseling during pregnancy, vitamin A supplementation in infants and children 6 to 59 months of age, and zinc supplementation in the management of diarrhea, which improves nutrient uptake (35). These interventions often intertwine and stunting prevention messages take precedent over the specific catch-up growth messages (13).

The evidence synthesis in this systematic review clearly showed that a determinant factor in catch-up growth after a period of stunting was complementary feeding. Appropriate food introduction complementary to breastfeeding was relevant for catch-up growth with indicators such as minimum dietary diversity, minimum meal frequency, and minimum acceptable diet (26,36,37). Intensive counseling and emphasis on dietary diversity together with the promotion and consumption of animal source foods are successful interventions to improve complementary feeding (10,38).

Community workers and community participation were key to identifying pregnant women suffering from or at risk of food insecurity and helped to ease their route to health and social services; consequently, they facilitated the identification of adequate interventions for stunted children (39,40). It has also been suggested that time constraints, maternal depression, lack of family support, and breastfeeding while working should all be taken into account and monitored in the surveillance of stunting or the risk thereof (28).

As for intersectoral collaboration, the evidence highlighted a call to action from different sectors, but more is needed to develop indicators for the monitoring and evaluation of these partnerships. Linear growth improvement was possible through the national coordination of child and maternal nutrition services (27). Evidence also showed that coordination should be clearly defined specifying what should be coordinated, how, and by whom (41). Plans to evaluate intersectoral coordination should also be considered (42). In Perú, establishing political commitment, cooperation, and coordination was acknowledged as a social, economic, and health challenge crucial for reducing stunting (43). Mozambique stands out as an exceptional example, as specific roles and indicators were assigned to the health, social assistance, and educational sectors (44). The goal was to qualify advisors in healthy feeding and nutrition from each of these sectors and monitor the partnerships with indicators at national, provincial, and district levels (44). The literature also highlighted the importance of community mobilization and motivation to undertake initiatives for stunting prevention at the household level and to use services that improve child growth and development (3).

Sectors other than health have responsibilities in prevention and nutritional interventions against stunting. The education sector can develop strategies to reduce adolescent pregnancy and promote higher education and women's empowerment, for example (15,45,46).

The economic development sector can aid the health sector by promoting community workers for stunting surveillance (27); the communication sector is important for surveillance and intersectoral collaboration (27); studies also supported the notion that the academic sector should share the responsibility of integrating the knowledge on breastfeeding and complementary feeding and their promotion (41). The private sector can contribute its experience in communications and financial support to develop plans aimed at reducing stunting at the national, provincial, and district levels (42,44) as shown by the evidence on its relevance for food fortification in alignment with government policies (27,42,47). Successful intersectoral collaboration strategies for the prevention of stunting and nutritional interventions to address it suggest that multiple sectors can target this public health problem by raising public awareness.

Thus, the recommendations from this review are applicable at multiple levels. Governments should strengthen national information and surveillance systems to produce data to support policy-makers response to nutrition priorities in a timely fashion. Indicators on stunting risks and their prevention, nutritional interventions, and intersectoral collaboration should all be included in the surveillance systems. Policymakers should raise awareness and train health workers on the importance of antenatal control and counseling regarding adequate weight gain during pregnancy. Lastly, more research is needed on epidemiologic surveillance indicators for the monitoring of prevention and catch-up growth in infants from an intersectoral collaboration perspective.

Stunting is a worldwide concern and one of the Sustainable Development Goals to be accomplished in the short term. Worldwide evidence about prevention strategies, nutritional interventions, and intersectoral collaboration to address stunting and its risk factors highlights the need to strengthen vigilance and public health interventions. Linear growth is the best indicator of overall child development during the first years of life and human development inequalities. Efforts to assess the available information are necessary to create epidemiologic surveillance indicators, which provide guidance and individualized support to adopt public policies addressed to this problem and encourage the involvement of multiple sectors. All countries should promote the implementation of stunting surveillance and the construction of structured and standardized indices for international comparability and monitoring.

There were some limitations in the study. The comprehensive search terms used could reduce some relevant studies as gray literature. The gray literature may have contained additional information that was not included, and, finally, we gathered the information from multiple and heterogeneous sources, which represents a limitation for data standardization in specific variables due to different measurement methods.

References

1. World Health Organization. Use of new World Health Organization child growth standards to assess how infant malnutrition relates to breastfeeding and mortality. Access: May 20, 2020. Available from: <https://www.who.int/bulletin/volumes/88/1/08-057901/en/>
2. Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 2465 de 2016. Bogotá, D.C.: Minsalud; 2016. p. 1-47.
3. World Health Organization. Malnutrición. Geneva: WHO; 2010. p. 1.
4. World Health Organization. Enfermedades diarreicas. Geneva: WHO; 2017. p. 1.
5. Walters DE. Reaching the global target to increase exclusive breastfeeding: How much will it cost and how can we pay for it? *Breastfeed Med*. 2016;11:413-5. <https://doi.org/10.1089/bfm.2016.0128>
6. Comisión Económica para América Latina y el Caribe-CEPAL, Programa Mundial de Alimentos. El costo de la doble carga de la malnutrición. Santiago de Chile: PNU, CEPAL; 2017. p. 101.
7. Grantham-McGregor S, Cheung YB, Cueto S, Glewwe P, Richter L, Strupp B, *et al*. Developmental potential in the first 5 years for children in developing countries. *Lancet*. 2007;369:60-70. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60032-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60032-4)
8. Black R, Walker S, Bhutta Z, Christian P, De Onis M. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *Lancet*. 2013;382:427-51. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60937-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60937-X)
9. UNICEF. UNICEF's approach to scaling up nutrition for mothers and their children. Geneva: UNICEF; 2015. p. 16.
10. Bhutta Z, Rizvi A, Gaffey M, Walker N, Horton S. Evidence-based interventions for improvement of maternal and child nutrition: What can be done and at what cost? *Lancet*. 2013;382:452-77. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60996-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60996-4)
11. Casanovas M, Lutter C, Mangasaryan N, Mwadime R, Hajeerhoy N, Aguilar A, *et al*. Multi-sectoral interventions for healthy growth. *Matern Child Nutr*. 2013;9(Suppl.2):46-57. <https://doi.org/10.1111/mcn.12082>
12. Onis M, Branca F. Childhood stunting: A global perspective. *Matern Child Nutr*. 2016;12(Suppl.1):12-26. <https://doi.org/10.1111/mcn.12231>
13. World Health Organization. Global nutrition targets 2025: Anaemia policy brief. Geneva: WHO; 2014. p. 2.
14. Chase C, Ngure F. Multisectoral approaches to improving nutrition: Water, sanitation, and hygiene. Washington, D.C.: World Bank Group; 2016. p. 6.

15. Higgins-Steele A, Mustaphi P, Varkey S, Ludin H, Safi N, Bhutta ZA. Stop stunting: Situation and way forward to improve maternal, child and adolescent nutrition in Afghanistan. *Matern Child Nutr.* 2016;12(Suppl.1):237-41. <https://doi.org/10.1111/mcn.12288>
16. Mackintosh U, Marsh D, Schroeder D. Sustained positive deviant child care practices and their effects on child growth in Viet Nam. *Food Nutr Bull.* 2002;23(Suppl.):18-27.
17. Sunguya B, Ong K, Dhakal S, Mlunde L, Shibanuma A, Yasuoka J, *et al.* Strong nutrition governance is a key to addressing nutrition transition in low and middle-income countries: Review of countries' nutrition policies. *Nutr J.* 2014;13:65. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-65>
18. World Bank. When water becomes a hazard: A diagnostic report on the state of water supply, sanitation and poverty in Pakistan and its impact on child stunting. Washington, D.C.: World Bank; 2018. p. 81.
19. Universidad de los Andes, Institute for Fiscal Studies (Reino Unido), Fundación Éxito; ICBF. . Evaluación del impacto de la implementación de un currículo de estimulación con capacitación y acompañamiento de madres comunitarias y mejoramiento nutricional en hogares comunitarios FAMI. Bogotá, D.C.: Universidad de los Andes, Institute for Fiscal Studies, Fundación Éxito; ICBF. 2017. p. 46.
20. Roberfroid D, Huybregts L, Lanou H, Ouedraogo L, Henry M, Meda N. Impact of prenatal multiple micronutrients on survival and growth during infancy: A randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2012;95:916-24. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.029033>
21. Muldiasman M, Kusharisupeni K, Laksminingsih E, Besral B. Can early initiation to breastfeeding prevent stunting in 6-59 months old children? *J Health Res.* 2018;32:334-41. <https://doi.org/10.1108/JHR-08-2018-038>
22. Kadiyala S, Morgan EH, Cyriac S, Margolies A, Roopnaraine T. Adapting agriculture platforms for nutrition: A case study of a participatory, video-based agricultural extension platform in India. *PLoS ONE.* 2016;11:e0164002. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164002>
23. Kuhnt J, Vollmer S. Antenatal care services and its implications for vital and health outcomes of children: Evidence from 193 surveys in 69 low-income and middle-income countries. *BMJ Open.* 2017;7:e017122. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-017122>
24. Nisar Y, Dibley M, Aguayo V. Iron-folic acid supplementation during pregnancy reduces the risk of stunting in children less than 2 years of age: A retrospective cohort study from Nepal. *Nutrients.* 2016;8:67. <https://doi.org/10.3390/nu8020067>
25. Dzed L, Wangmo K. Reducing stunting in Bhutan: An achievable national goal. *Matern Child Nutr.* 2016;12(Suppl.1):246-8. <https://doi.org/10.1111/mcn.12287>
26. Baye K, Faber M. Windows of opportunity for setting the critical path for healthy growth. *Public Health Nutr.* 2015;18:1715-7. <https://doi.org/10.1017/S136898001500186X>
27. U.S. Agency for International Development. Multi-sectoral nutrition strategy monitoring & learning plan. Washington, D.C.: USAID; 2018.
28. Kandpal E, Alderman H, Friedman J, Filmer D, Onishi J, Avalos J. A conditional cash transfer program in the Philippines reduces severe stunting. *J Nutr.* 2016;146:1793-800. <https://doi.org/10.3945/jn.116.233684>
29. Shekar KJ, Dayton J, Kweku J, Pereira A, D'Alimonte M. An investment framework for meeting the global nutrition target for stunting. Washington, D.C.: The World Bank; 2017.
30. World Health Organization. Reducing stunting in children. Equity considerations for achieving the Global Nutrition Targets 2025. Geneva: World Health Organization; 2018. p. 10.
31. Kalimira AA, MacDonald C, Simpson JR. The impact of an integrated community-based micronutrient and health programme on stunting in Malawian preschool children. *Public Health Nutr.* 2010;13:720-9. <https://doi.org/10.1017/S1368980009991753>
32. Smuts M, Malan L, Kruger H, Rothman M, Kvalsvig J, Covic N, *et al.* Effect of small-quantity lipid-based nutrient supplements on growth, psychomotor development, iron status, and morbidity among 6- to 12-mo-old infants in South Africa: A randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2019;109:55-68. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy282>
33. Wang J, Chang S, Zhao L, Yu W, Zhang J, Man Q, *et al.* Effectiveness of community-based complementary food supplement (Yingyangbao) distribution in children aged 6-23 months in poor areas in China. *PLoS ONE.* 2017;12:e0174302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174302>

34. Mchome Z, Bailey A, Darak S, Haisma H. A child may be tall but stunted. Meanings attached to childhood height in Tanzania. *Matern Child Nutr.* 2019;15:e12769. <https://doi.org/10.1111/mcn.12769>
35. World Health Organization. Composition of a multi-micronutrient supplement to be used in pilot programmes among pregnant women in developing countries: Report of a United Nations Children's Fund (UNICEF), World Health Organization (WHO) and United Nations University workshop. Geneva: World Health Organization; 1999. p. 10.
36. Aguayo VM, Nair R, Badgaiyan N, Krishna V. Determinants of stunting and poor linear growth in children under 2 years of age in India: An in-depth analysis of Maharashtra's comprehensive nutrition survey. *Matern Child Nutr.* 2016;12(Suppl.1):121-40. <https://doi.org/10.1111/mcn.12259>
37. Khan A, Kabir I, Ekstrom E, Asling-Monemi K, Alam D. Effects of prenatal food and micronutrient supplementation on child growth from birth to 54 months of age: A randomized trial in Bangladesh. *Nutr J.* 2011;10:134. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-10-134>
38. van der Kam S, Roll S, Swarthout T, Edyegu-Otelu G, Matsumoto A, Kasujja FX, *et al.* Effect of short-term supplementation with ready-to-use therapeutic food or micronutrients for children after illness for prevention of malnutrition: A randomised controlled trial in Uganda. *PLoS Med.* 2016;13:e1001951. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001951>
39. Menon P, Nguyen PH, Saha KK, Khaled A, Sanghvi T, Baker J, *et al.* Combining intensive counseling by frontline workers with a nationwide mass media campaign has large differential impacts on complementary feeding practices but not on child growth: Results of a cluster-randomized program evaluation in Bangladesh. *J Nutr.* 2016;146:2075-84. <https://doi.org/10.3945/jn.116.232314>
40. Kodish S, Aburto N, Hambayi MN, Kennedy C, Gittelsohn J. Identifying the sociocultural barriers and facilitating factors to nutrition-related behavior change: Formative research for a stunting prevention program in Ntchisi, Malawi. *Food Nutr Bull.* 2015;36:138-53. <https://doi.org/10.1177/0379572115586784>
41. Akombi B, Agho K, Hall J, Wali N, Renzaho A, Merom D. Stunting, wasting and underweight in Sub-Saharan Africa: A systematic review. *Int J Environ Res Public Health.* 2017;14:863. <https://doi.org/10.3390/ijerph14080863>
42. Hoddinott J, Gillespie S, Yosef S. Public-private partnerships and undernutrition: Examples and future prospects. *World Rev Nutr Diet.* 2016;115:233-8. <https://doi.org/10.1159/000442110>
43. Marini A, Rokx C. Standing Tall Peru's success in overcoming its stunting crisis. Washington, D.C.: World Bank Group; 2017. p. 11.
44. Republic of Mozambique. Multisectoral plan for chronic malnutrition reduction in Mozambique 2011 – 2014. Maputo: Prime Minister; 2010.
45. Prentice AM. Stunting in developing countries. *World Rev Nutr Diet.* 2019;119:171-83. <https://doi.org/10.1159/000494315>
46. Powell C, Baker-Henningham H, Walker S, Gernay J, Grantham-McGregor S. Feasibility of integrating early stimulation into primary care for undernourished Jamaican children: Cluster randomised controlled trial. *BMJ.* 2004;329:89. <https://doi.org/10.1136/bmj.38132.503472.7C>
47. Moench-Pfanner R, van Ameringen M. The Global Alliance for Improved Nutrition (GAIN): A decade of partnerships to increase access to and affordability of nutritious foods for the poor. *Food Nutr Bull.* 2012;33(Suppl.):S373-80. <https://doi.org/10.1177/15648265120334S313>

Supplementary files

Evaluation of study quality according to Downs and Black

	Yes (n)	%	No (n)	%	Does not apply (n)	%
Reporting						
1. Is the hypothesis/aim/objective of the study clearly described?	228	98.7	2	0.9	0	0.0
2. Are the main outcomes to be measured clearly described in the Introduction or Methods section?	225	97.4	3	1.3	2	0.9
3. Are the characteristics of the patients included in the study clearly described?	204	88.3	5	2.2	21	9.1
4. Are the interventions of interest clearly described?	128	55.4	39	16.9	63	27.3
5. Are the distributions of principal confounders in each group of subjects to be compared clearly described?	174	75.3	18	7.8	38	16.5
6. Are the main findings of the study clearly described?	221	95.7	3	1.3	6	2.6
7. Does the study provide estimates of the random variability in the data for the main outcomes?	172	74.5	13	5.6	45	19.5
8. Have all the important adverse events that may be a consequence of the intervention been reported?	91	39.4	63	27.3	76	32.9
9. Have the characteristics of patients lost to follow-up been described?	109	47.2	20	8.7	101	43.7
10. Have actual probability values been reported (e.g., .035 rather than < .05) for the main outcomes except where the probability value is less than .001?	167	72.3	14	6.1	49	21.2
Internal validity – confounding						
11. Were the subjects asked to participate in the study representative of the entire population from which they were recruited?	152	65.8	10	4.3	68	29.4
12. Were those subjects who were prepared to participate representative of the entire population from which they were recruited?	143	61.9	15	6.5	72	31.2
13. Were the staff, places, and facilities where the patients were treated representative of the treatment the majority of patients receive?	121	52.4	31	13.4	78	33.8
Internal validity – bias						
14. Was an attempt made to blind study subjects to the intervention they have received?	64	27.7	66	28.6	100	43.3
15. Was an attempt made to blind those measuring the main outcomes of the intervention?	64	27.7	70	30.3	96	41.6
16. If any of the results of the study were based on “data dredging,” was this made clear?	90	39.0	85	36.8	55	23.8
17. In trials and cohort studies, do the analyses adjust for different lengths of follow-up of patients, or in case-control studies, is the time period between the intervention and outcome the same for cases and controls?	79	34.2	53	22.9	98	42.4
18. Were the statistical tests used to assess the main outcomes appropriate?	162	70.1	5	2.2	63	27.3
19. Was compliance with the intervention/s reliable?	124	53.7	14	6.1	92	39.8
20. Were the main outcome measures used accurate (valid and reliable)?	174	75.3	7	3.0	49	21.2
Internal validity - confounding (selection bias)						
21. Were the patients in different intervention groups (trials and cohort studies) or were the cases and controls (case-control studies) recruited from the same population?	46	19.9	29	12.6	155	67.1
22. Were study subjects in different intervention groups (trials and cohort studies), or were the cases and controls (case-control studies) recruited over the same period of time?	77	33.3	48	20.8	105	45.5
23. Were study subjects randomized to intervention groups?	88	38.1	47	20.3	95	41.1
24. Was the randomized intervention assignment concealed from both patients and health care staff until recruitment was complete and irrevocable?	77	33.3	57	24.7	96	41.6
25. Was there adequate adjustment for confounding in the analyses from which the main findings were drawn?	137	59.3	19	8.2	74	32.0
26. Were losses of patients to follow-up taken into account?	105	45.5	28	12.1	97	42.0
Power						
27. Did the study have sufficient power to detect a clinically important effect where the probability value for a difference being due to chance is less than 5%?	125	54.1	25	10.8	80	34.6

N = 231

Supplementary document**Search equations and terms****Databases**

((“Malnutrition/prevention & control*” OR stunting) AND (“infant” OR “child”) AND (“prevention” OR “treatment” OR “primary care”)) Sort by: Best Match
Filters: Infant: birth-23 months

(((((Malnutrition/prevention & control* OR stunting OR undernutrition) AND (public-private OR Public Health* OR Public Sector* OR Public-Private Sector Partnerships* OR inter-sectoral OR multi-sectoral)) AND ((partnerships OR collaboration OR consolidation OR cooperation OR planning)) AND (infant OR child)))

PUBMED

stunting [Title/Abstract] AND (growth disorders [MeSH Terms] AND (treatment[Title/Abstract]

OVID

(stunting and primary prevention).af. and infant.sh.
stunting.af. and primary prevention.sh. and infant.sh.
(growth disorders and primary prevention and infant).sh.
stunting.at. and primary health care.sh.
(growth disorders and primary health care and infant).sh.
stunting.af. and growth disorders.sh. and treatment.sh.
(stunting and treatment).af. and infant.sh

Web of Science

TS=(stunting AND “primary prevention”)
ALL=growth disorders AND TI=primary prevention
ALL=growth disorders AND ALL=primary prevention AND ALL=stunting
ALL=stunting AND TS= “primary health care” AND TS=infant=
ALL=stunting AND TS=growth disorders AND ALL=treatment AND TS=infant=

Secondary Sources**World Health Organization Website**

Equation: “desnutrición crónica” OR stunting OR malnutrition) AND (Infant OR child)

Equation: malnutrition stunting intersectoral partnership infant child
<https://globalnutritionreport.org/reports/global-nutrition-report-2018/three-issues-critical-need-attention/>

<https://www.who.int/search?page=44&pagesize=10&query=malnutrition%20stunting%20intersectoral%20partnership%20infant%20child&sort=relevance&sortdir=desc&default=AND&f.Countries.size=100&f.Lang.filter=en&f.RegionalSites.size=100&f.Topics.size=100&f.contenttype.size=100&f.doctype.size=101&facet.field=RegionalSites&facet.field=Topics&facet.field=doctype&facet.field=Countries&facet.field=contenttype&facet.field=Lang&tune=true&tune.0=3&tune.1=2&tune.2=2&tune.3=3&tune.4=180&tune.5=75>
Accessed: February 27, 2019

FAO Website

Equation: ((“Malnutrition prevention & control*” OR stunting) AND (infant OR child) AND (prevention OR treatment OR “primary care”))

Equation: malnutrition stunting intersectoral partnership infant child

<http://www.fao.org/search/en/?cx=018170620143701104933%3Aqq82jsfba7w&q=malnutrition+stunting+intersectoral+partnership+infant+child&cof=FORID%3A9&siteurl=www.fao.org%2Fhome%2Fen%2F&ref=&ss=0j0j1>

Accessed: February 27, 2019

World Bank Website

Equation: (("Malnutrition prevention & control*" OR stunting) AND (infant OR child) AND (prevention OR treatment OR "primary care"))

Equation: (((stunting) AND (inter-sectoral OR multi-sectoral) AND (infant OR child)))

http://www.worldbank.org/en/search?q=%28%28%E2%80%9CMalnutrition+prevention+%26+control*%E2%80%9D+OR+stunting%29+AND+%28infant+OR+child%29+AND+%28prevention+OR+treatment+OR+%E2%80%9Cprimary+care%E2%80%9D%29%29

<http://www.worldbank.org/en/search?q=%28%28%28%28stunting%29+AND+%28inter-sectoral+OR+multi-sectoral%29+AND+%28infant+OR+child%29%29%29¤tTab=1>

Accessed: February 27, 2019

UNICEF Website

Equation: (("Malnutrition prevention & control*" OR stunting) AND (infant OR child) AND (prevention OR treatment OR "primary care"))

Equation: malnutrition stunting intersectoral partnership infant child

https://www.unicef.org/search?force=0&query=malnutrition+stunting+intersectoral+partnership+infant+child&search_date_range_picker=&changed%5Bmin%5D=&changed%5Bmax%5D=

Accessed: February 27, 2019

GOOGLE and Colombian National Websites

Ministerio de Salud y Secretaría de Salud

<https://www.minsalud.gov.co/Paginas/default.aspx>

Keywords: Stunting; Retraso en talla; Desnutrición crónica; Malnutrición

Accessed: February 27, 2019

Instituto Colombiano de Bienestar Familiar - ICBF

<https://www.icbf.gov.co/>

Key words: Stunting; Retraso en talla; Desnutrición crónica; Malnutrición

Accessed: February 27, 2019

Secretaría Distrital de Integración Social

<http://www.integracionsocial.gov.co/>

Keywords: Desnutrición crónica.

Accessed: February 27, 2019

Actualización

Retos y oportunidades en el estudio de vesículas extracelulares: contexto institucional a nivel mundial y situación actual en Colombia

Susana Novoa-Herrán

Grupo de Fisiología Molecular, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

En la última década se ha incrementado el número de estudios y publicaciones sobre las vesículas extracelulares y los exosomas. En Colombia, ha habido interés y avances en su estudio, lo que se evidencia en el aumento de publicaciones y proyectos de investigación. Sin embargo, este es un campo de investigación aún en desarrollo, con desafíos analíticos y limitaciones técnicas, por lo cual, en el planteamiento de los proyectos de investigación y desarrollo, es necesario considerar cuál es el estado del campo científico a nivel mundial en cuanto a la nomenclatura y la clasificación de las vesículas extracelulares, las técnicas, recursos, requisitos y especificaciones de calidad y las instituciones que regulan el campo. La respuesta a esta pregunta permitirá desarrollar estudios que cumplan con los estándares internacionales, y las exigencias y recomendaciones institucionales. Sin embargo, la información científica disponible se encuentra dispersa y no todos los aspectos son tratados a cabalidad.

En esta actualización se condensa la información disponible y se presentan los términos oficiales para denominar las vesículas extracelulares y la nomenclatura aceptada actualmente, así como la evolución del campo, la homogenización de los parámetros experimentales, el establecimiento de autoridades científicas, instituciones y recursos, y las recomendaciones que se han generado a nivel mundial para el desarrollo de investigaciones en vesículas extracelulares, incluidos su aislamiento, caracterización y estudio funcional. Por último, se analiza el contexto nacional de una forma crítica, teniendo en cuenta las fortalezas institucionales, los errores usualmente cometidos, y las técnicas y tecnologías analíticas disponibles.

Palabras clave: vesículas extracelulares; exosomas; micropartículas derivadas de células; fenómenos químicos; técnicas de química analítica; terminología como asunto; guía de recursos.

Challenges and opportunities in the study of extracellular vesicles: Global institutional context and national state of the art

In the last decade, the number of studies and publications on extracellular vesicles (EV) and exosomes has boomed. Colombia has displayed interest and progress in their study as shown in the increase of research project publications and products. However, this research field is still developing and has its own analytical challenges and technical limitations. For planning research projects and developing EV studies it is necessary to consider what is the state of the scientific field worldwide concerning EV nomenclature and classification, available techniques, resources, requirements and quality specifications, and the institutions that regulate the field. Answering this question will elicit EV studies that comply with international standards and respond to institutional demands and recommendations. However, the scientific information available is scattered and not all the aspects are considered in full.

In this update, the available information is condensed and the official terms and currently defined nomenclature is presented, as well as the evolution of the field, the homogenization of the experimental parameters, the establishment of scientific authorities, institutions, and resources, and the recommendations generated worldwide for their development and research including their isolation, characterization, and functional studies. Finally, I analyzed the national context in a critical way, considering institutional strengths, common mistakes, and available analytical techniques and technologies.

Keywords: Extracellular vesicles; exosomes; cell-derived microparticles; chemical phenomena; chemistry techniques, analytical; terminology as topic; resource guide.

Recibido: 31/07/2020

Aceptado: 16/05/2021

Publicado: 26/05/2021

Citación:

Novoa-Herrán S. Retos y oportunidades en el estudio de vesículas extracelulares: contexto institucional a nivel mundial y situación actual en Colombia. Biomédica. 2021;41:555-89.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.5749>

Correspondencia:

Sandra Susana Novoa-Herrán, Grupo de Fisiología Molecular, Instituto Nacional de Salud, Avenida Calle 26 No 51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: 220 7700, extensión 1419
snovoa@ins.gov.co

Financiación:

El artículo no contó con financiación.

Conflicto de intereses:

La autora manifiesta no tener ningún conflicto de intereses.

La comunicación entre las células y la capacidad que tienen de afectarse unas a otras caracteriza tanto a los organismos unicelulares como a los multicelulares, y es un aspecto vital en estos últimos. Esta comunicación intercelular es mediada por moléculas de señalización extracelular y mediadores solubles de diversa naturaleza (1), entre los cuales los más estudiados y caracterizados han sido los factores de crecimiento (2), las citocinas (3) y los neurotransmisores (4).

Además de estos, existen las vesículas extracelulares, estructuras con bicapa lipídica secretadas al medio extracelular por múltiples tipos de células. Las diferentes clases de vesículas extracelulares integran redes de comunicación intercelular al transportar un subconjunto específico de proteínas, ácidos nucleicos como el ARNm y el microARN (miARN), y lípidos, todos específicos para las condiciones fisiológicas o patológicas de su célula de origen y que, al parecer, son cargados a las vesículas extracelulares de una forma determinada en lugar de constituir componentes aleatorios (5). Así, las vesículas extracelulares permiten el intercambio de información genética a distancia mediante el transporte de ácidos nucleicos, particularmente los miARN, que sobresalen entre las diferentes estructuras y estrategias que tienen las células para comunicarse (6).

El interés por el estudio de estas vesículas ha aumentado en la última década, como lo evidencia el auge de publicaciones que estudian su biogénesis, contenido y efectos biológicos, empezando por el estudio de los exosomas y luego ampliándose a otras vesículas extracelulares (7,8), así como la creación de diversas sociedades y recursos. El estudio de los exosomas y otras vesículas extracelulares encierra desafíos analíticos y limitaciones técnicas debido a las características de las muestras. Aunque su desarrollo es vertiginoso, este es un campo científico relativamente joven, por lo que, al plantear proyectos de investigación y estudios de vesículas extracelulares, debe considerarse primero cuál es el estado del campo científico a nivel mundial en cuanto a su nomenclatura y clasificación, así como a las técnicas, recursos, requisitos y especificaciones de calidad, y las instituciones que regulan el campo.

Para alguien nuevo en este campo responder a esta pregunta puede ser un desafío, ya que la información disponible se encuentra dispersa y se centra en la generación de vesículas y el estudio de los efectos prometedores que se les atribuyen, sobre lo cual hay numerosas revisiones y una nomenclatura variada y, en algunos casos, imprecisa (9,10). Son menos los artículos originales que abordan aspectos experimentales y técnicos que las revisiones disponibles (11-13), y son contadas las publicaciones que presentan los requisitos mínimos para los estudios (7,14) y las consideraciones experimentales (15,16). Se encuentran diversas revisiones científicas sobre la situación actual de las técnicas y tecnologías empleadas y sus limitaciones, con recomendaciones de trabajo, pero con información fraccionada.

Por otro lado, se han creado instituciones, bases de datos, recursos bioinformáticos y directrices de trabajo producto del consenso de la comunidad científica, los cuales son usualmente ignorados o se desconocen, por lo que se incurre en errores metodológicos y se ignoran los términos y la nomenclatura oficial, lo que lleva a nombrar la población de vesículas extracelulares obtenida a partir de conceptos erróneos, o cuyo origen e identidad no se ha demostrado adecuadamente. Ello genera falta de homogeneidad y mucha confusión en los resultados reportados y conduce a

la imposibilidad de reproducirlos. En este sentido, las instituciones oficiales recomiendan términos y una nomenclatura, pero, hasta donde se pudo comprobar, no hay una publicación que recopile los términos oficiales indexados en la ontología génica y otros vocabularios controlados. En consecuencia, no siempre se consideran todos los aspectos y recursos de este campo a la hora de plantear proyectos y estudios que resulten íntegros.

Para solventar este problema, en esta actualización se presenta: primero, la situación actual, introduciendo los términos y la nomenclatura oficial definida para las vesículas extracelulares, analizando su evolución y oficialización, y haciendo recomendaciones sobre su uso; en segundo lugar, compilando la información disponible sobre clasificación de las vesículas extracelulares, técnicas disponibles para su estudio, y las instituciones, guías, bases de datos y recursos bioinformáticos que se han creado en este campo, así como proponiendo perspectivas de avance; se sintetizan, además, los requisitos mínimos y las recomendaciones propuestas a nivel mundial para el desarrollo de estudios sobre estas vesículas, exponiendo y analizando algunos de los desafíos y principales limitaciones asociadas con su estudio y correcta denominación, y se presentan los criterios para el desarrollo de estudios; y, en tercer lugar, se presenta una breve actualización sobre los estudios en instituciones colombianas, contemplando sus avances y fortalezas, analizando de forma crítica la capacidad nacional y las técnicas y tecnologías analíticas disponibles, y resaltando el interés por los estudios de vesículas extracelulares en el país (17-29).

Esta actualización pretende llamar la atención de la comunidad científica interesada en las vesículas extracelulares, y ser una guía para el planteamiento de proyectos y estudios en esta área, presentando las directrices internacionales y las técnicas, así como las limitaciones, retos y oportunidades de su estudio.

Para aquellos investigadores que se acercan por primera vez al campo de las vesículas extracelulares, o que quieran tener un panorama íntegro del área, esta es una guía que los introduce en la nomenclatura oficial, los requisitos mínimos y los criterios necesarios para el desarrollo de estudios, y presenta las técnicas disponibles y más usadas, así como los recursos desarrollados, incluidos los últimos avances científico-técnicos. Darle la debida atención a estos aspectos y al uso correcto de los términos, permitirá plantear proyectos de investigación con calidad internacional que respondan a las exigencias y recomendaciones institucionales.

Por último, el escrito está dirigido, no solo a los investigadores que trabajen con vesículas extracelulares, sino también a revisores, jurados y editores de trabajos en el área como forma de orientación general de la comunidad científica interesada en el campo de estudio de las vesículas extracelulares.

Definiciones, nomenclatura y clasificación de las vesículas extracelulares

La expresión “vesículas extracelulares” engloba un conjunto heterogéneo de partículas liberadas de forma natural por las células; están delimitadas por una bicapa lipídica y no pueden replicarse, es decir, carecen de un núcleo funcional. Según los registros en PubMed, este término fue usado por primera vez en 1971 por Aaronson, *et al.*, al estudiar su producción en un alga (30). La *International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV) respalda el uso de este nombre como el término genérico y preferente para denominar estas partículas (14). Sin embargo, en los primeros años de estudio fueron múltiples los términos

empleados para nombrar las poblaciones de estas vesículas, los cuales se asociaban con su origen tisular y con su función, por ejemplo, prostasomas (31), oncosomas (32), vesículas de matriz calcificantes (33), entre muchos otros, y los genéricos y ampliamente usados exosomas, microvesículas y ectosomas (34).

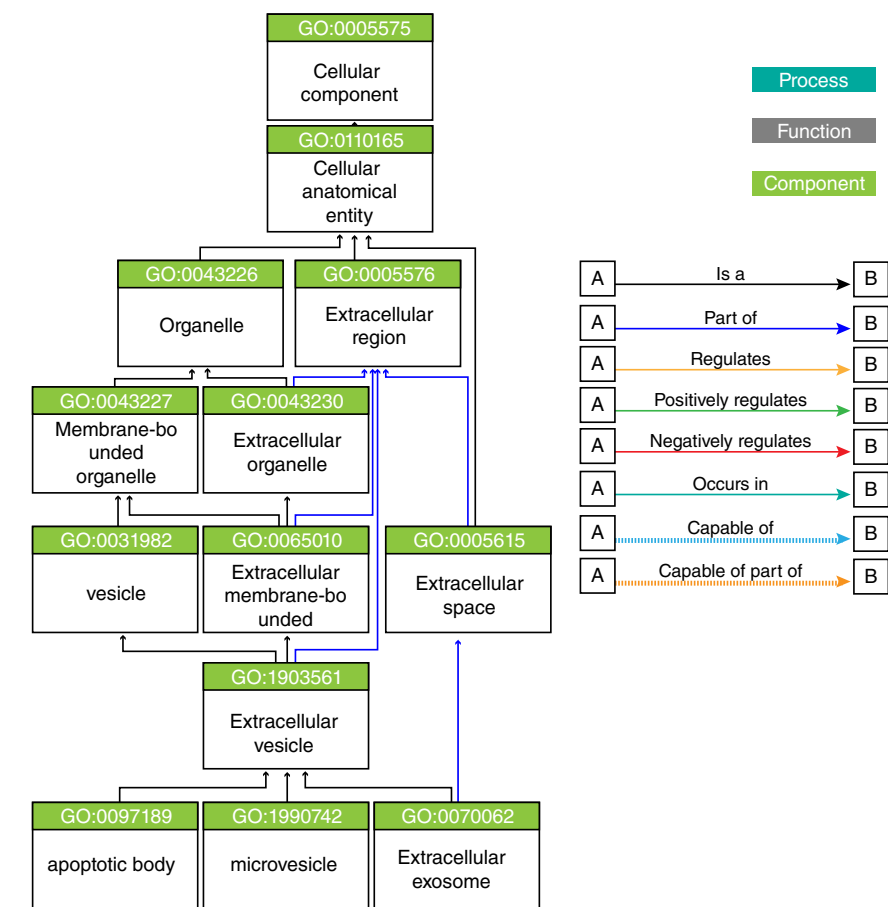
El término “exosoma” fue inicialmente empleado en 1981 por Trams, *et al.*, para nombrar las vesículas extracelulares con actividad enzimática y posible función fisiológica asociada (35), y su biogénesis fue descrita por Harding, *et al.* (36), y por Pan, *et al.* (37), al estudiar la maduración de los reticulocitos. No obstante, el rol fisiológico de estas vesículas en la presentación de antígenos solo se hizo evidente después de que Raposo, *et al.*, reportaran la liberación de exosomas por parte de linfocitos B (38), y Zitvogel, *et al.*, por parte de las células dendríticas (39). A partir de ese momento, el estudio de los exosomas suscitó un creciente interés reflejado en el aumento exponencial de publicaciones científicas, especialmente desde el 2004, como lo hicieron patente Lötvall, *et al.*, al comparar la evolución y el uso de los distintos términos en la literatura (7). Así, “exosoma” llegó a ser un término ampliamente usado en la literatura biomédica, aunque con diferentes interpretaciones, lo que condujo a un uso impreciso debido a la falta de oficialización y caracterización apropiadas (8).

Hubo un auge de artículos científicos, en los cuales se usó el término “exosomas” y, posteriormente, el de “microvesículas”. Sin embargo, a partir de la fundación de la ISEV en el 2011, estos términos han sido reemplazados progresivamente por el de “vesículas extracelulares”, un nombre genérico adoptado por consenso en la comunidad científica internacional asociada en la ISEV y cuyo empleo se generaliza cada vez más (7). Este consenso se tradujo en la posterior publicación de los requisitos experimentales mínimos en el documento *Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles* (MISEV) en el 2014 (7) y su actualización en el 2018 (14), lo cual permitió normalizar y homogenizar la nomenclatura de las vesículas extracelulares y sus diversos tipos, así como su estudio. Lo que define y autoriza un término es su introducción en los vocabularios controlados. Desde el 2014, se contemplan las vesículas extracelulares como parte de la ontología génica, con términos derivados, como los de cuerpos apoptóticos, vesículas extracelulares bacterianas, vesículas de membrana externa bacteriana, exosomas extracelulares, microvesículas, y prominosoma, siguiendo la estructura que se presenta en la figura 1 y las definiciones y sinónimos del cuadro 1 (40-42) (Gene Ontology Project, versión 2021-05-01).

En 2016, el nombre de vesículas extracelulares fue incorporado en diversos vocabularios terminológicos controlados, entre ellos, el de *Extracellular Vesicles* en el *Medical Subject Headings* (MeSH) de la *U.S. National Library of Medicine* - NLM (43), y, además, “vesículas extracelulares” se incluyó en los Descriptores en Ciencias de la Salud (DeCS) de la Biblioteca Virtual en Salud (BVS) de la Organización Panamericana de la Salud (44). Esta indexación tardía, cinco años después de la fundación de la ISEV y dos años después de la publicación del MISEV 2014, y la inclusión del término en la ontología génica, ocurrió bastante tiempo después del establecimiento de sus términos derivados, incluidos desde el 2009 en los DeCS y los MeSH como “Exosomas” / “Exosomes” y “Micropartículas Derivadas de Células” / “Cell-Derived Microparticles” (cuadro 1). Por otro lado, el término “ectosoma”, empleado en los MISEV 2018 para agrupar a las micropartículas y microvesículas (14), y definido en diversos artículos recientes (5,45), no ha sido incorporado a los DeCS y aparece como una entrada bajo el término “Cell-Derived Microparticles” en los MeSH, por lo cual su empleo es dispar.

Esta indexación tardía y espaciada pudo repercutir en una falta de homogenización y precisión de los términos usados en los artículos publicados hasta ese momento, en los que se empleaba el término “exosoma” de forma general, y en algunos casos sin demostrar su origen endosomal ni sus características específicas, contrario a la posición adoptada por la ISEV y sus recomendaciones.

Además, en un esfuerzo mancomunado, varios investigadores del área actualizaron la ontología génica con énfasis en el ARN extracelular (exARN), lo que se refleja actualmente en esta base de conocimiento y en su clasificación de los términos asociados con las vesículas extracelulares y los exARN (46). En ese documento, Cheung, *et al.*, proponen que cualquier término futuro agregado a la ontología génica, que represente los tipos de vesículas que forman parte de la región extracelular, se clasifique automáticamente como 1903561 “vesícula extracelular”. Sin embargo, los tamaños propuestos por los autores para definir cada tipo de estas vesículas difieren de los establecidos actualmente en la ontología génica (cuerpo apoptótico ≈50-5000 nm, exosoma ≈40-200 nm, microvesícula ≈50-1000 nm), lo que demuestra la falta de consenso que todavía existe en cuanto al tamaño de cada subtipo de vesículas extracelulares (cuadros 1 y 2).



QuickGO - <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO>
Extraído de la base de conocimiento de ontología génica, versión 2021-05-01 (43.987 términos de ontología génica | 8.006.434 anotaciones | 1.574.201 productos genéticos | 4990 especies) (40-42)

Figura 1. Gráfico de ontología génica para "vesícula extracelular" y algunos términos derivados

Cuadro 1. Comparación de los términos indexados en algunos vocabularios o diccionarios controlados

VC	Término	Definición	Año de indexación
GO	<i>Extracellular vesicles</i> / Vesículas extracelulares	Cualquier vesícula que es parte de la región extracelular Sinónimo: micropartícula	2014
	<i>Apoptotic body</i> / Cuerpo apoptótico	Una vesícula que contiene partes de una célula moribunda. Los cuerpos apoptóticos pueden variar en tamaño, de 0,8 a 5 µm (definición actualizada en el 2016). Sinónimos: vesícula apoptótica, ampolla apoptótica	2011
	<i>Extracellular exosome</i> / Exosoma extracelular	Una vesícula que se libera en la región extracelular por fusión de la membrana endosómica limitante de un cuerpo multivesicular con la membrana plasmática. Los exosomas extracelulares, también llamados simplemente exosomas, tienen un diámetro de aproximadamente 40-100 nm (definición actualizada en el 2016). Sinónimos: exosoma, exosoma vesicular extracelular	2015
	<i>Microvesicle</i> / Microvesícula	Una vesícula extracelular liberada de la membrana plasmática y que varía en tamaño de aproximadamente 100 nm a 1.000 nm (definida en el 2015). Sinónimos: ectosoma, microvesícula extracelular, vesícula de desprendimiento o <i>shedding</i>	2015
MeSH - DeCS	<i>Extracellular vesicles</i> / Vesículas extracelulares	Estructuras limitadas por membrana derivadas de membranas celulares y del material citoplasmático, y liberadas al espacio extracelular. Circulan en el fluido extracelular y con la sangre periférica en la microvasculatura donde las células, mucho más grandes, no pueden circular, lo cual afecta una variedad de procesos de comunicación intercelular.	2016
	<i>Exosomes</i> / Exosomas	Tipo de vesícula extracelular que contiene ARN y proteínas, y se secreta en el espacio extracelular por exocitosis cuando los cuerpos multivesiculares se fusionan con la membrana plasmática	2009
	<i>Cell-derived microparticles</i> / Micropartículas derivadas de células	Vesículas extracelulares generadas por el derramamiento de ampollas (sic) de membrana celular	2009

VC: vocabulario controlado; GO: *Gene ontology*; MeSH: *Medical Subject Headings*; DeCS: Descriptores en Ciencias de la Salud
 Información tomada de (40,41,43,44) y (Gene Ontology Project, versión 2021-05-01)

Cuadro 2. Comparación de las características de algunos tipos de vesículas extracelulares

Características	Exosomas	Ectosomas	Microvesículas	Cuerpos apoptóticos
Mecanismo de generación	Exocitosis de MVB	Brote de la membrana plasmática	Brote de la membrana plasmática	Liberación de vesículas de células apoptóticas
Tamaño	40 - 100 nm ^a 50 - 100 nm ^b	100 - 200 / 500 nm, según publicación ^b	100 - 1000 nm ^{a, b}	0,8 - 5 µm ^a 1 - 5 µm / 50 -500 nm ^b
Composición lipídica	Enriquecidas en colesterol, esfingomielina y ceramida; contienen balsas lipídicas; exponen fosfatidilserina ceramida grande.	Enriquecidas en colesterol y diacilglicerol; exponen fosfatidilserina y ceramida.	Exponen fosfatidilserina.	ND
Marcadores proteicos	Tetraspaninas (CD81, CD63, CD9, CD61), Alix, LAMP1 y Tsg101; unión a anexina V	<i>CR1, TyA, C1q, enzimas proteolíticas. No CD63.</i>	Integrinas, selectinas y ligando CD40; unión a anexina V, factores tisulares y marcadores específicos celulares	Unión a anexina V, contenido de ADN

ND: no determinado

^a definida en GO

^b definida según la literatura

Basado en: (45,47,48) (Gene Ontology project, versión 2021-05-01)

Con base en el conocimiento actual, las vesículas extracelulares generadas por células eucariotas se pueden clasificar en: exosomas, microvesículas/ectosomas y cuerpos apoptóticos, según su origen o biogénesis. Los exosomas son definidos por su origen endosomal, y los ectosomas y microvesículas como derivados de la membrana plasmática. En tanto que los cuerpos apoptóticos se forman de células apoptóticas. Asimismo, las vesículas extracelulares se pueden describir por su tamaño y composición molecular. En diversas publicaciones se comparan estos tipos de vesículas en función de su tamaño, sedimentación, densidad en sacarosa, apariencia por microscopía electrónica, composición química, y mecanismo

de generación, entre otras características (45,47,48). Sin embargo, aún no se ha llegado a un consenso en cuanto a marcadores específicos de cada tipo de vesícula extracelular, ya que asignar un tipo a una ruta de biogénesis en particular es difícil, a menos que se detecten en el momento de su liberación mediante técnicas de observación celular en vivo; no obstante, se cuenta con diversas moléculas que permiten describir cada subtipo diferenciando entre ectosomas y microvesículas (cuadro 2).

A diferencia del estado inicial, actualmente se cuenta con una nomenclatura definida en las bases de conocimiento y en los vocabularios controlados, lo que permite la homogenización y el uso preciso de los términos por parte de los investigadores del área. Sin embargo, aún se presentan algunas inconsistencias, pues no se adoptan uniforme y rápidamente dichos términos controlados. Por ejemplo, algunos investigadores usan el término “microvesículas” para referirse a las vesículas extracelulares grandes (>200 nm) y el de “exosoma” para las pequeñas (≈30 nm a 200 nm), lo cual es incorrecto, ya que desconoce su origen y definición biogénica. Esta definición basada en el tamaño, aunque práctica, es mecánicamente estéril, y no ha sido aprobada por las autoridades científicas. Así, se debe promover el uso correcto de los términos oficiales en los documentos y estudios del área, concordante con las técnicas y metodologías empleadas, como se ilustra más adelante. A medida que evolucione el campo y aumente el conocimiento científico, se esperan marcadores y características adicionales que permitan diferenciar y definir de forma más precisa términos actualmente sinónimos, como microvesículas y ectosomas, entre otros.

Organización y evolución del campo a nivel internacional, creación de instituciones, criterios para desarrollar estudios y desarrollo de recursos

El auge de los estudios en el campo de los exosomas y otras vesículas extracelulares, y la falta de un consenso y rigor que permitiera su reproducibilidad, motivaron la creación de un conjunto de sociedades nacionales, y de una sociedad internacional que ha liderado la creación de recursos, espacios de formación y divulgación e iniciativas de estandarización. A nivel internacional, existe la *International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV) (<https://www.isev.org/>) fundada en el 2011 por investigadores interesados en su estudio, incluidos el de los exosomas y microvesículas. Nació a raíz del *International Workshop on Exosomes* y, en el 2012, celebró su primera reunión y realizó el lanzamiento de la revista oficial de la Sociedad: *Journal of Extracellular Vesicles* (JEV) (49).

En ese mismo año, se estableció la *American Society for Exosomes and Microvesicles* (ASEMV) (<https://www.asemv.org/>), la cual colabora con otras organizaciones científicas y con los *National Institutes of Health* (NIH) de Estados Unidos en la detección de oportunidades en el campo, al tiempo que patrocina conferencias científicas; su ámbito incluye también los estudios sobre las vesículas extracelulares, los exARN y las vesículas de membrana externa bacteriana. La revista oficial de la ASEMV, la *Exosomes and Microvesicles* (EXMV), fue lanzada en el 2013; esta se orienta a la aplicación de exosomas y microvesículas en el mantenimiento de la salud humana, y el desarrollo de estrategias para diagnosticar y combatir mejor las enfermedades (50).

Asimismo, se han creado diversas sociedades nacionales y grupos en Europa: la *UK Society for Extracellular Vesicles* (UKEV) (<https://www.ukev.org.uk/>) a partir del Foro UKEV realizado en el 2014; la *German Society of Extracellular Vesicles* (GSEV) (<https://www.extracellular-vesicles.de/>), creada

en el 2017; el grupo español de innovación e investigación en vesículas extracelulares (GEIVEX) (<https://www.geivex.org/>) en el 2012; la *Italian Society for Extracellular Vesicles* (EVIta), la *Austrian Society for Extracellular Vesicles* (ASEV), la *Norwegian Regional Research Network on Extracellular Vesicles* (RRNEV) y la *French Society of Extracellular Vesicles* (FSEV). En el resto del mundo, se han creado la *Japanese Society of Extracellular Vesicles* (JSEV), la *Society for Clinical Research and Translation of Extracellular Vesicles Singapore* (SOCRATES) y la *Brazilian Society for Extracellular Vesicles* (BSEV), entre otras.

Ante la necesidad de establecer una nomenclatura con términos y definiciones precisas, así como criterios para caracterizar las vesículas extracelulares apropiadamente, la ISEV ha organizado seminarios y talleres que reúnen a expertos científicos e investigadores en el campo para discutir cómo abordar las lagunas existentes en el conocimiento y las técnicas disponibles para afrontar tales vacíos. Los talleres iniciales sirvieron como antesala a la publicación de los primeros artículos de posición de la ISEV y de las guías MISEV. En el taller del “Seminario de Investigación ISEV: Análisis y función del ARN en VE (evRNA)” del 2012, sesionaron mesas de discusión en las que se proporcionó un marco basado en la evidencia para el aislamiento y análisis de vesículas extracelulares, la purificación y el análisis de moléculas de ARN asociadas, y la ingeniería molecular de las vesículas extracelulares para intervenciones terapéuticas (51). Las conclusiones de estas mesas se publicaron como artículos de posición en el 2013, uno sobre tecnologías de análisis de evRNA y su análisis bioinformático (52), y otro en que se abordaba la estandarización de la recolección de muestras, el aislamiento y los análisis de vesículas extracelulares (13). Este último incluye una revisión de los materiales publicados y la experiencia de los autores, y hace énfasis en la necesidad de estandarizar el manejo de muestras, los controles normativos apropiados y la evaluación de las técnicas de aislamiento y análisis para facilitar la comparación de resultados.

Producto de estas discusiones, en el 2014, la ISEV publicó los requisitos experimentales mínimos de estudios, MISEV 2014, donde se establecieron estándares para el estudio de las vesículas extracelulares, principalmente los exosomas, presentando técnicas para caracterizar la muestra y estableciendo la necesidad de marcadores apropiados que permitan declarar la presencia de dichas vesículas en los aislamientos, así como recomendaciones sobre los controles adecuados para los estudios de su actividad funcional (7).

Para ofrecer una guía más detallada, que reflejara un mayor consenso de la comunidad científica y se nutriera de la experiencia de otros autores, en el 2015 se llevó a cabo la primera gran encuesta detallada de las prácticas mundiales usadas hasta el momento para el aislamiento y la caracterización de las vesículas extracelulares (10), cuyos resultados influyeron en la posición oficial de la ISEV y llevaron a la actualización de las guías MISEV publicada en noviembre del 2018 (14). Además de facilitar la reproducibilidad de los ensayos y análisis y avanzar en la estandarización de las técnicas empleadas, en esta nueva guía se consideran los avances y experiencias del campo y se actualizan las recomendaciones basadas en la evidencia científica disponible en el momento.

Cabe resaltar que la guía MISEV 2018 no propone marcadores moleculares para caracterizar específicamente cada subtipo de vesícula extracelular, desestimula el uso del término “exosoma” eliminando las recomendaciones

para caracterizar exosomas y las proteínas que se espera encontrar en estos, y recomienda el empleo de “vesículas extracelulares” como nombre genérico, a diferencia de la guía MISEV 2014, en la cual algunas sugerencias estaban sesgadas por una visión de las vesículas extracelulares “orientada a los exosomas”. Este cambio de criterios y recomendaciones refleja una evolución en la comprensión de los subtipos de vesículas extracelulares y sus asociaciones con otras entidades, al tiempo que busca aumentar el rigor y la reproducibilidad de los estudios que las involucran.

Para responder a la necesidad de transparencia y rigor, incrementar la reproducibilidad y facilitar la estandarización de la investigación sobre vesículas extracelulares, se estableció un consorcio internacional que, en el 2017, desarrolló la base de conocimiento EV-TRACK (<http://evtrack.org/>), repositorio en línea que centraliza los datos con base en las características de las vesículas extracelulares y los métodos empleados siguiendo las recomendaciones de las guías MISEV, e incluye una herramienta de búsqueda de artículos científicos y de material sin publicar destinada a la consulta de revisores y editores.

La plataforma EV-TRACK tiene siete características que ayudan a los investigadores a:

1. subir la información de sus experimentos,
2. asignar la métrica EV-METRIC a cada experimento,
3. consultar la base de datos de artículos,
4. entrenarse y familiarizarse con los parámetros experimentales más relevantes de las guías MISEV,
5. buscar nuevos métodos al permitir las anotaciones de la comunidad,
6. catalogar sistemáticamente las características bioquímicas y físicas de las vesículas extracelulares que dan información sobre su biología, y
7. incluir a la comunidad como consorcio y permitir la participación de los usuarios en las decisiones futuras (53).

Cuenta, además, con la EV-METRIC, una métrica diseñada para representar el grado de transparencia en el reporte de parámetros experimentales, la cual está habilitada para el envío de datos previos al sometimiento de un manuscrito y como herramienta de búsqueda de artículos publicados. La base de datos de artículos se puede consultar según las características y los parámetros de los estudios, como se desglosa en el cuadro 3; los parámetros EV-METRIC son una lista de chequeo. La consulta del material publicado permite realizar metaanálisis de experimentos y seguir la situación actual del tema. Además, la herramienta destinada a revisores y editores incluye una lista de chequeo orientada a garantizar la transparencia de los aspectos metodológicos de los experimentos, la cual consta de 115 parámetros para catalogar características específicas de los métodos de aislamiento y caracterización de las vesículas extracelulares, presentada en su tabla suplementaria 1 (53).

La plataforma EV-TRACK es una gran herramienta para investigadores del área de las vesículas extracelulares y de otros campos, ya que las anotaciones de su base de datos, las opciones de consulta y la información presentada, facilitan la interpretación y replicación de experimentos publicados en artículos, y centraliza la información sobre la biología y la metodología de las dichas vesículas. Con esta herramienta se puede filtrar por el tipo de aislamiento y caracterización de las vesículas extracelulares y

los parámetros EV-METRIC reportados, y obtener las propiedades biofísicas y moleculares de las vesículas extracelulares. Esto permite que los usuarios evalúen la calidad de la preparación de la muestra de vesículas extracelulares y los datos correspondientes obtenidos; sin embargo, un valor elevado de EV-METRIC solo implica que los datos publicados están bien anotados.

Estos parámetros fueron acordados por el consorcio de EV-TRACK como indispensables para una interpretación inequívoca que permita una reproducción independiente de los experimentos. Aun cuando los investigadores desconozcan o no sigan las guías MISEV, EV-TRACK pretende entrenarlos en el uso de la métrica EV-METRIC y estimular la puesta en práctica de las guías MISEV. Este recurso está en continuo desarrollo y los parámetros incluidos pueden ser modificados, aumentados o refinados con el avance del campo. Por ejemplo, en el caso del análisis de partículas, deben considerarse la pureza y la calidad del vehículo empleado para suspender las vesículas extracelulares, y usarlo como control de partículas durante los análisis, específicamente para los análisis de rastreo de nanopartículas, así como el medio de cultivo para el caso de sobrenadantes de cultivos celulares. No obstante, la clave de su éxito reside en su implementación generalizada por parte de la comunidad científica.

Cuadro 3. Opciones de consulta y parámetros incluidos en EV-TRACK

Opciones de consulta habilitadas en EV-TRACK			
Especie	múltiples: 12 mamíferas y 59 no mamíferas		
Tipo de biofluido	sobrenadante de cultivo celular, plasma sanguíneo, suero, orina, leche, semen, saliva, ascitis, fluido cerebroespinal, fluido de lavado broncoalveolar		
Objetivo del estudio	biogénesis/clasificación, biomarcador, función, ómica y técnica		
Método de separación	comercial, cojín de densidad (density cushion), gradiente de densidad, ultracentrifugación diferencial, filtración, inmutafinidad, cromatografía de exclusión de tamaño, ultrafiltración, microfluidos		
Método de análisis proteico	ELISA, citometría de flujo, microscopía inmunoelectrónica, proteómica, western blot		
Método de análisis de partículas	fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico, microscopía de fuerza atómica, dispersión de luz dinámica, microscopía electrónica, citometría de flujo de alta resolución, análisis de rastreo de nanopartículas, detección de pulso resistivo sintonizable		
Parámetros EV-METRIC:	proteína enriquecida en VE	proteína no enriquecida en VE	análisis cualitativo y cuantitativo
	imágenes de microscopía electrónica	gradiente de densidad	densidad de VE
	especificaciones de ultracentrifugación	especificaciones de anticuerpos	preparación del lisado
Parámetros experimentales relacionados con la caracterización de VE			
Análisis de proteínas	Proteínas enriquecidas en VE: análisis de tres o más proteínas enriquecidas en VE		
	Proteína no enriquecida en VE: evaluación, al menos, de una proteína no enriquecida en VE		
	Características específicas del anticuerpo: clon del anticuerpo / número de referencia y dilución *		
	Preparación de lisado: composición de la solución tampón de lisis o descomposición usada, o número de referencia para soluciones tampón de descomposición usadas *		
Análisis de partículas	Análisis cualitativo y cuantitativo: implementación de métodos cualitativos (por ejemplo: EM, AFM) y cuantitativos (por ejemplo: NTA, DLS, TRPS, citometría de flujo de alta resolución). Para el método cuantitativo, se espera informar la concentración de partículas.		
	Imágenes de microscopía electrónica: inclusión de una imagen de microscopía electrónica de campo amplio y de primer plano		
Parámetros experimentales relacionados con la separación de VE			
Gradiente de densidad: gradiente de densidad realizado al menos como validación si los resultados descritos se atribuyen a las VE			
Densidad de VE: reporte de la densidad obtenida de las VE			
Características específicas de ultracentrifugación: informe de RCF o fuerzas g, duración de los pasos de ultracentrifugación y tipo de rotor +			

* Pueden considerarse "no aplicables", dependiendo de los métodos de caracterización implementados en un estudio en particular.

+ Pueden considerarse "no aplicables", dependiendo del método de separación implementado en un estudio particular. Información disponible en: <http://evtrack.org/>

Por otro lado, y gracias a la gran cantidad de resultados obtenidos en el área, se han desarrollado diversas bases de datos de las moléculas identificadas en las vesículas extracelulares, entre ellas, EVpedia Exocarta, Vesiclepedia, y EVmiRNA. Creadas a modo de repositorios antes de la creación de EV-TRACK, están basadas en la web y son de acceso libre. EVpedia condensa datos provenientes de experimentos de alto rendimiento, como análisis proteómicos de vesículas extracelulares derivadas de células procariotas y eucariotas (54,55) (<http://evpedia.info/>); infortunadamente, está inactiva actualmente.

El laboratorio del profesor Mathivanan desarrolló ExoCarta y Vesiclepedia, las cuales compilan el ARN, las proteínas, los lípidos y otros metabolitos, identificados en exosomas de múltiples organismos (56,57) (<http://www.exocarta.org/>) y en diversos tipos de vesículas extracelulares (58,59) (<http://microvesicles.org/>), respectivamente. Ambas bases tienen curaduría manual y se alimentan de estudios publicados y sin publicar o en prensa, principalmente estudios proteómicos y lipidómicos, que permiten buscar y descargar el contenido sobre vesículas extracelulares con base en criterios de búsqueda, como nombre del gen, miARN, organismo, tipo de contenido y de muestra, y, en el caso de Vesiclepedia, tipo de vesícula. Asimismo, las dos bases de datos muestran las técnicas empleadas en cada estudio e hipervínculos al registro en PubMed. Exocarta incluye una lista de verificación del cumplimiento de los estándares definidos por la ISEV y, Vesiclepedia, el código y el vínculo para el registro en EV-TRACK y el porcentaje de EV-METRIC. Sin embargo, estas bases de datos presentan algunos vínculos rotos y, como toda base de datos, requieren de actualización permanente.

Se han creado, además, recursos enfocados en el ARN extracelular (exARN), libre o asociado con las vesículas extracelulares. El *Extracellular RNA Communication Consortium* (ERCC) se creó como una iniciativa de las sociedades ASEMV e ISEV, y agrupa a los investigadores para abordar los problemas críticos en el campo de investigación del exARN. Es financiado como una iniciativa del fondo común de los NIH, y cuenta con un portal de investigación de exARN donde se dispone de recursos, proyectos y publicaciones (<https://exrna.org/>) (60); además, incluye la base de datos exRNA Atlas, un repositorio de perfiles de exARN derivados de la secuenciación de ARN pequeños y qPCR de biofluidos humanos y de ratón, que permite seleccionar, ver y descargar los datos y visualiza el cumplimiento de los estándares de calidad de datos del ERCC (<https://exrna-atlas.org/>) (61). Asimismo, se cuenta con la base de datos EVmiRNA, en la cual se reúne el perfil de los miARN obtenidos de las vesículas extracelulares (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/EVmiRNA>) (62).

Además, en el 2015, se desarrolló la herramienta bioinformática FunRich, que permite hacer análisis de enriquecimiento funcional del set de datos sobre vesículas extracelulares y generar múltiples representaciones gráficas de ellos. Es una herramienta de acceso abierto para analizar el conjunto de datos 'ómicos' de múltiples tipos y organismos (<http://www.funrich.org/>) (63). Esta herramienta fue mejorada con base en los aportes y sugerencias de la comunidad científica y, actualmente, está integrada como complemento de Exocarta y Vesiclepedia para ayudar al usuario a analizar por bioinformática los datos depositados en dichas bases. La versión actual (3.1.3) permite realizar enriquecimientos de miARN y descargar información automáticamente de las bases de datos asociadas (64); y se encuentra en constante desarrollo gracias a que involucra a los usuarios en el desarrollo

del *software*, propiciando un trabajo conjunto, favoreciendo el desarrollo de una herramienta de análisis integral y respondiendo de esta forma a las necesidades de la comunidad científica.

En cuanto a los recursos educativos, la ISEV lanzó en el 2016 su primer curso en línea para estudiantes y principiantes en el campo de las vesículas extracelulares (65). Se trata de un curso masivo ofrecido de forma gratuita bajo el nombre de “Basics of Extracellular Vesicles” ofrecido por la Universidad de California en Irvine a través de la plataforma Coursera (<https://es.coursera.org/learn/extracellular-vesicles>). En Europa, existe la red TRAIN-EV (*Training in Extracellular Vesicles*), que reúne a un grupo de sociedades y científicos europeos, coordina proyectos multidisciplinarios e intersectoriales para crear sinergias entre las actividades de investigación sobre vesículas extracelulares, desarrolla un programa de entrenamiento en investigación cuyo objetivo es proporcionar una capacitación excelente e integrada a jóvenes investigadores (*Early Stage Researchers*) y, simultáneamente, adelanta investigaciones innovadoras para abordar las brechas del campo y generar nuevo conocimiento. La TRAIN-EV se creó en el 2017 como un megaproyecto financiado por el programa Horizonte 2020 de la Unión Europea y, hasta el momento, ha vinculado a 16 jóvenes investigadores que desarrollan proyectos que abordan desde aspectos técnicos, comparación de plataformas, desarrollo de dispositivos, materiales de referencia biológica y herramientas bioinformáticas, hasta caracterización y aspectos funcionales y de relevancia biológica (<http://train-ev.eu/>). Ello demuestra el desarrollo de este campo científico y el interés de sus miembros en superar los retos y desafíos experimentales inherentes a él.

Retos y requisitos mínimos para el desarrollo de estudios

Los llamados “exosomas” son las vesículas extracelulares que han recibido mayor interés. Sin embargo, usualmente son difíciles de reconocer ya que, una vez secretadas, se confunden con las otras vesículas secretadas por rutas diferentes, siendo compleja su identificación tal como son definidos: por su origen celular o ruta de biogénesis. Esto se debe a que sus propiedades biofísicas (cuadro 2), los cuales suelen estar presentes en las preparaciones que pretenden aislar únicamente exosomas (66). Por lo tanto, es vital considerar las condiciones experimentales preanalíticas y de aislamiento de las vesículas extracelulares, y caracterizarlas adecuadamente.

A pesar del origen intracelular definido para cada población de vesículas extracelulares descrita, aún no hay marcadores específicos de cada una de estas poblaciones que permita distinguir entre ellas una vez secretadas. Se ha visto que diversos marcadores que inicialmente se consideraban como específicos para exosomas, también se presentan en vesículas extracelulares de otros orígenes.

En un estudio en el que se inhibió la Rab27a, una GTPasa pequeña necesaria para la secreción de exosomas, hubo un descenso en la secreción vesicular de algunos marcadores convencionales de exosomas, incluidas la tetraspanina CD63, las proteínas implicadas en la formación de endosomas multivesiculares Tsg101 y Alix, y la proteína de choque térmico Hsc70, pero no así de otros marcadores como la tetraspanina CD9 y la proteína asociada con la membrana periférica Mfge8. La CD9 y la Mfge8 se encontraron en otras vesículas extracelulares diferentes a exosomas y se vieron, al menos, dos poblaciones distintivas de vesículas extracelulares después del aislamiento por ultracentrifugación diferencial (67).

Este trabajo reveló la heterogeneidad de las preparaciones de vesículas comúnmente conocidas como exosomas, y que el protocolo de ultracentrifugación diferencial empleado hasta el momento para aislarlos (68) purifica concomitantemente vesículas de otros orígenes, por lo que la fracción de vesículas extracelulares obtenida a 100.000g corresponde, en realidad, a vesículas extracelulares pequeñas (*small EV*, sEV), incluidos los exosomas, por lo que se debe comprobar su enriquecimiento en estos.

Más recientemente, en un análisis proteómico cuantitativo de poblaciones de vesículas extracelulares obtenidas mediante diversos métodos específicos, se vio que los marcadores que se pensaba que eran exclusivos de los exosomas, como las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, MHC, de clases I y II, la flotilina, la actina, la Hsc70/Hsp73 de expresión constitutiva y la Hsp70/Hsp72 inducible, estaban presentes de forma similar en todos los tipos de vesículas extracelulares y, por lo tanto, no podían considerarse marcadores específicos de exosomas ni de vesículas extracelulares pequeñas (aisladas a 100g); asimismo, se confirmó que la población de vesículas extracelulares pequeñas era una mezcla de subpoblaciones de exosomas y vesículas extracelulares no exosomales y que los marcadores de exosomas anexina XI, V y VI, ADAM10, ACE, EHD4 y flotilina, independientemente de estar asociados o no con una tetraspanina, realmente eran genéricos de las vesículas extracelulares pequeñas; también, se estableció que la tetraspanina CD63, empleada para definir y aislar exosomas de vesículas extracelulares pequeñas, se presentaba en las grandes (69). Así, es necesario emplear más de un marcador y considerar las condiciones preanalíticas y analíticas de aislamiento empleadas, pues son las que determinan el tipo de vesículas extracelulares que se va a obtener.

Por otro lado, en los últimos años, se ha desarrollado un gran número de técnicas para el aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares. Sin embargo, la estandarización de varias de ellas es escasa, lo que conduce a que los cambios en los protocolos generen conjuntos de vesículas extracelulares diferentes y de calidad variable, prácticas inadecuadas que llevan a afirmaciones incorrectas por el desconocimiento de la técnica y la naturaleza de la matriz y las vesículas. En últimas, el reporte incompleto de las condiciones experimentales empleadas, la desatención de algunas condiciones o la omisión de algunos pasos y análisis, conducen a la falta de reproducibilidad. Para superar estos retos y dificultades, nacen las guías MISEV, ya presentadas anteriormente.

La guía MISEV 2014 proporcionaba recomendaciones sobre los métodos experimentales y la información mínima requerida en la presentación de informes; es un primer paso hacia la homogenización y estandarización en tres áreas clave: aislamiento y purificación, caracterización y estudios funcionales de vesículas extracelulares (7). En la guía MISEV 2018 se validan algunas de las primeras recomendaciones y se las amplía gracias al avance en el conocimiento. Asimismo, se introducen nuevas advertencias y aspectos, por ejemplo, la cuantificación durante los pasos de caracterización y el análisis de la topología de los componentes asociados con las vesículas extracelulares; además, se elimina la referencia a “exosomas” y las proteínas esperadas o no en ellos a favor del término genérico de “vesículas extracelulares”, definiendo los subtipos con base en sus características físicas y bioquímicas y la fuente o condición de origen (14). En el cuadro 4 se presentan las principales recomendaciones y una comparación de estas guías.

Cuadro 4. Comparación de las recomendaciones de MISEV 2014 y de MISEV 2018

	Principales recomendaciones de MISEV 2014		Actualización en 2018
Aislamiento / purificación de VE	No existe un único método de aislamiento óptimo, así que elija en función de las aplicaciones posteriores y la pregunta científica.		Alta recuperación, baja especificidad: estuches de precipitación basados en polímeros, filtros de centrifuga con cut-off de bajo peso molecular sin pasos adicionales de separación, y ultracentrifugación de alta velocidad sin pasos adicionales de separación Recuperación intermedia, especificidad intermedia: ultracentrifugación diferencial con tiempos y velocidades intermedios incluyendo o no pasos de lavado, cromatografía de exclusión por tamaño, filtros de centrifuga de alto peso molecular como paso inicial, columnas de afinidad de membrana y filtración de flujo tangencial Baja recuperación, alta especificidad: filtración, gradiente de densidad, afinidad
	Informe todos los detalles de los métodos para permitir la reproducibilidad.		Depositar los detalles experimentales con EV-TRACK. Esta base de conocimientos facilita la presentación de informes sobre métodos.
			Algunos protocolos, incluidos los asociados con estuches comerciales, pueden generar poblaciones de VE unidas o mezcladas con los componentes introducidos. Al realizar experimentos funcionales, incluir controles de procedimiento y aumentar la separación de las VE
Caracterización de VE	Caracterización general. Mostrar:	a) Mínimo tres marcadores proteicos positivos de VE, incluido al menos uno transmembrana /proteína unida a lípidos, y una proteína citosólica b) Al menos un marcador de proteína negativo	Categorías adicionales de proteínas por considerar para la caracterización: a) marcadores proteicos positivos de VE, asociados a la membrana y al citosol b) marcadores proteicos negativos (control de pureza) c) marcadores específicos de un subtipo de VE d) proteínas extracelulares solubles con actividad funcional
	Caracterización de vesículas individuales. Utilice dos técnicas diferentes y complementarias, como:	a) microscopía electrónica o de barrido por sonda (mostrar tanto campo amplio como cercano) b) seguimiento de partículas individuales	
			Describir cuantitativamente tanto la fuente como la preparación de VE Análisis topológico de los componentes asociados con las VE, al menos para aquellos con una función dada asociada con VE
Actividad biológica asociada a VE	Debería incluir:		Adicional: comparación cuantitativa de la actividad del medio condicionado o biofluido 1) antes, 2) después de la eliminación de las VE, y 3) de las VE en sí, teniendo en cuenta que la fracción de VE puede incluir materiales aislados concomitantemente o contaminantes. Control sugerido adicional: comparación cuantitativa de la actividad de los subtipos de VE deseados contra los "descartados"
	a) Estudios de dosis-respuesta		
	b) Controles negativos o background del proceso para descartar la influencia de los componentes del suero u otros posibles contaminantes		Para los biofluidos, controles negativos de las funciones asociadas con la enfermedad = fluidos de donantes sanos, sin tratar o de otro tipo adecuado
	c) Controles para evaluar la influencia de componentes solubles o macromoleculares no-VE		Realizar ensayos funcionales después de separaciones rigurosas, comparando las fracciones VE y no VE para identificar qué proporción de actividad está asociada con cada fracción (en caso de que no sean VE)
	* c-i) Gradientes de densidad u otro método para mostrar que la actividad es intrínseca a la VE, no solo asociada		
	c-ii) Remoción de VE para reducir la actividad		
	c-iii) Marcación de VE o celular (ej.: marcado fluorescente, con interpretación cuidadosa)		

* Una de estas opciones (7,14)

Es necesario insistir en que se debe nombrar adecuadamente cada subtipo de vesículas extracelulares aisladas según las definiciones oficiales, esto es, la ruta de biogénesis que las originó. Sin embargo, rastrear las vesículas aisladas hasta su ruta de biogénesis es difícil en el caso de cultivos celulares y, por ahora, es imposible en el caso de fluidos biológicos obtenidos de sistemas vivos, ya que, una vez son secretadas las vesículas de interés, se mezclan con otros tipos de vesículas que pueden ser aisladas concomitantemente en las preparaciones y, como ya se explicó, no existe una forma inequívoca y general de distinguirlas con base en sus propiedades biofísicas (cuadro 2) o en su contenido molecular únicamente. Esto, sumado a los pocos marcadores para caracterizar y definir adecuadamente cada subtipo vesículas, dificulta la definición exacta de aquellas que se aíslan.

Para superar dicho escollo, en la guía MISEV 2018 se propone que la expresión "vesículas extracelulares" sea usada como una base sobre la cual se añadan progresivamente detalles físicos y moleculares para designar cada población y subtipo, indicando su origen, condiciones de aislamiento, tamaño y los marcadores positivos o negativos a medida que se avanza en su caracterización (14). Por ejemplo, la denominación "sEV tumoral 100K CD9+ CD81+ Cyt C-"; denota una población de vesículas extracelulares pequeñas, derivada de células tumorales, aislada a 100.000g, positiva para las tetraspaninas CD9 y CD81, y negativa para la proteína mitocondrial citocromo C, lo cual podría incluir exosomas y ectosomas según lo discutido previamente.

Además, las técnicas actuales permiten monitorear el ensamblaje, la producción y la secreción de las vesículas extracelulares y, por lo tanto, definir qué rutas de biogénesis están activas antes de su liberación lo cual permite inferir los tipos que se espera aislar y contribuye a su caracterización.

En este trabajo, no se contempló la revisión comparativa de las técnicas disponibles, ya que la literatura cuenta con diversos artículos y revisiones de este tipo que presentan y analizan técnicas de aislamiento y caracterización, incluidas, en algunos casos, consideraciones, conceptos erróneos comunes, dificultades metodológicas y referencias de su aplicación (16 66,70-73). No obstante, se resumen a continuación las técnicas disponibles, su clasificación y los aspectos clave recomendados en las guías MISEV que deben tenerse en cuenta (cuadro 4), resaltando los últimos avances.

Consideraciones para la fase preanalítica

Antes del aislamiento y caracterización de las vesículas, es necesario considerar la muestra de origen, las condiciones a las que está sometida y su almacenamiento. En general, las vesículas extracelulares se pueden aislar de medios condicionados por cultivos celulares y de fluidos biológicos, cada uno sujeto a consideraciones específicas y buenas prácticas asociadas. Se ha descrito el aislamiento de vesículas extracelulares, incluido el de exosomas y microvesículas, en fluidos tan variados como sangre, orina, leche materna, saliva, lágrimas, semen, líquido amniótico, líquido ascítico, líquido cefalorraquídeo y bilis, entre otros (34).

Por otro lado, las condiciones preanalíticas y de obtención de vesículas extracelulares dependerán de los ensayos y análisis posteriores que se quieran realizar, ya que cada uno presenta limitaciones y requisitos diferentes, y es sensible a diversos tipos de contaminantes. Un análisis proteómico basado en la espectrometría de masas es sensible a todo tipo de contaminantes proteicos, como las proteínas séricas en el caso de la sangre, y de medios condicionados

por cultivos suplementados con suero. A diferencia, la identificación de ARNm y miARN específicos mediante qPCR puede ser más tolerante a ácidos nucleicos contaminantes de otras especies (en función de la secuencia), pero no podrá discriminar entre ARN encapsulado o adherido a las vesículas o libre, a no ser que ello se controle en la fase preanalítica y de aislamiento. Por lo tanto, las consideraciones preanalíticas y los contaminantes que deban controlarse dependerán de la matriz en la que se encuentren las muestras, las vesículas extracelulares objeto de estudio y las aplicaciones posteriores.

En diversas revisiones se han centrado en la recolección, almacenamiento y manejo de la muestra, brindando consideraciones adicionales y recomendaciones para un buen trabajo experimental (13,16), tanto en fluidos biológicos, especialmente la sangre, como en medios condicionados por cultivos celulares. Los fluidos biológicos tienen necesariamente un origen celular mixto y las consideraciones se enfocan en la obtención de la muestra. En el caso de la sangre como material de partida, se puede trabajar con suero o plasma, aunque se recomienda este último, en tanto que la escogencia de los anticoagulantes dependerá de los análisis posteriores; la relación entre sangre y anticoagulante debe ser apropiada y es necesario controlar la cantidad de plaquetas residuales, ya que estas contaminan la muestra.

En el caso de los medios condicionados por cultivos celulares, las buenas prácticas incluyen garantizar la calidad del cultivo celular, incluida su identidad, la ausencia de contaminación microbiana, especialmente micoplasma, una baja tasa de muerte celular para evitar contaminación con cuerpos apoptóticos, el número de células que está condicionando el medio y por cuánto tiempo, entre otros. Si el medio de cultivo se suplementa con suero, es vital reconocer que este contiene vesículas extracelulares que van a contaminar la preparación y se deben controlar; de otra forma, los análisis posteriores estarán alterados por las vesículas extracelulares derivadas del suero.

Entre los aspectos cruciales que no siempre se garantizan o reportan en los protocolos y métodos, están la identidad celular, la viabilidad y tasa de muerte celular, la densidad celular al momento de recolectar el medio, los pasos previos al procesamiento y almacenamiento de la muestra, y el control de las vesículas extracelulares derivadas del suero. Cuando el medio se suplemente con suero, se debe indicar si este se usó o no en la obtención de las vesículas extracelulares y, si fue así, cómo se controlaron y eliminaron aquellas derivadas del suero o el lavado del cultivo entre cambios de medio.

A partir de los talleres de la ISEV y la creación en el 2017 de grupos de trabajo en vesículas extracelulares de fluidos biológicos específicos, recientemente el grupo enfocado en las vesículas extracelulares derivadas de sangre reportó los resultados de una encuesta que permite plantear una hoja de ruta para su recolección, manejo y almacenamiento, y resaltó la importancia de medir la calidad de la muestra antes del aislamiento y análisis de vesículas extracelulares (15).

Aislamiento y purificación de vesículas extracelulares

Al trabajar con vesículas extracelulares, es ineludible reconocer que los métodos actuales de aislamiento solo pueden enriquecer un determinado subtipo, sin purificarlo o aislarlo completamente. Así, en función del protocolo que se siga, las preparaciones presentarán algún grado de heterogeneidad y una potencial contaminación con otras vesículas extracelulares y su contenido o con otros materiales diferentes, como proteínas, metabolitos

y ácidos nucleicos libres (7,66,67). Por otro lado, actualmente no existe un estándar de referencia contra el cual puedan evaluarse las otras técnicas, ya que cada una se basa en principios distintos, con pros y contras, y permiten separar vesículas con diverso desempeño (7).

Considerando la capacidad de recuperación de vesículas y su especificidad, las técnicas de separación se pueden clasificar en:

1. técnicas de alta recuperación y baja especificidad, que permiten obtener una gran cantidad de material extracelular, incluyendo vesículas, proteínas y metabolitos presentes en la matriz, lo que se considera un secretoma concentrado parcial o completo;
2. técnicas de recuperación y especificidad intermedias, que permiten recuperar una población mixta de vesículas que puede estar contaminada con componentes de la matriz según los pasos de lavado empleados, y
3. técnicas de baja recuperación y alta especificidad, con las que se puede separar uno o más subtipos de vesículas en función de su tamaño, su densidad de flotación o densidad granular, sus moléculas de superficie y propiedades biofísicas como la carga superficial, con un menor contenido de componentes no vesiculares, pero en menor cantidad, principalmente porque se obtiene una población de vesículas extracelulares más específica (cuadro 4). Infortunadamente, aún no existe una técnica que satisfaga plenamente los criterios de alta recuperación y alta especificidad (7).

Los métodos basados en la centrifugación han sido los más usados en el campo (10). No obstante, presentan limitaciones como, que se aisle concomitantemente material no exosómico (incluidas las proteínas presentes en la matriz), que se produzcan daños estructurales en la membrana vesicular y que existan parámetros no estandarizados que conduzcan a variabilidad cualitativa y cuantitativa (66). Se ha visto que factores como el tipo de rotor, la fuerza g o fuerza centrífuga relativa (*Relative Centrifugal Force*) y los tiempos de centrifugación, afectan significativamente el proceso de separación de las vesículas extracelulares y, por lo tanto, la pureza y el rendimiento obtenidos, a tal grado, que es posible que los protocolos de aislamiento basados en centrifugación diferencial comúnmente recomendados no estén del todo optimizados (12).

La práctica de usar un protocolo de centrifugación común con distintos rotores, con frecuencia conduce a resultados diferentes e inadecuados, considerando que el ajuste de la duración de la centrifugación de acuerdo con los factores K del rotor es improcedente para rotores de “ángulo fijo” (74). Además, se ha visto que subtipos de vesículas extracelulares sedimentados a la misma velocidad muestran densidades de flotación diferentes. Empero, los protocolos de flotación en gradiente de yodixanol no pueden separar vesículas medianas de las pequeñas si no han sido separadas primero con otro método como la centrifugación (69).

Por lo tanto, si se quieren aislar subtipos discretos, se debe recurrir a una combinación de técnicas de separación ortogonales. En el caso de los estuches comerciales y de algunos protocolos, vesículas pueden estar potencialmente unidas o mezcladas con componentes introducidos, como anticuerpos, perlas, polímeros, etc. En el caso de ciertas técnicas de precipitación, es necesario considerar su especificidad y los potenciales efectos sobre las vesículas aisladas, lo que cobra relevancia cuando se

pretende hacer experimentos funcionales con las vesículas extracelulares aisladas, ya que se pueden presentar artefactos, se requieren pasos adicionales de limpieza y es necesario contar con los controles adecuados acordes con la estrategia empleada (7).

Como ya se mencionó, la selección de las técnicas de aislamiento y caracterización dependerá del tipo de muestra, el volumen disponible del material de partida y las aplicaciones posteriores. El aislamiento de vesículas extracelulares de fluidos biológicos complejos suele requerir más pasos y estrategias combinadas que los necesarios en el caso de medios condicionados por cultivos celulares. De forma similar, los análisis proteómicos requieren un mayor control sobre la muestra y su calidad que los análisis por citometría de flujo o qPCR.

Se han desarrollado técnicas de aislamiento promisorias que superan a las tradicionales, como las basadas en filtración de flujo tangencial (*Tangential Flow Filtration*), entre ellas, la técnica de fraccionamiento en flujo de campo de flujo (*Flow Field-Flow Fractionation*), con la que se separaron vesículas extracelulares urinarias de tipo exosoma y se analizó su lipidoma en un estudio sobre cáncer de próstata (75), y el fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4, *Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation*), con el cual se aislaron subtipos de vesículas extracelulares pequeñas de tipo exosoma y nanopartículas que luego fueron caracterizadas con base en su perfil proteómico (11).

Otra tecnología emergente es la de las plataformas basadas en microfluidos o chips de microfluidos, con las cuales se avizora el aislamiento, la cuantificación y caracterización de exosomas de forma automatizada (76). Estas cuentan con múltiples aproximaciones para analizar vesículas y otros componentes extracelulares, y permitirían avanzar en la investigación y posterior empleo de biopsias líquidas aplicadas al diagnóstico de enfermedades, pues reducen la intervención manual, los tiempos de ensayo, y la cantidad de muestra y reactivos requeridos; además, se aumenta la sensibilidad, lo cual posibilita el empleo de vesículas extracelulares en el diagnóstico y aporta al desarrollo de la medicina personalizada (72,77).

Aunque las guías MISEV se centran únicamente en técnicas de amplio uso, la del 2018 contempla nuevas técnicas desarrolladas o aplicadas en el aislamiento de vesículas extracelulares, las cuales deben verificarse a partir de la información sobre la caracterización de las obtenidas con ellas para demostrar su grado de éxito con respecto a las técnicas clásicas, como la ultracentrifugación diferencial y el gradiente de densidad. Estas tecnologías son rápidas, eficientes y permiten obtener vesículas extracelulares más puras y homogéneas que las técnicas clásicas; sin embargo, la mayor limitación actual reside en la complejidad de los dispositivos, su costo y poca disponibilidad. En el futuro, con el avance de la tecnología y el aumento de la oferta en el mercado, pueden llegar a convertirse en herramientas accesibles y de amplio uso, como fue el caso de la citometría de flujo para la clasificación de células activadas por fluorescencia FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*).

En definitiva, es posible obtener poblaciones enriquecidas en un tipo particular de vesícula extracelular, pero debe tenerse claro que no es posible aislar un subtipo con una homogeneidad o pureza del 100 % y un nivel de recuperación adecuado para desarrollar diferentes análisis y ensayos. Los investigadores deben ser conscientes del grado de heterogeneidad en la

población de vesículas extracelulares obtenida, cuya posible composición y potenciales contaminantes dependerán de las condiciones experimentales y detalles del protocolo utilizado, incluido el cultivo y la obtención de vesículas extracelulares, la viabilidad celular, los pasos previos de separación, los pasos finales de lavado, etc.

Caracterización de las vesículas extracelulares

Como se aprecia en el cuadro 4, las guías MISEV incluyen: 1) la descripción cuantitativa tanto de la fuente de vesículas extracelulares como de su preparación, 2) la caracterización de la forma general de las vesículas extracelulares, y 3) su caracterización individual.

Para la cuantificación de la fuente, se debe indicar el número de células cultivadas y los intervalos de recolección (cuando corresponda), el volumen total del biofluido de partida o el peso, volumen y tamaño del tejido en el momento de la recolección (14). Sin embargo, los parámetros apropiados varían según la fuente; así, para la orina, el volumen no sería significativo y se pueden informar otros parámetros, como la concentración de creatinina, siendo este también un parámetro para evaluar la pureza del aislamiento de vesículas extracelulares con respecto al fluido de origen.

En cuanto a la cuantificación de las vesículas extracelulares, se sugiere dar un valor global, pues no existe un único método de cuantificación perfecto, ya que ni el número total de partículas ni el de proteínas o de lípidos está asociado exclusivamente con las vesículas extracelulares: las proteínas también son solubles, las partículas pueden ser agregados de proteínas y los lípidos también están presentes en las lipoproteínas. Así, en la cuantificación se deben informar las relaciones de proteínas:partículas, lípidos:partículas o lípidos:proteínas, así como las estimaciones de cuantificación global como una medida de pureza.

En el caso de la orina, mientras que la creatinina se ha convertido en el factor de normalización habitual para los biomarcadores urinarios en fase líquida, en un estudio se vio que el número de vesículas extracelulares pequeñas y la proteína Tsg101 transportada en estas sirven para normalizar la variación circadiana cuando se prueban biomarcadores candidato en vesículas extracelulares pequeñas; estos dos parámetros, entonces, se han propuesto como factores de normalización viables para biomarcadores en vesículas extracelulares pequeñas. Este aspecto de la caracterización es vital, ya que una correcta normalización del número de vesículas es uno de los requisitos para poder trasladar al contexto clínico los biomarcadores candidatos encontrados en las vesículas extracelulares de orina descritas para enfermedades renales (78).

En la caracterización general, inicialmente se establecían cuatro categorías de proteínas: 1) extracelulares unidas a lípidos o transmembrana, 2) citosólicas, 3) intracelulares ausentes o contenidas en baja cantidad en vesículas extracelulares-exosomas, pero presentes en otros tipos de vesículas extracelulares, y 4) extracelulares asociadas con estas vesículas, de las cuales debía cuantificarse al menos una proteína de las categorías 1, 2 y 3 (7). Gracias al avance en el conocimiento de los diferentes subtipos de vesículas extracelulares existentes y el análisis de su contenido proteico, en las guías MISEV 2018 se propusieron nuevas categorías de proteínas para evaluar en cualquier preparación de vesículas extracelulares: 1) marcadores proteicos positivos de vesículas extracelulares asociados a la membrana

y al citosol, 2) marcadores proteicos negativos como control de pureza, 3) marcadores específicos de un subtipo de vesículas extracelulares, y 4) proteínas extracelulares solubles con actividades funcionales.

Conscientes de que la muestra obtenida usualmente es limitada, no es necesaria la evaluación de estos marcadores en cada tanda de aislamiento, pero sí, por lo menos, cada vez que se modifiquen las condiciones preanalíticas o de aislamiento de las vesículas extracelulares. Esta combinación de marcadores es necesaria para demostrar la presencia de vesículas de membrana intactas en vez de fragmentos de membrana. Los controles de pureza incluyen proteínas que se encuentran como contaminantes aislados concomitantemente, los cuales dependerán de la fuente biológica, ya sean lipoproteínas y materiales derivados del suero o los presentes en la orina como la creatinina. También, se recomienda evaluar proteínas presentes en compartimentos subcelulares distintos de la membrana plasmática y los endosomas, como las mitocondrias, que pueden estar presentes en ciertos subtipos de vesículas extracelulares. Cuando se ha identificado un factor soluble funcional en las vesículas extracelulares, como citocinas, factores de crecimiento y componentes de la matriz extracelular, debe determinarse su modo de asociación con dichas vesículas o topología (14). La topología de los componentes asociados a las vesículas extracelulares es una característica nueva introducida en las guías MISEV 2018 que indica si estas son de la luz o superficiales.

Para la caracterización de las vesículas individuales, se deben emplear técnicas complementarias u ortogonales, entre ellas:

1. imágenes de alta resolución de vesículas extracelulares individuales mediante microscopía electrónica y técnicas relacionadas, microscopía de barrido por sonda (SPM), incluida la microscopía de fuerza atómica (AFM) o microscopía de superresolución, y
2. análisis de partículas individuales que estiman características biofísicas de las vesículas extracelulares como:
 - a. la medición del tamaño mediante sensor de fuerza resistivo o por propiedades de dispersión de luz mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), citometría de flujo de alta resolución, detector de dispersión de luz multiangular acoplada a AF4, etc.,
 - a. propiedades de fluorescencia mediante espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) o citometría de flujo de alta resolución, y
 - a. composición química medida por espectroscopía Raman.

Cada una de estas técnicas tiene sus limitaciones y no todas funcionan igual con todos los tipos de vesículas extracelulares: las muy grandes (> 400 nm) y las muy pequeñas (<50 nm) no se pueden cuantificar bien por NTA, y las pequeñas no son fáciles de detectar por los citómetros de flujo más comunes. Algunas vesículas grandes y agregados de vesículas pequeñas se pueden monitorear mediante microscopía de luz y fluorescencia; las vesículas por debajo del límite de refracción o de la resolución de un microscopio se pueden detectar por fluorescencia, pero no se puede obtener información estructural ni distinguir una vesícula individual de un agregado de vesículas pequeñas únicamente con base en detalles estructurales (14). Además de las limitaciones de tamaño del NTA, los grandes agregados de proteínas pueden confundirse con vesículas durante el análisis, sobreestimando la concentración de vesículas (13).

En consecuencia, la cuantificación puede verse sesgada por la medición de partículas contaminantes presentes en el solvente y por agregados de proteínas que provengan de la muestra y tengan un comportamiento similar al de las vesículas; por esto se deben usar controles adecuados, incluidos el solvente y medios no condicionados, y asegurar la limpieza de la muestra. Para superar dichos problemas, algunos investigadores han combinado estas técnicas con otras metodologías, por ejemplo, la espectroscopía Raman y la marcación fluorescente. Paralelamente, el desarrollo de citómetros de flujo de nueva generación equipados con detectores de partículas pequeñas ha permitido analizar directamente las vesículas extracelulares; sin embargo, no siempre se da una validación adecuada de estos análisis, especialmente para confirmar que se analizan vesículas individuales en lugar de agregados de vesículas extracelulares (10).

A pesar de las dificultades y retos mencionados, el desarrollo de estudios proteómicos ha permitido avanzar en el conocimiento, y proponer y validar marcadores para diversos subtipos de vesículas extracelulares, incluidas las grandes, las medianas y las pequeñas obtenidas por ultracentrifugación y según el subtipo de las pequeñas. Es claro que las proteínas consideradas marcadores de exosomas no deberían usarse como marcadores de una población vesicular específica, sino como proteínas enriquecidas en estas. Con base en el análisis proteómico cuantitativo extensivo desarrollado por Kowal, *et al.*, los autores propusieron una serie de marcadores proteicos específicos y validados para vesículas extracelulares pequeñas y exosomas, definiendo cinco categorías de proteínas con diferente abundancia relativa en distintos tipos de estas vesículas, así como dos posibles flujos de trabajo para un análisis exhaustivo de sus mezclas.

Como ya se mencionó, se encontraron proteínas marcadoras y asociadas a exosomas en poblaciones de vesículas extracelulares pequeñas CD9+ que no corresponden a exosomas. Si bien los marcadores que se pensaba que eran exclusivos de exosomas realmente eran genéricos para vesículas pequeñas, se ha visto que algunos marcadores proteicos son únicos de una subclase de las pequeñas que cargan tetraspaninas específicas (69). Los autores proponen la tetraspanina CD63 para aislar una población discreta de exosomas a partir de vesículas extracelulares pequeñas obtenidas a 100g; sin embargo, es necesario considerar que la CD63 también se encontró en vesículas grandes, razón por la cual se debe iniciar el protocolo con su remoción, y, además, no todos los tipos celulares expresan CD63 o secretan vesículas extracelulares con CD63. Así, para cada tipo celular se debe establecer la presencia y la combinación de marcadores exosomales adecuados para la caracterización vesicular.

En cuanto al análisis del ARN contenido en las vesículas extracelulares (EV-RNA), en el taller EV-RNA de la ISEV desarrollado en el 2015, se discutieron varios desafíos técnicos como la estandarización de los métodos de aislamiento, la optimización de metodologías para poder aislar y caracterizar las mínimas cantidades de ARN que se halla en las VE, y el desarrollo de aproximaciones para demostrar la transferencia funcional de EV-RNA en vivo. La publicación de los resultados evidencia el conocimiento incompleto en torno a la naturaleza de los EV-RNA y a cómo estudiarlos de manera efectiva y confiable, lo que impide la implementación de estándares de referencia en la investigación del EV-RNA; los autores piden precaución en la interpretación de los datos obtenidos, creando conciencia de las posibilidades y limitaciones de las estrategias utilizadas en el momento para investigar EV-RNA (79).

Estudios funcionales con vesículas extracelulares

La comunicación celular requiere de mediadores solubles o moléculas de señalización, las cuales pueden ser secretadas por la célula que genera la señal al espacio extracelular por exocitosis, liberadas por difusión a través de la membrana plasmática, o expuestas al espacio extracelular mientras permanecen unidas a la superficie celular (1). Otra opción es su secreción y transporte a través de las vesículas extracelulares. La secreción y la comunicación mediadas por vesículas extracelulares constituyen un fenómeno evolutivo conservado; por lo tanto, se acepta la hipótesis según la cual estos son mensajeros celulares en el contexto de la comunicación celular, con funciones en la célula receptora gracias a la transferencia de proteínas, lípidos y ARN (34,80).

Sin embargo, algunas veces se hacen afirmaciones difíciles de respaldar experimentalmente. Una correcta categorización de los diversos tipos de vesículas extracelulares –acorde con su definición oficial– no solo es importante en sí misma, sino también, para poder establecer y precisar un rol funcional para cada subtipo de vesícula. Aunque se cree que distintas poblaciones vesiculares podrían generar efectos funcionales diferentes, inicialmente, la actividad biológica observada se atribuía exclusivamente a los exosomas, sin una adecuada caracterización ni confirmación de su origen endosómico, y no se consideraba la presencia de otras vesículas extracelulares y contaminantes en los preparados. Las recomendaciones de la MISEV 2018 buscan evitar artefactos e interpretaciones excesivas al analizar las funciones de estas vesículas y atribuir una actividad funcional a una vesícula en general o a un subtipo específico, como los exosomas.

En este sentido, la ISEV considera que no se debe atribuir una función específica a las vesículas extracelulares o a alguno de sus subtipos solamente con su descripción en una preparación heterogénea y potencialmente contaminada, aspecto importante en este tipo de estudios por los problemas ya analizados (14). Por lo tanto, según cuál sea la pregunta que se pretende contestar, o el problema que se quiere resolver, podría no ser tan relevante o factible experimentalmente asignar una función dada a un tipo específico de vesícula extracelular en lugar de estudiar la actividad biológica de un conjunto de vesículas derivadas de una condición *in vivo* específica, y comparar las derivadas de diferentes condiciones fisiopatológicas. Los investigadores deben ser conscientes de esto en el momento de sacar conclusiones para evitar la asociación de una actividad biológica con un tipo particular de vesícula extracelular, sin antes haber analizado y confirmado su identidad y pureza.

Las guías MISEV 2014 presentaban múltiples orientaciones para establecer si una actividad biológica estaba asociada o no con las vesículas extracelulares, específicamente con los exosomas (7). En las del 2018, estas evolucionaron y se ampliaron los aspectos por considerar sin centrarse en un tipo particular de vesícula extracelular. Para diferenciar las funciones específicas de los distintos tipos de vesículas extracelulares, es necesario establecer las contribuciones relativas de cada fracción vesicular en la actividad total, por ejemplo, las de las pequeñas frente a las grandes, e incluir como controles el medio o fluido original y reducido de las vesículas.

Esto es posible mediante la combinación de técnicas ortogonales de aislamiento. Así, la ISEV recomienda hacer las pruebas funcionales después de separaciones rigurosas, y comparar las fracciones de vesículas

extracelulares y aquellas diferentes a estas para determinar qué proporción de la actividad está asociada con cada fracción. Si la actividad se asocia principalmente con las vesículas extracelulares, esta actividad debería reducirse al removerlas, si no es que desaparece. En este punto se habla de un medio o fluido con reducción o pocas vesículas extracelulares, y no libre de ellas, ya que no siempre es posible su remoción total del fluido o del sobrenadante. Esta separación refinada debe realizarse, al menos, para un conjunto de réplicas biológicas, aunque no necesariamente de manera sistemática después.

Las indicaciones de las guías MISEV incluyen los siguientes pasos:

1. normalizar la cantidad usada de vesículas extracelulares para llevar a cabo estudios funcionales comparativos, teniendo en cuenta las recomendaciones para la cuantificación;
2. demostrar que la actividad se observa en ausencia de contacto directo de célula a célula;
3. demostrar que la actividad se asocia predominantemente con estas vesículas en lugar de mediadores solubles;
4. demostrar la asociación específica de la actividad con vesículas extracelulares y no con componentes aislados simultáneamente y, según sea el caso, y
5. determinar si una función es específica de los exosomas, en comparación con otras vesículas pequeñas.

También, es posible atribuir efectos particulares mediados por vesículas extracelulares a componentes específicos de vesículas extracelulares y a vesículas extracelulares de un origen celular dado, cada uno con consideraciones para tener en cuenta. antes de concluir y asignar funciones específicas a un tipo vesicular en particular (14). En las guías MISEV 2018, se presentan ejemplos de protocolos para demostrar los puntos 1 a 4. En cuanto al punto 5, existen ciertas limitaciones técnicas que impiden concluir que los exosomas tengan funciones específicas en comparación con otras vesículas extracelulares. Gracias a los estudios más recientes en que se separan los múltiples subtipos vesiculares, ahora es claro que estos pueden presentar actividades funcionales tan importantes como las atribuidas a los exosomas.

La definición de los marcadores apropiados para describir distintas poblaciones de vesículas extracelulares permite, no solo caracterizar las obtenidas y estudiar su efecto biológico, sino también, investigar la maquinaria molecular específica requerida para su biogénesis y secreción. Teniendo en cuenta que estas vesículas se definen con base en su ruta de biogénesis y secreción, es importante y necesario estudiarlas y analizarlas. Además, la comprensión de estos mecanismos permite entender las funciones fisiológicas y patológicas de las vesículas extracelulares. Las estrategias de análisis incluyen la inhibición o promoción selectiva de la secreción de un tipo vesicular particular mediante fármacos, tratamientos y herramientas de inhibición génica. Sin embargo, los componentes de la maquinaria involucrada pueden ser compartidos por diversas vías, de tal forma que una estrategia puede afectar a más de un tipo de vía de ensamblaje y secreción y, por lo tanto, a más de un tipo de vesículas extracelulares, por lo que este otro aspecto debe considerarse y evaluarse sistemáticamente (69).

Para superar este escollo, se requieren estudios que identifiquen marcadores y blancos moleculares de rutas de biogénesis específicas y únicas, que afecten únicamente a un subtipo vesicular en particular, para poder evaluar el ensamblaje intracelular de las vesículas e identificar y aislar aquellas vesículas específicas después de que han salido de la célula. Afortunadamente, cada vez se cuenta con un mayor conocimiento y mejores herramientas para acelerar el desarrollo del campo y ampliar sus horizontes, y se espera que, en estudios futuros, se brinden herramientas más selectivas a la hora de promover o inhibir la secreción de un tipo particular de vesícula extracelular.

Por último, en los estudios funcionales con vesículas extracelulares, unas veces se presume y otras se investiga su captura por parte de la célula receptora. Sin embargo, son muchos los desafíos y los artefactos que pueden presentarse durante estos ensayos (81). La detección dentro de una célula de la señal de un tinte de marcado de vesícula extracelular no significa necesariamente que esta, o su carga, haya sido internalizada.

En la revisión de Mulcahy, *et al.*, se presentan varias cuestiones asociadas con los tintes fluorescentes de unión a membrana, los compuestos químicos y péptidos utilizados para inhibir la absorción de vesículas extracelulares y los artefactos que pueden aparecer, y se analiza cómo estos pueden afectar el comportamiento normal de las vesículas y las células receptoras. Aun así, la evidencia de que pueden ingresar a las células y entregar su carga, es cuantiosa (81). La guía MISEV 2018 no trae una recomendación clara al respecto, pero insiste en que los investigadores sean conscientes de estos problemas y consideren que cada par específico de célula donante-receptora de vesículas extracelulares puede comportarse de forma diferente (14).

Es necesario reconocer que no todos los biofluidos están disponibles en un volumen suficiente para aislar vesículas extracelulares y desarrollar múltiples análisis con cada muestra. En esos casos, las guías MISEV establecen que se pueden combinar varias muestras para establecer la fiabilidad de los métodos de separación y caracterización, antes de hacer análisis específicos o estudios funcionales con muestras individuales. En caso de que no se pueda llevar a cabo un análisis del método de separación y una caracterización adecuada, es responsabilidad de los autores advertir las interpretaciones alternativas a las que haya lugar, por ejemplo, que las vesículas extracelulares pueden contribuir, aunque no necesariamente de forma exclusiva, a un fenómeno observado o una firma molecular.

Las guías MISEV no son definitivas en algunos aspectos, al fin y al cabo son recomendaciones; no obstante, si las atendemos al plantear estudios y los autores ingresan los detalles experimentales de sus publicaciones a través de EV-TRACK, se podrán considerar y definir condiciones experimentales que, de otra forma, son pasadas por alto en la sección de materiales y métodos de los artículos, pero que influyen en la calidad de las preparaciones de vesículas extracelulares y la posibilidad de reproducir los resultados.

Estado actual del estudio de vesículas extracelulares en Colombia

En Colombia, también ha habido un interés creciente en el estudio de los exosomas y otras vesículas extracelulares, como lo evidencia el aumento de publicaciones de investigadores con afiliaciones colombianas en los últimos cinco años. A partir de una revisión en PubMed utilizando los términos de búsqueda (“exosome” OR “microparticles” OR “extracellular vesicles”) [Title/Abstract] AND “Colombia” [All Fields] (junio,2020), se encontraron

tres trabajos referentes a exosomas, siete de vesículas extracelulares y 26 de micropartículas, incluidas micropartículas de carácter no biológico. Se hizo una búsqueda similar en Scielo (82) y en Google Scholar (83). Dado que la información que se buscaba debía ser de investigadores afiliados a una institución colombiana con publicaciones en el área de las vesículas extracelulares o exosomas, en esta revisión se excluyeron los estudios publicados por colombianos con afiliación en instituciones extranjeras.

Se encontraron artículos de revisión con la participación de investigadores afiliados a instituciones colombianas como coautores, los cuales se centran en exosomas derivados de células madre mesenquimales y su potencial terapéutico (17), así como artículos de revisión con autoría enteramente colombiana sobre micropartículas como moduladores de la reacción autoinmunitaria (18) y artículos originales con investigadores afiliados a instituciones colombianas entre los coautores (19). El grupo de Castaño, *et al.*, ha adelantado estudios sobre micropartículas formadoras de complejos inmunitarios, su papel durante la activación de monocitos (20) y la diferenciación a macrófagos (21) en pacientes con lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide, así como sobre vesículas extracelulares circulantes en estos últimos y su efecto en la inducción de citocinas proinflamatorias y en la activación de fagocitos mononucleares (22). También, se han hecho estudios sobre la captura por células endoteliales de micropartículas derivadas de pacientes con estas dos enfermedades (23) en los que las vesículas extracelulares fueron aisladas por ultracentrifugación diferencial y caracterizadas mediante citometría de flujo multiparamétrica y microscopía STEM.

En un trabajo riguroso y detallado, se evaluó la liberación de vesículas extracelulares por células epiteliales intestinales Caco-2 infectadas con rotavirus, las cuales se concentraron a 100.000g y se separaron parcialmente mediante gradientes de sacarosa; se obtuvieron poblaciones que expresaban marcadores de cuerpos apoptóticos y de exosomas (24). Asimismo, se han publicado estudios de vesículas extracelulares aisladas con el estuche comercial ExoQuick™: uno en el que se evaluaron en saliva tetraspaninas relacionadas con “exosomas” aislados con este estuche y caracterizados por TEM y ELISA para CD9 y CD81 (25), y otro sobre el papel de vesículas extracelulares derivadas de neuronas en la diferenciación neural de células madre derivadas de adipocitos ADSC, aisladas con el mismo estuche y caracterizadas por TEM, NTA y marcadores de VE (Alix, CD63, CD9, HSP70, citocromo, calnexina, COX IV), y marcadas con fluorescencia para confirmar su transferencia durante los análisis funcionales (26). En estas dos últimas publicaciones se puede ver la heterogeneidad en el uso de los términos “exosomas” y “vesículas extracelulares”, aun cuando se emplea el mismo tipo de aislamiento, lo que evidencia la observancia de las guías MISEV por parte de Roballo, *et al.* (26).

Recientemente, Velandia-Romero, *et al.*, estudiaron vesículas extracelulares derivadas de macrófagos infectados con el virus del dengue y su efecto biológico en células endoteliales. Aislaron vesículas extracelulares de sobrenadantes de cultivo por ultracentrifugación, especificando los detalles experimentales y el rotor empleado, y se caracterizaron como “exosomas” y “cuerpos apoptóticos” mediante la determinación de la densidad por flotación y microscopía TEM y, posteriormente, inmunoprecipitación con el estuche comercial Exo-Flow™ (Anti CD63); los autores verificaron la presencia de marcadores proteicos y, por último, analizaron su contenido proteico y algunos miARN (27). Además, nombran de forma cuidadosa cada producto obtenido, diferenciando entre gránulos (*pellet*), vesículas extracelulares,

exosomas y cuerpos apoptóticos, según la fase de procesamiento y la evidencia proporcionada por los marcadores proteicos.

En otros estudios se utiliza el término “vesículas membranales”, objeto de estudio que corresponde a las vesículas extracelulares, y que incluyen aquellas liberadas por micobacterias (28) y las derivadas de células epiteliales intestinales Caco-2 infectadas con rotavirus que expresan marcadores de exosomas (29). El empleo de este término se dio antes de la publicación de las guías MISEV 2014 y de la incorporación del término “vesículas extracelulares” en la ontología génica y en los vocabularios controlados, lo que explica la falta de correspondencia con la terminología oficial. Así como estos, es posible que haya otros estudios sobre las vesículas extracelulares en los que se empleaba una terminología variada, pues en ese momento no se contaba con los términos oficiales.

Por fuera del alcance de este análisis están las publicaciones con autoría de colombianos pero sin afiliación a una institución colombiana, como es el caso Gil-Bona, *et al.* (84) (C. M. Parra es la autora colombiana), Ospina-Prieto, *et al.* (85), y de la Torre-Gómez, *et al.* (86), los cuales no pueden ser consultados con las opciones de búsqueda vigentes en las bases de datos.

En cuanto a los proyectos en curso y otros ya finalizados, en el repositorio principal CENDOC del Ministerio de Ciencias, no se registran en el momento proyectos con títulos que incluyan las palabras ‘VE’, exosoma o vesículas extracelulares, ni en español ni en inglés (87). En el buscador del Ministerio de Ciencias, entre los proyectos SIGP, se registran tres sobre: la participación de los exosomas producidos por macrófagos en la activación endotelial y la dispersión del virus del dengue-2; los inmunomoduladores asociados con la infección por rotavirus, y la interrelación entre la terapia antitumoral clásica y los adyuvantes naturales en la inducción de una reacción antitumoral, pero ninguno con el término exacto de “vesículas extracelulares” (88).

En cuanto a los productos de proyectos, se registran siete trabajos con el término “exosomas”, uno con el término “exosoma”, y tres con el término exacto “vesículas extracelulares” (89), entre tesis de pregrado y maestría e informes finales de investigación, los cuales incluyen estudios relacionados con cáncer, células dendríticas infectadas por *Leishmania*, virus del síndrome respiratorio y reproductivo en calostro porcino, enfermedad periodontal, células mesenquimales del estroma derivadas de médula ósea, macrófagos humanos infectados con virus del dengue, así como un informe de la estancia posdoctoral de la autora de esta actualización en el Grupo de Fisiología Molecular del Instituto Nacional de Salud, titulado (Novoa-Herrán S.S, Gómez-Grosso L.A. "Aislamiento y caracterización parcial de vesículas extracelulares tipo exosomas de sobrenadantes de cultivos de células de melanoma expuestas a doxorubicina y su efecto sobre la viabilidad y acortamiento de cardiomiocitos aislados", disponible en https://sbaminciencias.gov.co/Buscador_Productos/busqueda?q=Aislamiento+y+caracterizaci%C3%B3n+parcial+de+ves%C3%ADculas+extracelulares+tipo+exosomas+de+sobrenadantes+de+cultivos+de+c%C3%A9lulas&pagenum=1&start=0&type=load&lang=es).

Por otra parte, en noviembre del 2019, en Bogotá, se desarrolló un minisimposio sobre vesículas extracelulares en biomedicina organizado por el Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud - IDCIBIS, en el que se reunieron algunos investigadores colombianos con intereses y experiencia en torno al estudio de las vesículas extracelulares, quienes

discutieron los últimos avances, las dificultades y los desafíos del campo, y manifestaron intenciones de trabajar conjuntamente.

Esto demuestra que hay interés y capacidad para estudiar las vesículas extracelulares en el país, aunque los estudios y trabajos desarrollados aún son pocos y su calidad varía en cuanto al cumplimiento de los parámetros de calidad y seguimiento de las recomendaciones de la ISEV.

El desconocimiento del campo de las vesículas extracelulares por parte de los investigadores y los editores de revistas no especializadas, puede conducir a imprecisiones en las publicaciones y las afirmaciones que presentan, pero, gracias al desarrollo de herramientas como la EV-TRACK, los investigadores se pueden familiarizar con los parámetros experimentales más relevantes. La plataforma EV-TRACK también permite monitorear el avance en los métodos de aislamiento y caracterización, y las guías experimentales requeridas, al tiempo que promueve el reporte estandarizado de parámetros experimentales con EV-METRIC, una herramienta valiosa para los investigadores y revisores en esta área.

En cuanto a las técnicas y tecnologías disponibles en Colombia, las publicaciones evidencian la fortaleza técnica de las universidades colombianas, pues cuentan con citómetros de flujo, ultracentrífugas, espectrómetros de masas y microscopios electrónicos con los que puede irse más allá que con las técnicas básicas de bioquímica y biología molecular. También, existen empresas colombianas que prestan servicios de análisis de muestras mediante rastreo de nanopartículas (NTA), dispersión de luz dinámica (DLS), y microscopía electrónica, lo cual permite dar cumplimiento a las guías MISEV y generar trabajos de calidad internacional.

Análisis del contexto mundial y nacional

El estudio de las vesículas extracelulares no solo constituye un reto científico-técnico, sino un estímulo para los grupos que actualmente trabajan y proyectan trabajar en un área relativamente nueva y promisoría, donde un avance significativo se puede dar gracias a la integración de experiencias, capacidades y esfuerzos, y de las diversas técnicas y tecnologías disponibles en cada institución. La realidad nacional permite considerar la creación de una red de investigación en torno a las vesículas extracelulares que favorezca el desarrollo y el fortalecimiento de este campo en Colombia mediante el intercambio de experiencias, *know-how* y fortalezas técnicas, así como del planteamiento de proyectos interinstitucionales con acceso a equipos por medio de convenios que complementen y diversifiquen los análisis realizados y satisfagan los requisitos de las guías MISEV.

El campo científico, como sucede con ámbitos de otras actividades humanas, es orgánica, evoluciona y se autorregula, lo que es evidente en el desarrollo del campo de estudio de las vesículas extracelulares, que, aunque relativamente joven, ha tenido una evolución veloz que continúa sin tregua. Gracias a la creación de la ISEV y la publicación de las guías MISEV, las controversias que antes existían han disminuido, ya que existe un consenso de la comunidad científica, lo que evidencia que este es un campo de estudio establecido, aunque todavía tiene preguntas por resolver. La comunidad científica debe reconocer los retos, las limitaciones y los vacíos que aún enfrenta en este campo; al dilucidarlos, se podrán orientar las investigaciones futuras y las prioridades de financiación.

En cuanto a las cuestiones en las que aún no hay consenso, este debe construirse por medio de la presentación de informes de experimentos bien controlados que se ajusten a los derroteros normativos establecidos por la ISEV. Un ejemplo es la necesidad de avanzar en la categorización y caracterización de las múltiples poblaciones de vesículas extracelulares secretadas por las células, y de obtener más marcadores adecuados para los diferentes tipos celulares, así como de establecer parámetros y marcadores claros para determinar la pureza de las preparaciones según el medio, el fluido de origen y el tipo celular. También, está pendiente el desarrollo de guías oficiales para el análisis del EV-RNA y su inclusión en las guías MISEV, la construcción de un consenso en torno a las recomendaciones adicionales para el estudio de la captura de vesículas extracelulares durante los ensayos funcionales, y un mayor acceso a técnicas y tecnologías de última generación que permitan aislar y caracterizar tipos vesiculares específicos.

Los avances en tecnologías como la de los citómetros de nano-flujo (nFCM), la combinación de técnicas de análisis de partículas con espectroscopía Raman y la marcación fluorescente, así como el desarrollo de las técnicas de fraccionamiento de flujo y de plataformas basadas en microfluidos, son el nuevo horizonte de trabajo. Las técnicas y tecnologías propias de otras áreas, como las de los nanomateriales, permitirían el análisis de las propiedades fisicoquímicas de las vesículas extracelulares, como uso del potencial Z, y la marcación de vesículas extracelulares con fluoróforos y metales; además, la combinación de sistemas de fluidos con técnicas de análisis como la espectrometría de masas, por ejemplo, pueden ampliar aún más los horizontes de trabajo. Estas nuevas oportunidades también son desafíos, pues se requiere estandarizar y homogenizar su empleo para garantizar la reproducibilidad de los resultados.

Para evitar resultados y conclusiones engañosas, los investigadores en este campo debemos ser conscientes de los alcances y las limitaciones de cada tecnología y cada técnica aplicada al análisis de vesículas, y los desafíos que encierra su estudio. Esto permitirá plantear mejores preguntas de investigación que puedan responderse con veracidad y rigor. Paralelamente, los investigadores debemos ser transparentes y reportar cabalmente los métodos y parámetros experimentales empleados, cumpliendo con las exigencias y recomendaciones de las guías MISEV. En este sentido, las bases de conocimiento como la EV-TRACK brindan herramientas a autores, revisores, editores y financiadores para poner en práctica las guías experimentales MISEV a partir del papel que le corresponde a cada científico.

A pesar de los desafíos técnicos, el estudio de las vesículas extracelulares es prometedor a nivel funcional. Además de ser un mecanismo de comunicación, modulación y regulación celular a distancia, las proteínas y el ARN transportados en exosomas y otras vesículas extracelulares pueden representar firmas moleculares de estados fisiológicos y patológicos de sus células de origen, lo que constituye una biopsia líquida, y una potencial herramienta diagnóstica y terapéutica con aplicaciones en cáncer y enfermedades autoinmunitarias y virales; de ahí la importancia y el interés en su estudio.

Las vesículas extracelulares se han propuesto como una ruta indirecta de infección viral, incluida la del SARS-CoV-2, y como una contribución a la fisiopatología de la Covid-19. Recientemente, se ha visto que las vesículas

extracelulares derivadas de células epiteliales de pulmón A549 transfectadas con genes del SARS-CoV-2, transportaban ARN viral y fueron captadas por cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas (hiPSC-CMs) transfiriendo el ARN viral, lo que condujo a una regulación positiva de los genes relacionados con la inflamación en las hiPSC-CMs. Estos hallazgos sugieren que las vesículas extracelulares que transportan ARN del SARS-CoV-2 constituyen una ruta indirecta de entrada del ARN viral en los cardiomiocitos (90). Esta interacción entre las vesículas y el virus puede ser explotada para el desarrollo de vacunas, fármacos antivirales y terapias basadas en ellas, especialmente aquellas derivadas de células madre mesenquimales, para el manejo de la Covid-19 (91,92), ya sea que las vesículas extracelulares sean naturales, nanoseñuelos (*nano-decoy*) o estén cargadas de antivirales (93).

Los estudios ómicos de vesículas extracelulares enfocados en la búsqueda de biomarcadores, y la aplicación de técnicas como la espectrometría de masas para su detección en biopsias líquidas, contribuyen directamente al desarrollo e implementación de la medicina traslacional y personalizada de precisión (94), con avances como los logrados en el campo de la oncología (95-97). Un reciente informe enfocado en las aplicaciones de las vesículas extracelulares en diagnóstico y tratamiento, evidencia el aumento de los estudios relacionados con las vesículas extracelulares, patentes y subvenciones, así como de empresas emergentes con una gran interés en los exosomas (9). Esto alienta la investigación sobre las vesículas extracelulares para identificar nuevos biomarcadores de enfermedades, y abrir el camino al desarrollo de herramientas de diagnóstico adecuadas que puedan estratificar enfermedades y brindar un tratamiento personalizado a los pacientes.

Recomendaciones y conclusiones

Esta actualización es un llamado a la comunidad científica nacional para que adopte la terminología oficial y siga las guías experimentales recomendadas por la comunidad científica internacional, las cuales contienen los requisitos para el estudio riguroso de las vesículas extracelulares. Se aspira a motivar a investigadores, revisores, editores, jurados y financiadores, a emplear y divulgar los términos y la nomenclatura oficiales, y a seguir las guías MISEV.

La expresión “vesícula extracelular” fue el primero usado, es el más preciso y claro, y es el término genérico y oficial, indexado en la ontología génica y en otros vocabularios controlados, y aprobado por la comunidad internacional asociada en la ISEV; además, puede usarse como una base para definir características adicionales de la población aislada según la caracterización realizada. Por otro parte, el término “exosomas” se refiere únicamente a las vesículas extracelulares de origen endosómico, y debe usarse con precisión y veracidad. Es necesario reconocer las limitaciones de las técnicas y tecnologías empleadas en el aislamiento, caracterización y desarrollo de los estudios funcionales, y utilizar los controles adecuados en cada caso. También, es importante tratar de definir el subtipo vesicular estudiado, especialmente cuando se le atribuye una función o una aplicación. Un trabajo reflexivo, concienzudo y cabal, con una definición clara de las vesículas extracelulares estudiadas, y que sea cauteloso en las afirmaciones y conclusiones, posibilitará el desarrollo de estudios con la calidad adecuada para el avance del campo.

Como un eco de las recomendaciones de la ISEV contenidas en las guías MISEV, esta actualización busca brindar orientación en cada fase de la investigación científica, desde el planteamiento de la pregunta de investigación, planeación y diseño experimental, hasta el análisis crítico de los resultados y su divulgación. Para esto, el consorcio de EV-TRACK recomienda la observancia de los parámetros EV-METRIC. Su empleo permitirá detectar limitaciones potenciales en los estudios de vesículas extracelulares y aumentar el rigor experimental, con el fin de que el campo pueda seguir creciendo y alcance todo su potencial.

Para concluir, en la presente actualización se plantea que el de las vesículas extracelulares es un campo científico consolidado, aunque aún en evolución, que cuenta con una terminología y guías oficiales, y se resalta el trabajo de instituciones como la ISEV, el desarrollo de las guías MISEV y la creación de recursos como la EV-TRACK. Aunque la clasificación de las vesículas extracelulares todavía está en desarrollo, se insiste en el uso correcto de los términos y la nomenclatura oficial. Se resumen las técnicas, recursos, requisitos y especificaciones de calidad disponibles en el campo, considerando las limitaciones, retos y oportunidades, y se brinda una visión de su futuro en el contexto mundial y el nacional, proponiendo perspectivas de trabajo para el avance del campo.

Agradecimientos

Al doctor Luis Alberto Gómez Grosso, por sus consejos, su orientación inicial y sus valiosos comentarios sobre el manuscrito.

Referencias

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. General principles of cell communication. En: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, editores. *Mol Biol Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
2. Jones SM, Kazlauskas A. Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression. *Chem Rev*. 2001;101:2413-24. <https://doi.org/10.1021/cr000101f>
3. O'Shea JJ, Gadina M, Siegel RM. 9 - Cytokines and Cytokine Receptors. En: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW, Frew AJ, Weyand CM, editores. *Clinical Immunology: Principles and Practice*. 5th edition. London: Elsevier; 2019. p. 127-55.e1.
4. Lauder JM. Neurotransmitters as growth regulatory signals: Role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci*. 1993;16:233-40. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(93\)90162-F](https://doi.org/10.1016/0166-2236(93)90162-F)
5. Meldolesi J. Exosomes and ectosomes in intercellular communication. *Curr Biol*. 2018;28:R435-44. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.059>
6. Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Intercellular communication: Diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13:328-35.
7. Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, *et al*. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2014;3:26913. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.26913>
8. van Deun J, Mestdagh P, Agostinis P, Akay Ö, Anand S, Anckaert J, *et al*. EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nat Methods*. 2017;14:228-32. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4185>
9. Roy S, Hochberg FH, Jones PS. Extracellular vesicles: The growth as diagnostics and therapeutics; a survey. *J Extracell Vesicles*. 2018;7:1438720. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1438720>
10. Gardiner C, Vizio DD, Sahoo S, Théry C, Witwer KW, Wauben M, *et al*. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: Results of a worldwide survey. *J Extracell Vesicles*. 2016;5:32945. <https://doi.org/10.3402/jev.v5.32945>

11. Zhang H, Freitas D, Kim HS, Fabijanic K, Li Z, Chen H, *et al.* Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nat Cell Biol.* 2018;20:332-43. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0040-4>
12. Cvjetkovic A, Lötvall J, Lässer C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2014;3:23111. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.23111>
13. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, *et al.* Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles.* 2013;2:1-25. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20360>
14. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 2018;7:1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
15. Clayton A, Boilard E, Buzas EI, Cheng L, Falcón-Perez JM, Gardiner C, *et al.* Considerations towards a roadmap for collection, handling and storage of blood extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2019;8:1647027. <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1647027>
16. Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, Dignat-George F, Drees EEE, El-Andaloussi S, *et al.* Methodological guidelines to study extracellular vesicles. *Circul Res.* 2017;120:1632-48. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309417>
17. Gorabi AM, Kiaie N, Barreto GE, Read MI, Tafti HA, Sahebkar A. The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes in treatment of neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol.* 2019;56:8157-67. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01663-0>
18. Burbano C, Rojas M, Vásquez G, Castaño D. Microparticles that form immune complexes as modulatory structures in autoimmune responses. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:267590. <https://doi.org/10.1155/2015/267590>
19. Toda H, Díaz-Varela M, Seguí-Barber J, Roobsoong W, Baro B, García-Silva S, *et al.* Plasma-derived extracellular vesicles from *Plasmodium vivax* patients signal spleen fibroblasts via NF-κB facilitating parasite cytoadherence. *Nat Commun.* 2020;11:2761. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16337-y>
20. Burbano C, Villar-Vesga J, Orejuela J, Muñoz C, Vanegas A, Vásquez G, *et al.* Potential involvement of platelet-derived microparticles and microparticles forming immune complexes during monocyte activation in patients with systemic lupus erythematosus. *Front Immunol.* 2018;9:322. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00322>
21. Burbano C, Villar-Vesga J, Vásquez G, Muñoz-Vahos C, Rojas M, Castaño D. Proinflammatory differentiation of macrophages through microparticles that form immune complexes leads to T- and B-cell activation in systemic autoimmune diseases. *Front Immunol.* 2019;10:2058. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02058>
22. Burbano C, Rojas M, Muñoz-Vahos C, Vanegas-García A, Correa LA, Vásquez G, *et al.* Extracellular vesicles are associated with the systemic inflammation of patients with seropositive rheumatoid arthritis. *Sci Rep.* 2018;8:17917. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36335-x>
23. Atehortúa L, Rojas M, Vásquez G, Muñoz-Vahos CH, Vanegas-García A, Posada-Duque RA, *et al.* Endothelial activation and injury by microparticles in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthrit Res Ther.* 2019;21:34. <https://doi.org/10.1186/s13075-018-1796-4>
24. Bautista D, Rodríguez L-S, Franco MA, Angel J, Barreto A. Caco-2 cells infected with rotavirus release extracellular vesicles that express markers of apoptotic bodies and exosomes. *Cell Stress Chaperones.* 2015;20:697-708. <https://doi.org/10.1007/s12192-015-0597-9>
25. Tobón-Arroyave SI, Celis-Mejía N, Córdoba-Hidalgo MP, Isaza-Guzmán DM. Decreased salivary concentration of CD9 and CD81 exosome-related tetraspanins may be associated with the periodontal clinical status. *J Clin Periodontol.* 2019;46:470-80. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13099>
26. Roballo KCS, da Silveira JC, Bressan FF, de Souza AF, Pereira VM, Porras JEP, *et al.* Neurons-derived extracellular vesicles promote neural differentiation of ADSCs: A model to prevent peripheral nerve degeneration. *Sci Rep.* 2019;9:11213. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47229-x>

27. Velandia-Romero ML, Calderón-Peláez MA, Balbás-Tepedino A, Márquez-Ortiz RA, Madroñero LJ, Barreto Prieto A, *et al.* Extracellular vesicles of U937 macrophage cell line infected with DENV-2 induce activation in endothelial cells EA.hy926. PLoS ONE. 2020;15:e0227030. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227030>
28. Prados-Rosales R, Carreno LJ, Batista-González A, Baena A, Venkataswamy MM, Xu J, *et al.* Mycobacterial membrane vesicles administered systemically in mice induce a protective immune response to surface compartments of *Mycobacterium tuberculosis*. mBio. 2014;5:e01921-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01921-14>
29. Barreto A, Rodríguez L-S, Rojas OL, Wolf M, Greenberg HB, Franco MA, *et al.* Membrane vesicles released by intestinal epithelial cells infected with rotavirus inhibit T-cell function. Viral Immunol. 2010;23:595-608. <https://doi.org/10.1089/vim.2009.0113>
30. Aaronson S, Behrens U, Orner R, Haines TH. Ultrastructure of intracellular and extracellular vesicles, membranes, and myelin figures produced by *Ochromonas danica*. J Ultrastruct Res. 1971;35:418-30. [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(71\)80003-5](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(71)80003-5)
31. Stegmayr B, Ronquist G. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. Urol Res. 1982;10:253-7. <https://doi.org/10.1007/BF00255932>
32. Minciacchi VR, You S, Spinelli C, Morley S, Zandian M, Aspuria P-J, *et al.* Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles. Oncotarget. 2015;6:11327-41. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3598>
33. Anderson HC. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. J Cell Biol. 1969;41:59-72. <https://doi.org/10.1083/jcb.41.1.59>
34. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. J Cell Biol. 2013;200:373-83. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
35. Trams EG, Lauter CJ, Norman Salem Jr., Heine U. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. Biochim Biophys Acta. 1981;645:63-70. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(81\)90512-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(81)90512-5)
36. Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. J Cell Biol. 1983;97:329-39. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329>
37. Pan B-T, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. Cell. 1983;33:967-78. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90040-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90040-5)
38. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. J Exp Med. 1996;183:1161-72. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>
39. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, *et al.* Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: Dendritic cell derived exosomes. Nat Med. 1998;4:594-600. <https://doi.org/10.1038/nm0598-594>
40. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, *et al.* Gene Ontology: Tool for the unification of biology. Nat Genet. 2000;25:25-9. <https://doi.org/10.1038/75556>
41. The Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. Nucleic Acids Res. 2019;47:D330-D8. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1055>
42. Huntley RP, Sawford T, Mutowo-Muullenet P, Shypitsyna A, Bonilla C, Martin MJ, *et al.* The GOA database: Gene Ontology annotation updates for 2015. Nucleic Acids Res. 2014;43:D1057-D63. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1113>
43. Medical Subject Headings. Extracellular Vesicles. Fecha de consulta: 22 de noviembre de 2019. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=Extracellular+Vesicles>
44. Descriptores en Ciencias de la Salud: DeCS. Vesículas extracelulares. Fecha de consulta: 22 de noviembre de 2019. Disponible en: <http://decs2020.bvsalud.org/cgi-bin/wxis1660.exe/decsserver/>
45. Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: Shedding the confusion between extracellular vesicles. Trends Cell Biol. 2015;25:364-72. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.01.004>
46. Cheung K-H, Keerthikumar S, Roncaglia P, Subramanian SL, Roth ME, Samuel M, *et al.* Extending gene ontology in the context of extracellular RNA and vesicle communication. J Biomed Semantics. 2016;7:19. <https://doi.org/10.1186/s13326-016-0061-5>

47. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, *et al.* Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68:2667-88. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0689-3>
48. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009;9:581-93. <https://doi.org/10.1038/nri2567>
49. Lötvall J, Rajendran L, Gho Y-S, Thery C, Wauben M, Raposo G, *et al.* The launch of Journal of Extracellular Vesicles (JEV), the official journal of the International Society for Extracellular Vesicles – about microvesicles, exosomes, ectosomes and other extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2012;1:18514. <https://doi.org/10.3402/jev.v1i0.18514>
50. Gould SJ, Taylor D, Chiesi A, Kuo WP. Announcing exosomes and microvesicles, the Official Journal of the American Society for Exosomes and Microvesicles. *Journal of Circulating Biomarkers.* 2013;1:1. <https://doi.org/10.5772/56520>
51. Theryl C. SEV RNA Workshop—New York City, October 1-2, 2012. *J Extracell Vesicles.* 2012;1:19857. <https://doi.org/10.3402/jev.v1i0.19857>
52. Hill AF, Pegtel DM, Lambert U, Leonardi T, O'Driscoll L, Pluchino S, *et al.* ISEV position paper: Extracellular vesicle RNA analysis and bioinformatics. *J Extracell Vesicles.* 2013;2:22859. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.22859>
53. van Deun J, Hendrix A. Is your article EV-TRACKed? *J Extracell Vesicles.* 2017;6:1379835. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1379835>
54. Kim D-K, Kang B, Kim OY, Choi D-S, Lee J, Kim SR, *et al.* EVpedia: An integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2013;2. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20384>
55. Kim D-K, Lee J, Kim SR, Choi D-S, Yoon YJ, Kim JH, *et al.* EVpedia: A community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinformatics.* 2015;31:933-9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu741>
56. Simpson RJ, Kalra H, Mathivanan S. ExoCarta as a resource for exosomal research. *J Extracell Vesicles.* 2012;1:18374. <https://doi.org/10.3402/jev.v1i0.18374>
57. Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, *et al.* ExoCarta: A web-based compendium of exosomal cargo. *J Mol Biol.* 2016;428:688-92. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.019>
58. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, *et al.* Vesiclepedia: A compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol.* 2012;10:e1001450. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001450>
59. Pathan M, Fonseka P, Chitti SV, Kang T, Sanwlani R, van Deun J, *et al.* Vesiclepedia 2019: A compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Res.* 2019;47:D516-D9. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1029>
60. Ainsztein AM, Brooks PJ, Dugan VG, Ganguly A, Guo M, Howcroft TK, *et al.* The NIH Extracellular RNA Communication Consortium. *J Extracell Vesicles.* 2015;4:27493. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27493>
61. Murillo OD, Thistlethwaite W, Rozowsky J, Subramanian SL, Lucero R, Shah N, *et al.* exRNA Atlas analysis reveals distinct extracellular RNA cargo types and their carriers present across human biofluids. *Cell.* 2019;177:463-77.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.018>
62. Liu T, Zhang Q, Zhang J, Li C, Miao Y-R, Lei Q, *et al.* EVmiRNA: A database of miRNA profiling in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Res.* 2018;47:D89-D93. <https://doi.org/10.1093/nar/gky985>
63. Pathan M, Keerthikumar S, Ang C-S, Gangoda L, Quek CYJ, Williamson NA, *et al.* FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. *Proteomics.* 2015;15:2597-601. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400515>
64. Pathan M, Keerthikumar S, Chisanga D, Alessandro R, Ang C-S, Askenase P, *et al.* A novel community driven software for functional enrichment analysis of extracellular vesicles data. *J Extracell Vesicles.* 2017;6:1321455. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1321455>
65. Lässer C, Théry C, Buzás EI, Mathivanan S, Zhao W, Gho YS, *et al.* The International Society for Extracellular Vesicles launches the first massive open online course on extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2016;5:34299. <https://doi.org/10.3402/jev.v5.34299>
66. Taylor DD, Shah S. Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. *Methods.* 2015;87:3-10. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.02.019>

67. Bobrie A, Colombo M, Krumeich S, Raposo G, Théry C. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles*. 2012;1:18397. <https://doi.org/10.3402/jev.v1i0.18397>
68. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology*. 30. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.; 2006. p. 3.22.1-3..9.
69. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, *et al*. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113:E968-77. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521230113>
70. Popovic M. Routine and novel methods for isolation of extracellular vesicles. *Biologia Serbica*. 2019;41:36-43. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3532082>
71. Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP. Isolation of extracellular vesicles: General methodologies and latest trends. *Biomed Res Int*. 2018;2018:8545347. <https://doi.org/10.1155/2018/8545347>
72. Boriachek K, Islam MN, Möller A, Salomon C, Nguyen N-T, Hossain MSA, *et al*. Biological functions and current advances in isolation and detection strategies for exosome nanovesicles. *Small*. 2018;14:1702153. <https://doi.org/10.1002/smll.201702153>
73. Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, Lekka M, Siedlar M, Baran J. The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. *Int J Mol Sci*. 2017;18:1153. <https://doi.org/10.3390/ijms18061153>
74. Livshits MA, Khomyakova E, Evtushenko EG, Lazarev VN, Kulemin NA, Semina SE, *et al*. Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci Rep*. 2015;5:17319. <https://doi.org/10.1038/srep17319>
75. Yang JS, Lee JC, Byeon SK, Rha KH, Moon MH. Size dependent lipidomic analysis of urinary exosomes from patients with prostate cancer by flow field-flow fractionation and nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2017;89:2488-96. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04634>
76. Kanwar SS, Dunlay CJ, Simeone DM, Nagraath S. Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes. *Lab Chip*. 2014;14:1891-900. <https://doi.org/10.1039/C4LC00136B>
77. Contreras-Naranjo JC, Wu H-J, Ugaz VM. Microfluidics for exosome isolation and analysis: Enabling liquid biopsy for personalized medicine. *Lab Chip*. 2017;17:3558-77. <https://doi.org/10.1039/c7lc00592j>
78. Koritzinsky EH, Street JM, Chari RR, Glispie DM, Bellomo TR, Aponte AM, *et al*. Circadian variation in the release of small extracellular vesicles can be normalized by vesicle number or TSG101. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2019;317:F1098-110. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00568.2017>
79. Mateescu B, Kowal EJK, van Balkom BWM, Bartel S, Bhattacharyya SN, Buzás EI, *et al*. Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA – an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles*. 2017;6:1286095. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1286095>
80. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Théry C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol*. 2019;21:9-17. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>
81. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles*. 2014;3:24641. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641>
82. Veiga-del Cabo J, Jaén-Casquero MB, Hernández-Villegas S. Acceso y difusión de la producción científica iberoamericana: Biblioteca Virtual en Salud y Modelo de publicación electrónica SciELO. *Educación Médica*. 2004;7:23-6.
83. Acharya A, Verstak A. Google Scholar. Fecha de consulta: 5 de junio de 2020. Disponible en: <https://scholar.google.com/>
84. Gil-Bona A, Llama-Palacios A, Parra CM, Vivanco F, Nombela C, Monteoliva L, *et al*. Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*. *J Proteome Res*. 2015;14:142-53. <https://doi.org/10.1021/pr5007944>

85. Ospina-Prieto S, Chaiwangyen W, Schleussner E, Markert UR, Morales-Prieto DM. Role of EMVs containing miR-141 in the intercellular communication of trophoblastic and immune cells. *J Reprod Immunol*. 2015;111:21-2. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2015.06.012>
86. de la Torre-Gómez C, Goreham RV, Bech Serra JJ, Nann T, Kussmann M. "Exosomics" -A review of biophysics, biology and biochemistry of exosomes with a focus on human breast milk. *Front Genet*. 2018;9:92. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00092>
87. MinCiencias. Repositorio Principal CENDOC. Fecha de consulta: 25 de febrero de 2020. Disponible en: <http://repositorio.colciencias.gov.co/>
88. MinCiencias. Buscador Proyectos. Fecha de consulta: 25 de febrero de 2020. Disponible en: https://sba.minciencias.gov.co/Buscador_Proyectos/busqueda?q=&pagenum=1&start=0&ty pe=load.
89. MinCiencias. Buscador Productos. Fecha de consulta: 25 de febrero de 2020. Disponible en: https://sba.minciencias.gov.co/Buscador_Productos/busqueda?q=&pagenum=1&start=0&ty pe=load.
90. Kwon Y, Nukala SB, Srivastava S, Miyamoto H, Ismail NI, Jousma J, *et al*. Detection of viral RNA fragments in human iPSC cardiomyocytes following treatment with extracellular vesicles from SARS-CoV-2 coding sequence overexpressing lung epithelial cells. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11:514. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02033-7>
91. Pocsfalvi G, Mammadova R, Ramos-Juárez AP, Bokka R, Trepiccione F, Capasso G. COVID-19 and extracellular vesicles: An intriguing interplay. *Kidney Blood Press Res*. 2020;45:661-70. <https://doi.org/10.1159/000511402>
92. Hassanpour M, Rezaie J, Nouri M, Panahi Y. The role of extracellular vesicles in COVID-19 virus infection. *Infect Genet Evol*. 2020;85:104422. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104422>
93. Popowski KD, Dinh P-UC, George A, Lutz H, Cheng K. Exosome therapeutics for COVID-19 and respiratory viruses. *VIEW*. 2021. ¿Volumen y páginas? <https://doi.org/10.1002/VIW.20200186>
94. Bratulic S, Gatto F, Nielsen J. The translational status of cancer liquid biopsies. *regenerative engineering and translational medicine*. 2019. ¿Volumen y páginas? <https://doi.org/10.1007/s40883-019-00141-2>
95. Campos CDM, Jackson JM, Witek MA, Soper SA. Molecular profiling of liquid biopsy samples for precision medicine. *Cancer J*. 2018;24:93-103. <https://doi.org/10.1097/ppo.0000000000000311>
96. Zhou J, Wu Z, Hu J, Yang D, Chen X, Wang Q, *et al*. High-throughput single-EV liquid biopsy: Rapid, simultaneous, and multiplexed detection of nucleic acids, proteins, and their combinations. *Sci Adv*. 2020;6:eabc1204. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc1204>
97. Kim IA, Hur JY, Kim HJ, Lee SE, Kim WS, Lee KY. Liquid biopsy using extracellular vesicle-derived DNA in lung adenocarcinoma. *J Pathol Transl Med*. 2020;54:453-61. <https://doi.org/10.4132/jptm.2020.08.13>

Revisión de tema

Sarcopenia y albúmina sanguínea: revisión sistemática con metaanálisis

Jack Roberto Silva-Fhon^{1,2}, Violeta Magdalena Rojas-Huayta³, Juan Pablo Aparco-Balboa³, Bernardo Céspedes-Panduro^{3,4,5}, Rosalina Aparecida Partezani-Rodrigues⁶

¹ Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

² Centro Brasileiro para o Cuidado à Saúde Baseado em Evidências: Centro de Evidência do JBI, São Paulo, Brasil

³ Núcleo de Investigación en Alimentación y Nutrición Pública, Escuela de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

⁴ Escuela de Estadística, Facultad de Matemáticas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

⁵ Facultad de Estudios Generales, Universidad Privada del Norte, Lima, Perú

⁶ Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil

La sarcopenia se caracteriza por la pérdida de musculatura durante el envejecimiento, lo que puede traer consecuencias para la salud. Se detecta de diversas formas, una de ellas, el uso de biomarcadores sanguíneos como la albúmina, aunque todavía no se ha establecido dicha asociación de forma definitiva.

Esta revisión sistemática y metaanálisis resume el conocimiento sobre la asociación entre sarcopenia y albúmina sérica en los adultos mayores, centrada en la etiología y los factores de riesgo. La revisión se hizo utilizando el programa del *Joanna Briggs Institute* y la búsqueda incluyó las bases de datos Medline, Embase, CINAHL, y LILACS; la búsqueda manual estuvo a cargo de dos revisores de forma independiente. Para el metaanálisis, se utilizó el programa EpiDat, versión 3.1; las diferencias de medias en los puntajes de albúmina desagregados por sarcopenia se analizaron mediante el modelo de efectos aleatorios. El grado de heterogeneidad se evaluó con la prueba Q de DerSimonian y Laird. Se analizaron 630 artículos, de los cuales 14 se incluyeron en la revisión. En el metaanálisis, se evidenciaron mayores cantidades de albúmina sanguínea en los adultos mayores que no presentaron sarcopenia frente a los que sí, una diferencia con significación estadística. Aunque hay estudios en los que se explora la asociación entre albúmina y sarcopenia, persiste la necesidad de evaluar la asociación entre los marcadores biológicos, comparándolos entre sí para determinar cuáles pueden utilizarse en la detección de sarcopenia en el adulto mayor.

Palabras clave: sarcopenia; albúminas; anciano; biomarcadores; revisión sistemática; metaanálisis; envejecimiento.

Sarcopenia and blood albumin: A systematic review with meta-analysis

Sarcopenia is characterized by loss of muscle mass during aging, which can have consequences for the individuals' health. There are many ways to detect it, among them, with the use of blood biomarkers such as albumin, although the association between the two has not been confirmed yet.

This review synthesizes the knowledge on the association between sarcopenia and serum albumin among elderly individuals through a systematic review and meta-analysis focused on the etiology and risk factors. We used the Joanna Briggs Institute software for the review and conducted a search in MEDLINE, Embase, CINAHL, and LILACS databases while two reviewers conducted an independent manual search. EpiDat, version 3.1 was used for the meta-analysis; mean differences with the albumin scores disaggregated by sarcopenia were analyzed by the random-effects model. The degree of heterogeneity was assessed with the DerSimonian and Laird Q test.

We analyzed 630 articles and finally included 14 in the review. Higher blood albumin levels were found in the meta-analysis, which was statistically significant among the elderly adults who did not present sarcopenia compared to those who did. Although there are studies exploring the association between albumin and sarcopenia, there is a need to continue evaluating its association with biological markers and comparing them to verify which can be used to detect sarcopenia among the elderly.

Keywords: Sarcopenia; albumins; aged; biomarkers; systematic review; meta-analysis; aging.

Recibido: 12/08/2020

Aceptado: 22/04/2021

Publicado: 26/04/2021

Citación:

Silva-Fhon JR, Rojas-Huayta VM, Aparco-Balboa JP, Céspedes-Panduro B, Partezani-Rodrigues RA. Sarcopenia y albúmina sanguínea: revisión sistemática con metaanálisis. *Biomédica*. 2021;41:590-603.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.5765>

Correspondencia:

Jack Roberto Silva-Fhon, Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar 419, Bairro Cerqueira César, São Paulo, SP, Brasil.
Teléfono: (+5511) 3061 8833
betofhon@usp.br

Contribución de los autores:

Jack Roberto Silva-Fhon, Violeta Magdalena Rojas-Huayta y Juan Pablo Aparco-Balboa: concepción, diseño del trabajo, análisis, interpretación de los datos y escritura del manuscrito
Bernardo Céspedes-Panduro: análisis estadístico y metaanálisis e interpretación de los resultados
Rosalina Aparecida Partezani-Rodrigues: diseño y escritura del manuscrito.

Financiación:

Financiada por los propios autores

Conflicto de intereses:

No existen conflictos de intereses.

El informe de las Naciones Unidas sobre envejecimiento de la población mundial refiere que, en las próximas tres décadas, el número global de personas mayores de 65 años se duplicará, llegando a más de 2.000 millones para el 2050 (1). El acentuado incremento de la población de adultos mayores es una oportunidad para brindarles todas las condiciones necesarias para que tengan un envejecimiento saludable hasta donde lo permitan los cambios estructurales y funcionales propios del proceso de maduración biológica (2).

Sarcopenia y albúmina en el adulto mayor

La pérdida progresiva de funcionalidad y el aumento de la mortalidad representan procesos fundamentales del envejecimiento biológico intrínsecos en la mayoría de los sistemas celulares. El deterioro muscular durante el envejecimiento se produce por dos mecanismos subyacentes que regulan la disminución de la masa y la función muscular: atrofia y pérdida de fibra muscular, también llamada hipoplasia (3,4).

Uno de los síndromes relacionados con la atrofia muscular es la sarcopenia. Según el último consenso europeo, esta se considera una enfermedad muscular en la que ocurre una disminución de la fuerza y la masa muscular, lo cual determina el inicio de la investigación diagnóstica. Por otro lado, la disminución de la actividad física es una medida de la gravedad de la sarcopenia en el adulto mayor (5). Se estima que la prevalencia de sarcopenia en Suramérica es de alrededor de 13,9 % (IC_{95%} 12,0-15,8 %); además, es significativamente mayor entre los adultos mayores con baja escolaridad y nivel socioeconómico, que no tienen compañero, son fumadores, sedentarios y tienen bajo índice de masa corporal (6).

Por otra parte, la pérdida significativa de masa muscular en personas de edad avanzada se ha asociado con bajos niveles de albúmina sérica, proteína que se considera un indicador clave del estado nutricional (7,8). Sin embargo, la concentración de albúmina se ve afectada también por procesos inflamatorios e infecciosos, entre otros, por lo que aún no hay consenso sobre sus límites óptimos y los rangos de referencia de sus valores séricos para la evaluación del estado nutricional en el adulto mayor (8,9).

Considerando que el estado nutricional deficiente y la sarcopenia pueden superponerse, la albúmina sérica podría considerarse como un biomarcador para la detección de este síndrome, ya que no se dispone de otros que sean de fácil aplicación y bajo costo, y garanticen una evaluación oportuna y una pronta intervención (9). Sin embargo, todavía no hay evidencia concluyente para considerar la albúmina como biomarcador de la sarcopenia.

Dado el importante incremento de la población de adultos mayores y la significativa prevalencia de sarcopenia en este grupo poblacional, es imprescindible evaluar marcadores biológicos que permitan diagnosticarla de manera rápida y sencilla, con la finalidad de prevenir este síndrome, mejorar el estado nutricional, y promover un envejecimiento activo y saludable.

En ese sentido, los integrantes de los grupos de investigación *Prática Pedagógica no Ensino Superior de Enfermagem e no Cuidado à Saúde do Adulto e Idoso* de la *Universidade de São Paulo* y el Núcleo de Investigación en Alimentación y Nutrición Pública de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, desarrollaron el presente estudio para contribuir a que los profesionales de la salud comprendan la importancia de valorar y detectar la sarcopenia asociada con biomarcadores sanguíneos como la albúmina sérica. En ese marco, se resumió la información sobre dicha asociación en los adultos mayores por medio de una revisión sistemática con metaanálisis.

Desarrollo de la revisión

En la revisión sistemática con metaanálisis, se utilizaron la metodología y las pautas del Joanna Briggs Institute, cuyo objetivo es proporcionar una síntesis exhaustiva e imparcial de estudios relevantes en un solo documento mediante métodos rigurosos y transparentes en la búsqueda de evidencia relevante para la pregunta de estudio (10).

En el estudio se plantearon las siguientes etapas: 1) título de la revisión; 2) objetivo y pregunta del estudio; 3) introducción (antecedentes); 4) criterios de inclusión; 5) métodos (estrategia de búsqueda, evaluación crítica, selección de los estudios y síntesis de los datos); 6) resultados; 7) discusión, y 8) conclusión y recomendaciones (11).

En el título, se recogieron los elementos principales de la pregunta en estudio y se aseguró que se relacionara con el objetivo y los criterios de inclusión. En la formulación del objetivo y la pregunta de la revisión, se utilizó la estrategia PEO, en la cual P es la población (adultos mayores), E es la exposición de interés (estado nutricional determinado con base en la detección de albúmina sanguínea) y O es el resultado (sarcopenia). Esta estrategia facilitó la formulación de la siguiente pregunta: ¿Qué conocimiento está disponible en la literatura médica sobre la asociación entre la sarcopenia y el estado nutricional medido con base en la albúmina sanguínea en los adultos mayores?

Los criterios de inclusión fueron los siguientes: estudios con participantes de 60 años de edad o más, independientemente del sexo, el origen étnico, el estado social y los diferentes entornos (hospital, casa o casas de reposo); estudios longitudinales en los idiomas portugués, inglés y español, sin límite de fecha de publicación. Los criterios de exclusión, por otra parte, fueron: estudios de revisión; tesis; capítulos de libros; informes técnicos, resúmenes publicados y cartas al editor.

La búsqueda de estudios se hizo el 9 de julio de 2020, con una actualización el 12 de abril de 2021, en las bases de datos *National Center for Biotechnology Information* (NCBI/PubMed), *Cumulative Index to Nursing and Allied Health Literature* (CINAHL), *Excerpta Medical Database* (EMBASE) y *Latin-American and Caribbean Center on Health Sciences Information* (LILACS), empleando los descriptores y palabras clave presentadas en el cuadro 1. Además, se utilizaron los operadores booleanos OR y AND para obtener combinaciones sumatorias y restrictivas, respectivamente.

En la recopilación de la información, se siguieron las recomendaciones del *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA), con el fin de aumentar el número de publicaciones, y proporcionar información más completa y transparente (12), con lo que se encontraron 630 artículos. Posteriormente, se eliminaron los artículos duplicados y dos revisores independientes cegados leyeron los títulos y los resúmenes.

Después de esta selección, un tercer revisor analizó y decidió, conjuntamente con los revisores, la inclusión o exclusión de cada artículo, especialmente cuando existía algún conflicto sobre la decisión de incluir el artículo, con lo que se totalizaron 14 para la revisión. Después de la selección con el tercer revisor, se hizo una búsqueda manual a partir de las referencias de los estudios seleccionados.

Cuadro 1. Estrategia de búsqueda de los artículos en las diferentes bases de datos, y descriptores y palabras clave empleadas. Periodo: julio de 2021

	P	E	O
Inglés (PubMed - MeSH)	Aged AND elderly OR older OR older people OR ancient OR elderly people OR very elderly	Albumins AND Hypoalbuminemia OR Albumin OR serum albumin OR Albuminoid OR hypoalbuminemia	Sarcopenia AND sarcopenias
Portugués (DeCS)	Idoso AND pessoa idosa OR pessoa de idade OR pessoas idosas OR pessoas de idade OR população idosa OR centenários OR velhíssimos	Albuminas AND Albumina OR Albumina plasmática OR albumina do plasma OR Albumina sérica humana	Sarcopenia
Español (DeCS)	Anciano AND adulto mayor OR persona de edad OR viejo OR población anciana OR personas adultos mayores	Albúminas AND albúmina plasmática OR albúmina plasmática OR Albúmina sérica humana	Sarcopenia

Para la extracción de los datos de los estudios, se creó un instrumento con detalles específicos relacionados con el tema y el objetivo de la revisión, tales como autor(es), año de publicación, tipo de periódico, idioma, país, título, objetivos, población, contexto, tipos de estudio y método, tamaño de la muestra, enfoque de la albúmina sanguínea, prevalencia de sarcopenia y resultados de los análisis realizados. La información se agrupó en cuadros según la presentación de las medidas de asociación entre las variables estudiadas. La extracción de los datos tiene la finalidad de caracterizar el estudio publicado en cuanto a sus aspectos generales y el método utilizado en la investigación, así como a sus respectivos resultados.

Los resultados se presentaron en forma de síntesis narrativa, caracterizada por el análisis de los datos cuantitativos y, una vez expuestos, la discusión, las conclusiones y las recomendaciones se presentaron en la parte final del estudio.

La calidad metodológica de los estudios seleccionados para la presente revisión se garantizó con dos evaluadores que utilizaron la herramienta *Methodological Index for Non-Randomized Studies* (MINORS) (13), compuesta por ocho ítems: objetivo claramente establecido; inclusión de pacientes consecutivos; recolección prospectiva de datos; resultados adecuados al objetivo del estudio; evaluación imparcial de los resultados del estudio; período de seguimiento adecuado para los fines del estudio; pérdida en el seguimiento inferior al 5 %, y cálculo prospectivo del tamaño de la muestra. Cada dominio tiene un puntaje de cero a dos y uno global de cero a 16 puntos (13).

Para el análisis estadístico, se utilizó el programa EpiDat, versión 3.1; se hizo un metaanálisis para las diferencias de medias con los puntajes de albúmina desagregados por sarcopenia mediante el modelo de efectos aleatorios, dada la heterogeneidad de los resultados individuales. El grado de heterogeneidad se evaluó con la prueba Q de DerSimonian y Laird, en tanto que, con el gráfico de Galbraith, se valoró el sesgo de publicación utilizando un gráfico de embudo y el valor estadístico de Begg. La sensibilidad se analizó con el método gráfico de influencias, así como el metaanálisis acumulado, para evidenciar los cambios en el puntaje global por la adición de cada estudio individual.

Además, se utilizó un diagrama de bosque para el resultado total del metaanálisis, con el fin de evidenciar las diferencias en cada estudio y globalmente, con sus respectivos intervalos de confianza. En todos los análisis, la significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

Selección de los artículos incluidos en la revisión

De los 630 artículos encontrados en las cuatro bases de datos, 131 eran duplicados, con lo que quedaron 499 para la lectura de los títulos y resúmenes. De estos, se excluyeron 420 por no cumplir con los criterios de inclusión y, después de su evaluación, se seleccionaron 79 artículos para su lectura integral. Posteriormente, se excluyeron 65 artículos, lo que resultó en 14 estudios incluidos (figura 1).

Los años de publicación de los 14 estudios analizados (cuadro 2) fueron del 2013 al 2020: cinco en el 2016 (20-24), tres en el 2018 (16-18), dos en el 2013 (26,27) y uno en el 2015 (25), uno en el 2017 (19), otro en el 2019 (15) y otro en el 2020 (14). En cuanto al idioma, todos los estudios fueron publicados en inglés. Con respecto al país, se encontró que 11 se realizaron en China, Japón o Corea, y tres, en el Reino Unido e Italia.

En lo que respecta al diseño del estudio, se verificó que siete eran longitudinales prospectivos y, el resto, retrospectivos. Entre los 14 estudios, se alcanzó una muestra de 4.071 participantes, la más pequeña con 71 (22) y la mayor con 538 (25). Además, se encontró que la menor media de edad fue de 65,14 (24) y, la mayor, de 83,34 (15).

Los estudios se hicieron en adultos mayores ubicados en diferentes lugares: 11 en servicios de hospitalización, dos en el domicilio y uno en un consultorio de geriatría. Además, seis estudios se hicieron en adultos mayores con diagnóstico de cáncer, seis en personas evaluadas de rutina, uno estaba en el periodo posoperatorio de una fractura y otro tenía diagnóstico médico de demencia.

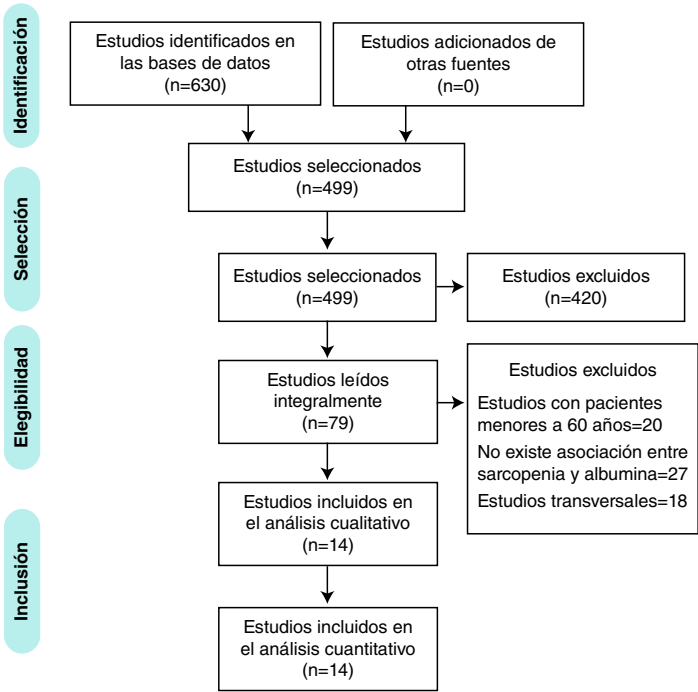


Figura 1. Diagrama de flujo PRISMA para la selección de los artículos.

Cuadro 2. Características de los estudios incluidos en la revisión sistemática según autores, población, variables demográficas, método, sarcopenia y albúmina.

Autor/año	Población	Edad (Media; DE)	Sexo (%)	Método de estudio	Método para identificar la sarcopenia	Prevalencia de sarcopenia	Valor de la albúmina (DE) g/L
Abbas, <i>et al.</i> , 2020 (14)	462	Sarcopenia 82,23 No sarcopenia 80,93	Hombres (29,2) Mujeres (70,89)	Longitudinal prospectivo	European Working Group on Sarcopenia in Older People	33,5 %	Sarcopenia 3,38 (0,05)
Gong, <i>et al.</i> , 2019 (15)	168	83,34 (7,32)	Hombres 99 (58,93); Mujeres 69 (41,07)	Longitudinal retrospectivo	Asian Working Group for Sarcopenia	72,02 %	Sarcopenia 32,64 (3,41) No sarcopenia 38,60 (2,03)
DAlessandro, <i>et al.</i> , 2018 (16)	80	73,7 (7,2)	———	Longitudinal prospectivo	European Working Group on Sarcopenia in Older People	60–74 = 12,5 % ≥75 = 55 %	Sarcopenia 4,0 (0,4) No sarcopenia 4,1 (0,2)
Gariballa, <i>et al.</i> , 2018 (17)	432	Sarcopenia 79 (7) No sarcopenia 77 (6)	———	Longitudinal prospectivo	European Working Group on Sarcopenia in Older People	10 %	Sarcopenia 35,5 (5) No sarcopenia 38,1 (5)
Yoo, <i>et al.</i> , 2018 (18)	327	77,76 (9,7)	Hombres 78 (23,9); Mujeres 249 (76,1)	Longitudinal retrospectivo	Asian Working Group for Sarcopenia	37,3 %	Sarcopenia Hombre 3,68 (0,4) Sarcopenia Mujer 3,76 (0,44)
Zhou, <i>et al.</i> , 2017 (19)	240	73 (7)	Hombres 190 (79,2); Mujeres 50 (20,8)	Longitudinal prospectivo	Tomografía axial	28,8 %	Sarcopenia 35,22 (4,12) No sarcopenia 37,31 (4,31)
Harimoto, <i>et al.</i> , 2016 (20)	296	<70 hombres 123 <70 mujeres 34 ≥70 hombres 98 ≥70 mujeres 41	———	Longitudinal retrospectivo	Tomografía axial	37,8 %	< 70 años 4,0 (0,5) ≥ 70 años 3,9 (0,5)
Hirasawa, <i>et al.</i> , 2016 (21)	136	68,6	Hombres (82,4)	Longitudinal retrospectivo	Tomografía axial	47,8 %	Sarcopenia 3,8 (0,006) No sarcopenia 4,1 (0,05)
Ishihara, <i>et al.</i> , 2016 (22)	71	Sarcopenia 65,5 No sarcopenia 61	Hombres 50 (70,4) Mujeres 21 (29,6)	Longitudinal prospectivo	Tomografía axial	63,4 %	Sarcopenia 3,90 (4,0) No sarcopenia 4,38 (4,4)
Sugimotoa, <i>et al.</i> , 2016 (23)	418	77,3 (7,0)	Hombres 139 (33,3); Mujeres 279 (66,8)	Longitudinal retrospectivo	European Working Group on Sarcopenia in Older People	21,1 %	Sarcopenia 4,4 (0,3) No sarcopenia 4,4 (0,3)
Wang, <i>et al.</i> , 2016 (24)	255	65,14 (10,81)	Hombres 190 (74,5) Mujeres 65 (25,5)	Longitudinal prospectivo	European Working Group on Sarcopenia in Older People	12,5 %	Sarcopenia 34,01 (4,10) No sarcopenia 38,26 (4,02)
Kim, <i>et al.</i> , 2015 (25)	538	No sarcopenia 78,0 (2,6); Sarcopenia 78,5 (2,4)	Mujeres (100)	Longitudinal prospectivo	European Working Group on Sarcopenia in Older People	39,6 %	General 4,27 (0,22)
Gariballa, <i>et al.</i> , 2013 (26)	432	Sarcopenia 79 (7,0); No sarcopenia 77 (6,0)	———	Longitudinal prospectivo	European Working Group on Sarcopenia in Older People	10 %	Sarcopenia 35,5 (5) No sarcopenia 38 (5)
Harimoto, <i>et al.</i> , 2013 (27)	186	Sarcopenia 67 (11) No sarcopenia 66 (10)	———	Longitudinal retrospectivo	Tomografía Axial	40,3 %	Sarcopenia 3,8 (0,4) No sarcopenia 4,0 (0,4)

La detección de la sarcopenia en los 14 estudios de la revisión respondió a diversos criterios diagnósticos: en siete estudios, se usaron los criterios del *European Working Group on Sarcopenia in Older People*; en cinco, la tomografía computarizada y, en dos, los criterios del *Asian Working Group for Sarcopenia*.

La prevalencia de sarcopenia en el adulto mayor varió entre el 10 (17) y el 72,02 % (15). Además, algunos estudios caracterizaron la sarcopenia según el sexo. En el estudio de Gariballa, *et al.* (17), se estableció que 29 (66 %) hombres y 176 (45 %) mujeres presentaban sarcopenia. En la otra publicación de Gariballa, *et al.* (26), se detectó en 29 (66 %) mujeres. Además, Harimoto, *et al.* (27), determinaron que 50 hombres y 25 mujeres presentaban sarcopenia (cuadro 2).

Los autores de los artículos propusieron diferentes análisis estadísticos para asociar la sarcopenia con la albúmina (cuadro 3). Algunos utilizaron la prueba t de Student o la de ji al cuadrado; otros emplearon la regresión lineal para determinar los coeficientes de asociación, así como la regresión logística para obtener el *Odds Ratio* (OR) y el *Hazard Ratio* (HR).

En la evaluación de la calidad metodológica con el instrumento MINORS, la suma de las categorías de todos los estudios dio un total de 11,21 puntos. Los ítems con menor puntuación fueron la pérdida en el seguimiento, con <5 %, la recolección prospectiva de los datos y el cálculo prospectivo del tamaño del estudio.

En cuanto a la sarcopenia, se confirmó una elevada dispersión entre los estudios incluidos, como se observa en la figura 2A, en la prueba de Galbraith y el valor estadístico Q, con $p=0,0233$. Asimismo, se observó la ausencia de sesgos de publicación sobre el tema de estudio mediante el gráfico de embudo de la figura 2B y la prueba de Begg, con $p=0,8065$.

Cuadro 3. Tipo de análisis para establecer la asociación de sarcopenia y albúmina

Autor/año	Instrumento de diagnóstico de sarcopenia	Resultado	p
Regresión logística (OR)			
Kim, et al., 2015 (25)	Indicador de sarcopenia	0,84 IC: 0,76;0,94	0,05
Regresión logística (HR)			
Harimoto, et al., 2013 (27)	Tomografía axial	0,47 IC: 0,21;1,14	0,092
Regresión lineal			
Abbas, et al., 2020 (14)	EWGSOP	-0,07 (-0,179 -0,046	0,244
Prueba t de Student			
Gong, et al., 2019 (15)	EWGSOP	-	0,05
D'Alessandro, et al., 2018 (16)	EWGSOP	4,0 (0,4)	0,21
Gariballa, et al., 2018 (17)	EWGSOP	35,5 (5)	0,05
Yoo, et al., 2018 (18)	AWGS - Hombres	3,68 (0,4)	0,295
	- Mujeres	3,76 (0,44)	0,084
Harimoto, et al., 2016 (20)	Tomografía axial	3,8 (0,4)	0,9717
Sugimotoa Sugimoto, et al., 2016 (23)	EWGSOP	4,4 (0,3)	0,137
Gariballa, et al., 2013 (26)	EWGSOP	35,5 (5)	0,05
Ji al cuadrado			
Zhou, et al., 2017 (19)	Tomografía axial	35,22 (4,12)	0,001
Hirasawa, et al., 2016 (21)	Tomografía axial	3,8 (0,06)	<0,001
Ishihara, et al., 2016 (22)	Tomografía axial	3,90 (4,0;5,0)	<0,0001
Wang, et al., 2016 (24)	EWGSOP	34,01 (4,10)	<0,0001

EWGSOP: *European Working Group on Sarcopenia in Older People*; AWGS: *Asian Working Group on Sarcopenia*

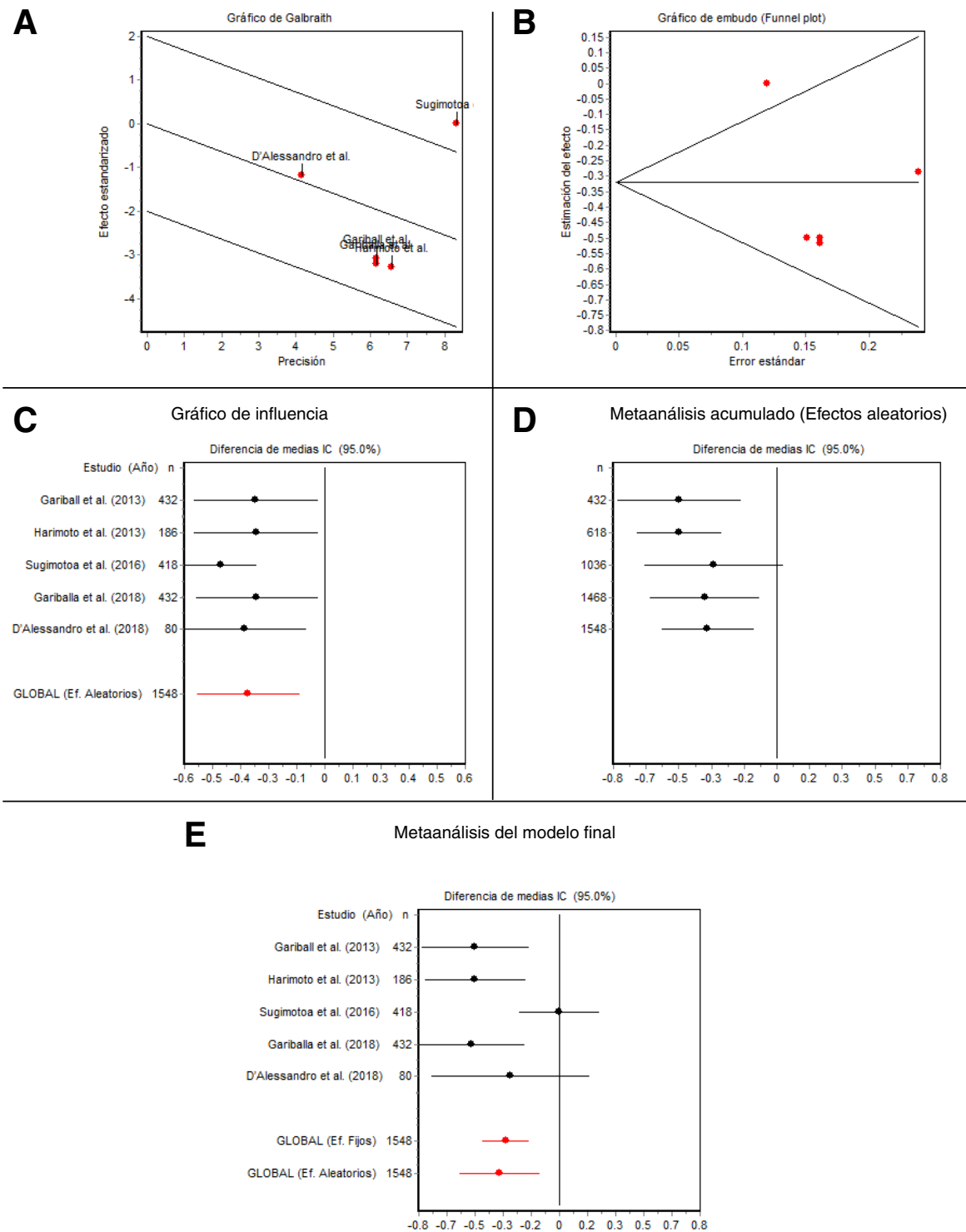


Figura 2. Metaanálisis de sarcopenia y albúmina sanguínea

En el análisis de sensibilidad, se observó que los intervalos de confianza de las diferencias del puntaje promedio entre presencia o ausencia de sarcopenia y los valores de albúmina, fueron diferentes a cero (figura 2C). En el análisis que se presenta en la figura 2D, se evidencia que la adición sucesiva de las diferencias en los estudios no afectó el resultado final porque seguían siendo estadísticamente significativas.

En el metaanálisis final de los estudios, se observó que, entre las diferencias según la sarcopenia, el puntaje de la albúmina sanguínea fue estadísticamente mayor en los participantes que no la tenían frente a los que sí la presentaban, con excepción del estudio de Sugimotoa, *et al.* (23), en el que fueron iguales en el modelo de efectos aleatorios (figura 2E).

En los estudios individuales, las diferencias por sarcopenia registraron puntajes de albúmina sanguínea favorables para quienes no tenían sarcopenia; asimismo, en la medida global, se evidenciaron mayores puntajes entre quienes no presentaban sarcopenia, con una diferencia de -0,3530 (IC95% -0,5900 a -0,1160).

Los resultados de esta revisión y metaanálisis muestran que los mayores valores de albúmina sérica se asociaron significativamente con la ausencia de sarcopenia en los adultos mayores. Se observó que la clasificación de la sarcopenia con base en la albúmina fue significativa en todos los estudios analizados. Sin embargo, no se estableció una asociación entre ambas variables de estudio.

Mecanismo y prevalencia de la sarcopenia en el adulto mayor

En el estudio se determinó que la prevalencia de sarcopenia varió según la población de estudio y los factores asociados con ella. La sarcopenia implica una disminución progresiva de masa y fuerza o función del músculo esquelético con la edad, lo que implica un mayor riesgo de resultados adversos en salud. Existen procesos que contribuyen a la atrofia muscular y que están relacionados con edad, estado hormonal alterado, inflamación crónica, desequilibrio de la oxidorreducción, pérdida de las neuronas motoras α , disfunción mitocondrial muscular, alteración de la autofagia de miocitos, apoptosis acelerada de los mionúcleos y deterioro de la función de las células satélite (28).

En el proceso de envejecimiento, se dan diferentes mecanismos de atrofia de la fibra muscular que se relacionan con el desequilibrio en la síntesis y descomposición de las proteínas musculares, la resistencia anabólica a señales ambientales fundamentales, como la actividad física y el estado nutricional, que regulan la homeostasis muscular diurna y subyacen a las perturbaciones catabólicas relacionadas con la edad en la proteostasis muscular (29). Además, existen diversas causas subyacentes, entre ellas, se destacan la iatrogénica, la nutricional, la inactividad física, las enfermedades endocrinas, las metabólicas, las neurológicas y las osteoarticulares, entre otras (30).

En cuanto al diagnóstico de sarcopenia, en los estudios analizados se emplearon diferentes métodos. En este sentido, el problema central es que en la actualidad no hay un método único para determinar con precisión la masa muscular (30). Las mediciones antropométricas de la pantorrilla, por ejemplo, requieren puntos de corte por edad, sexo y raza, y deben considerarse algunas circunstancias como la obesidad o la retención de líquidos, por lo cual no tienen un buen desempeño diagnóstico (31).

Otras aproximaciones más precisas, como la absorciometría de rayos X (DEXA), la resonancia magnética o la tomografía computarizada, requieren de equipo y personal especializado, por lo que se emplean más en estudios de investigación que en el diagnóstico de sarcopenia como procedimiento de rutina por su alto costo (32). La bioimpedancia eléctrica (BIA), por su parte, es menos precisa, y está influenciada por la temperatura corporal y el estado de hidratación, entre otros factores (33).

Frente a estas dificultades, la sarcopenia se diagnostica mediante la prueba funcional del músculo y la evaluación de la fuerza. Sin embargo, estos estudios también requieren algunos equipos, instrumentos para determinar la fuerza, así como áreas especiales y, además, existen diversos criterios y puntos de corte que deben ser validados para cada población de estudio (30).

En esta revisión se estableció que la proporción de adultos mayores considerados sarcopénicos varió entre 10 (15,26) y 72,02 % (17) con los diferentes métodos de evaluación y que hubo una estratificación de la sarcopenia según la edad, con predominio en aquellos con edad igual o superior a 75 años (16). En varios estudios se demostró que, después de la octava década de la vida, las concentraciones de testosterona en los hombres disminuyen rápidamente, lo que puede contribuir a la pérdida de la masa corporal magra y al aumento de la sarcopenia (34,35).

La sarcopenia relacionada con la edad es un problema grave de salud mundial en los adultos mayores y tiene implicaciones para la comunidad, ya que lleva a la incapacidad, y constituye una carga económica significativa para la familia y los servicios de salud (35). Las evidencias muestran que, a medida que aumenta la edad, la frecuencia de sarcopenia también aumenta, especialmente después de los 80 años. Además de la edad, existen otros factores asociados que aumentan la sarcopenia, como el estilo de vida, los hábitos de ejercicio, la presencia de enfermedades y la disminución de las concentraciones hormonales (36).

Sarcopenia y albúmina en el adulto mayor

Por otro lado, las evidencias sobre los biomarcadores para la sarcopenia son todavía escasas; se sabe que no hay un único biomarcador ideal, sino que se debería disponer de un panel de herramientas complementarias como las imágenes diagnósticas, los biomarcadores séricos y las pruebas funcionales para su diagnóstico (37).

En diversos estudios se ha demostrado la asociación entre la sarcopenia y la alteración de los marcadores biológicos de inflamación y coagulación, como la interleucina IL-1 y la IL-6, el factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1, la hormona del crecimiento, el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y otros marcadores inflamatorios (37) que actúan como parte de un sistema metabólico mayor o son mediadores de inflamación (38).

También, se ha evidenciado que el fragmento C-terminal de la agrina (CAF) aumenta en pacientes con fractura de cadera cuando hay sarcopenia (37). Asimismo, se ha estudiado la creatinina como metabolito para estimar la masa osteomuscular; sin embargo, los resultados de la creatinina urinaria varían de 11 a 30 %, dependiendo del tipo de dieta (39).

En cuanto a la albúmina sérica como biomarcador de la sarcopenia, la evidencia aún no es concluyente. En algunos estudios se la relaciona con un bajo rendimiento físico y menor fuerza muscular o masa muscular en adultos mayores; sin embargo, en otros no se ha evidenciado esta asociación, por lo tanto, aún no se sabe claramente si es un marcador definitivo de la sarcopenia en esta población (40).

Cabe resaltar que, hasta la fecha, no se cuenta con un indicador único, práctico, económico y fiable para el diagnóstico de la sarcopenia. En este contexto, se evaluó el papel de la albúmina como posible biomarcador, considerando que es un indicador del balance del metabolismo proteico en personas sin infección aguda.

La albúmina es la proteína plasmática más abundante en el organismo y tiene la función de regular el paso de agua y solutos a través de los capilares, manteniendo la presión oncótica coloidal dentro del sistema vascular. Considerada una proteína plasmática de gran importancia en la evaluación del estado nutricional, su disminución altera la cicatrización de heridas, causa problemas inmunológicos y reduce la masa corporal magra (41).

Hasta donde se sabe, este sería el primer metaanálisis que analiza la asociación entre sarcopenia y albúmina sérica; solo se encontraron algunas revisiones sistemáticas como la de Cabrerizo, *et al.* (7), en la que se evaluó como indicador del estado nutricional y predictor de mortalidad en los adultos mayores; los autores concluyeron que los adultos mayores saludables tenían valores normales de albúmina y que la presencia de hipoalbuminemia puede servir para el pronóstico de complicaciones, incapacidad funcional y mortalidad precoz (6).

En otro metaanálisis sobre biomarcadores en sangre asociados con el riesgo de desnutrición en adultos mayores, se concluyó que la albúmina es un biomarcador útil de la desnutrición, incluso en presencia de inflamación crónica debida al envejecimiento o la enfermedad. Sin embargo, en contextos específicos, como enfermedades agudas o sepsis, debe evaluarse un conjunto de biomarcadores, entre ellos la albúmina (9), ya que es una proteína de fase aguda negativa cuyos niveles se reducen como reacción a la inflamación aguda (6).

La asociación entre mayores niveles de albúmina y la ausencia de sarcopenia en adultos mayores podría explicarse porque el principal déficit de nutrientes en esta población es el de proteínas (42), así que, en ausencia de inflamación, la albúmina constituye un adecuado biomarcador del estado de las proteínas viscerales del cuerpo y, ya que es la principal proteína sintetizada en el hígado, reflejaría el balance entre la ingestión y el gasto proteico. Sin embargo, su larga vida media, entre 18 y 21 días, no refleja cambios agudos en el estado nutricional (43).

Entre las fortalezas del estudio cabe mencionar que la revisión sistemática cuenta con un metaanálisis y corrobora los hallazgos cualitativos. Además, la búsqueda de artículos se hizo en cuatro bases de datos que cubren gran parte de la literatura especializada mundial.

Entre las limitaciones del estudio puede mencionarse que algunos autores clasificaron la albúmina como normal o deficiente, por lo que dichos estudios no se incluyeron en el metaanálisis. Otra limitación fue que en los estudios se emplearon hasta tres métodos de diagnóstico de sarcopenia, por lo que la clasificación del evento de interés no fue uniforme en todos los estudios, aspecto que refleja la actual situación de múltiples criterios para establecer el diagnóstico de sarcopenia.

Conclusiones

Los estudios incluidos en la presente revisión revelaron que existe una asociación significativa entre los niveles bajos de albúmina y la sarcopenia en adultos de 60 o más años en diferentes entornos de cuidado. A pesar de estos, hay poca evidencia de alta calidad y los métodos de diagnóstico de la sarcopenia no son uniformes. Es necesario, por lo tanto, hacer estudios encaminados a determinar la asociación entre los diferentes marcadores biológicos (incluida la albúmina) y la sarcopenia, así como estudios de

validación de puntos de corte de dichos marcadores para estimar la sensibilidad y la especificidad de cada uno, y seleccionar los más adecuados para una detección temprana de la sarcopenia que garantice un tratamiento multidisciplinario más efectivo.

Referencias

1. United Nations. World population aging 2019: Highlights. 2019. Fecha de consulta: 14 de marzo de 2021. Disponible en: <https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WorldPopulationAgeing2019-Highlights.pdf>
2. Organización Mundial de la Salud. Informe Mundial sobre el envejecimiento y la salud. 2015. Fecha de consulta: 16 de marzo de 2021. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/186466/9789240694873_spa.pdf?sequence=1
3. Larsson L, Degens H, Li M, Salvati L, Lee YI, Thompson W, *et al.* Sarcopenia: Aging-related loss of muscle mass and function. *Physiol Rev.* 2019;99:427-511. <https://doi.org/10.1152/physrev.00061.2017>
4. Wilkinson M, Piasecki O, Atherton PJ. The age-related loss of skeletal muscle mass and function: Measurement and physiology of muscle fiber atrophy and muscle fiber loss in humans. *J Ageing Res Rev.* 2018;47:123-32. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.07.005>
5. Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, Bore Y, Bruyère O, Cederholm T, *et al.* Sarcopenia: Revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing.* 2019;48:16-31. <https://doi.org/10.1093/ageing/afy169>
6. Barbosa-Silva TG, Bielemann RM, González MC, Menezes AMB. Prevalence of sarcopenia among community-dwelling elderly of a medium-sized South American city: Results of the COM VAL? Study study. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2016;7:136-43. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12049>
7. Cabrerizo S, Cuadras D, Gomez-Busto F, Artaza-Artabe I, Marín-Ciancas F, Malafarina V. Serum albumin and health in older people: Review and meta-analysis. *Maturitas.* 2015;81:17-27. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2015.02.009>
8. Keller U. Nutritional laboratory markers in malnutrition. *J Clin Med.* 2019;8:775. <https://doi.org/10.3390/jcm8060775>
9. Zhang Z, Pereira SL, Luo M, Matheson EM. Evaluation of blood biomarkers associated with risk of malnutrition in older adults: A systematic review and meta-analysis. *Nutrients.* 2017;9:829. <https://doi.org/10.3390/nu9080829>
10. Moola S, Munn Z, Tufanaru C, Aromataris E, Sears K, Sfetcu R, *et al.* Systematic reviews of etiology and risk. In: Aromataris E, Munn Z, editors. *JBI Manual for Evidence Synthesis*. JBI, 2020. Fecha de consulta: 14 de abril de 2021. Disponible en: <https://synthesismanual.jbi.global>
11. Aromataris E, Munn Z. JBI Systematic Reviews. In: Aromataris E, Munn Z, editors. *Joanna Briggs Institute Reviewer's Manual*. The Joanna Briggs Institute. 2017. Fecha de consulta: 8 de noviembre de 2020. Disponible en: <https://synthesismanual.jbi.globalhttps://wiki.joannabriggs.org/display/MANUAL/>
12. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analysis: The PRISMA statement. *Ann Inter Med.* 2009;151:264-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097>
13. Slim K, Nini E, Forestier D, Kwiatkowski F, Panis Y, Chipponi J. Methodological index for non-randomized studies (minors): Development and validation of a new instrument. *ANZ J Surg.* 2003;73:712-6. <https://doi.org/10.1046/j.1445-2197.2003.02748.x>
14. Abbas H, Perna S, Shah A, Al-Mannai M, Gasparri VI, Cereda E, *et al.* Risk factors for 5-year mortality in a cohort of elderly patients with sarcopenia. *Exp Gerontol.* 2020;136:110944. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.110944>
15. Gong G, Wan W, Zhang X, Liu Y, Liu X, Yin J. Correlation between the Charlson comorbidity index and skeletal muscle mass/physical performance in hospitalized older people potentially suffering from sarcopenia. *BMC Geriatr.* 2019;19:367. <https://doi.org/10.1186/s12877-019-1395-5>
16. D'Alessandro C, Piccoli GB, Barsotti M, Tassi S, Giannese D, Morganti R, *et al.* Prevalence and correlates of sarcopenia among elderly CKD outpatients on tertiary care. *Nutrients.* 2018;10:1951. <https://doi.org/10.3390/nu10121951>

17. Gariballa S, Alessa A. Association between nutritional blood-based biomarkers and clinical outcome in sarcopenia patients. *Clin Nutr ESPEN*. 2018;25:145-8. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2018.03.002>
18. Yoo J, Ha Y, Choi H, Kim K, Lee Y, Koo K, *et al.* Malnutrition and chronic inflammation as risk factors for sarcopenia in elderly patients with hip fracture. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2018;27:527-32. <https://doi.org/10.6133/apjcn.082017.02>
19. Zhou C, Zhang F, Zhang F, Yu Z, Chen X, Shen X, *et al.* Sarcopenia: A new predictor of postoperative complications for elderly gastric cancer patients who underwent radical gastrectomy. *J Surg Res*. 2017;211:137-46. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2016.12.014>
20. Harimoto N, Yoshizumi T, Shimokawa M, Sakata K, Kimura K, Itoh SI, *et al.* Sarcopenia is a poor prognostic factor following hepatic resection in patients aged 70 years and older with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2016;46:1247-55. <https://doi.org/10.1111/hepr.12674>
21. Hirasawa Y, Nakashima J, Yunaima D, Sugihara T, Gondo T, Nakagami Y, *et al.* Sarcopenia as a novel preoperative prognostic predictor for survival in patients with bladder cancer undergoing radical cystectomy. *Ann Surg Oncol*. 2016;23(Suppl.5):1048-54. <https://doi.org/10.1245/s10434-016-5606-4>
22. Ishihara H, Kondo T, Omac K, Takagi T, Iizuka J, Kobayashi H, *et al.* Sarcopenia and the modified Glasgow prognostic score are significant predictors of survival among patients with metastatic renal cell carcinoma who are receiving first-line sunitinib treatment. *Target Oncol*. 2016;11:605-17. <https://doi.org/10.1007/s11523-016-0430-0>
23. Sugimoto T, Ono R, Murta S, Saji N, Matsui Y, Nuda S, *et al.* Prevalence and associated factors of sarcopenia in elderly subjects with amnesic mild cognitive impairment on Alzheimer disease. *Curr Alzheimer Res*. 2016;13:718-26. <https://doi.org/10.2174/1567205013666160211124828>
24. Wang S, Zhuang C, Huang D, Pang W, Lou N, Chen F, *et al.* Sarcopenia adversely impacts postoperative clinical outcomes following gastrectomy in patients with gastric cancer: A prospective study. *Ann Surg Oncol*. 2016;23:556-64. <https://doi.org/10.1245/s10434-015-4887-3>
25. Kim H, Suzuki T, Kim M, Kojima N, Yoshida Y, Hirano H, *et al.* Incidence and predictors of sarcopenia onset in community-dwelling elderly Japanese women: 4-year follow-up study. *J Am Med Dir Assoc*. 2015;16:85.e1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2014.10.006>
26. Gariballa S, Alessa A. Sarcopenia: Prevalence and prognostic significance in hospitalized patients. *Clin Nutr*. 2013;32:772-6. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.01.010>
27. Harimoto N, Shirabe K, Yamashita YI, Ikemagi T, Yoshizumi T, Soejima Y, *et al.* Sarcopenia as a predictor of prognosis in patients following hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Br J Surg*. 2013;100:1523-30. <https://doi.org/10.1002/bjs.9258>
28. Picca A, Calvani R. Molecular mechanism and pathogenesis of sarcopenia: An overview. *Int J Mol Sci*. 2021;22:3032. <https://doi.org/10.3390/ijms22063032>
29. Cruz-Jentoft AJ, Sayer AA. Sarcopenia. *Lancet*. 2019;393:2636-46. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31138-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31138-9)
30. Atherton PJ, Etheridge T, Watt PW, Wilkinson D, Selby A, Rankin D, *et al.* Muscle full effect after oral protein: Time-dependent concordance and discordance between human muscle protein synthesis and mTORC1 signaling. *Am J Clin Nutr*. 2010;92:1080-8. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.29819>
31. Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, Boirie Y, Bruyère O, Cederholm T, *et al.* Sarcopenia: Revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing*. 2019;48:16-31. <https://doi.org/10.1093/ageing/afy169>
32. Maden-Wilkinson TM, Degens H, Jones DA, McPhee JS. Comparison of MRI and DXA to measure muscle size and age-related atrophy in thigh muscles. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2013;13:320-8.
33. Lee RD, Nieman DC. *Nutritional Assessments*. North Carolina: Science Engineering, McGraw-Hill; 2002. p.1648.
34. Shafiee G, Keshkar A, Soltani A, Ahadi Z, Larijani B, Heshmat R. Prevalence of sarcopenia in the world: A systematic review and meta-analysis of general population studies. *Diabetes Metab Disord*. 2017;16:21. <https://doi.org/10.1186/s40200-017-0302-x>
35. Shin MJ, Jeon YK, Kim IJ. Testosterone and sarcopenia. *World J Mens Health*. 2018;36:192-8. <https://doi.org/10.5534/wjmh.180001>

36. Bian A, Zhou X, Guo Y, Wang W, Zhang Y, Wang X. Association between sarcopenia and levels of growth hormone and insulin-like growth factor-1 in the elderly. *BMC Musculoskelet Disord.* 2020;21:214. <https://doi.org/10.1186/s12891-020-03236-y>
37. Sánchez-Castellano C, Matín-Aragón S, Bermejo-Bescós P, Vaquero-Pinto N, Miret-Conchado C, Miguel AM, *et al.* Biomarkers of sarcopenia in very old patients with hip fracture. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2020;11:478-86. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12508>
38. Walston J, Mc Burnie MA, Newman A, Tracy RP, Kop CH, Hirsch J, *et al.* Frailty and activation of the inflammation and coagulation systems with and without clinical comorbidities: Results from the cardiovascular health study. *Arch Inter Med.* 2002;162:2333-41. <https://doi.org/10.1001/archinte.162.20.2333>
39. Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, Tucker KL, Zigler TR. *Modern Nutrition.* In: *Health and Disease.* 11° edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2014. p. 16-24.
40. van Atteveld V, van Ancum JM, Reijnierse EM, Trappenburg MC, Meskers CGM, Maier AB. Erythrocyte sedimentation rate and albumin as markers of inflammation are associated with measures of sarcopenia: A cross-sectional study. *BMC Geriatr.* 2019;19:233. <https://doi.org/10.1186/s12877-019-1253-5>
41. Smith S. Using albumin and prealbumin to assess nutritional status. *Nursing.* 2017;47:65-6. <https://doi.org/10.1097/01.NURSE.0000511805.83334.df>
42. Valenzuela RE, Ponce JA, Morales-Figueroa GG, Muro KA, Carreon VR, Aleman-Mateo H. Insufficient amounts and inadequate distribution of dietary protein intake in apparently healthy older adults in a developing country: Implications for dietary strategies to prevent sarcopenia. *Clin Interv Aging.* 2013;8:1143-8. <https://doi.org/10.2147/CIA.S49810>
43. Kragh-Hansen U. Human serum albumin: A multifunctional protein. In: Otagiri M, Chuang V, editor. *Albumin in medicine.* Singapore: Springer; 2016. p. 1-24. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2116-9_1

Corrección de autores

Guayaquil 6 de agosto de 2021

Estimados Sres. Comité Editorial Biomédica a nombre de los autores del artículo Seroprevalence of arboviruses in Ecuador: Implications for improved surveillance, doi:, <https://doi.org/10.7705/biomedica.5623>, Biomédica 2021;41:247-59; solicitamos la siguiente corrección al texto:

Corrección de los autores

Seroprevalence of arboviruses in Ecuador: Implications for improved surveillance

Ernesto Gutiérrez-Vera¹✉, Leandro Patiño^{1,2}, Martha Castillo-Segovia^{1,3}, Víctor MoraValencia^{1,4}, Julio Montesdeoca-Agurto¹✉, Mary Regato-Arrata^{1,5}

El texto de la introducción, en el párrafo 2, línea 11:

El Texto dice:

ZIKV and CHIKV are more recent introductions; the first epidemics by these viruses occurred in 2014 and 2016, respectively

Debería decir:

CHIKV and ZIKV are more recent introductions; the first epidemics by these viruses occurred in 2014 and 2016, respectively

Atentamente,



correo: leandro.patino@epi.gob.ec
LEANDRO DARIO
PATINO PATINO

Leandro Patiño P.

Autor de correspondencia del artículo

Bogotá D.C. 06 de septiembre de 2021

Respetado

**COMITÉ EDITORIAL
REVISTA BIOMÉDICA**

Atendiendo al requerimiento de un lector de nuestro artículo "Maldonado-Maldonado LA, Misnaza-Castrillón SP, Castañeda-Orjuela CA. **Desigualdades en el control odontológico prenatal en Colombia, un análisis a partir del IV Estudio Nacional de Salud Bucal 2013-2014.** Biomédica. 2021;41(2):271-81. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5705>", quien señaló una falla en la fuente bibliográfica número 24 del citado artículo (falta de una *r* en el apellido de la autora Villarreal y ausencia de DOI); como autores, amablemente nos permitimos solicitar formalmente que se evalúe la pertinencia de realizar el siguiente ajuste:

A la cita 24 que aparece en el artículo de la siguiente manera:

"24. Almarío AJ, Acevedo C, Villareal C, Morales C, Concha S. La salud bucal y la atención odontológica de las mujeres embarazadas: estudio bibliométrico, revisión sistemática y análisis de contenido. Rev Fac Odontol Univ Antioquia. 2017;28:292-310."

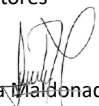
Ajustar con la siguiente propuesta

24. Almarío Barrera AJ, Acevedo Argüello C, Villarreal Neira C, Morales Borrero C, Concha Sánchez SC. La salud bucal y la atención odontológica de las mujeres embarazadas: estudio bibliométrico, revisión sistemática y análisis de contenido. Rev Fac Odontol Univ Antioq. 2017;28(2):374-407. <https://doi.org/10.17533/udea.rfo.v28n2a9>

Agradecemos la atención prestada a nuestra solicitud y quedamos atentos a la respuesta.

Cordial saludo

Los autores


Lorena Maldonado Maldonado
C.C. 1052386352


Carlos Andrés Castañeda Orjuela
C.C.

Sandra Misnaza Castrillón
C.C.