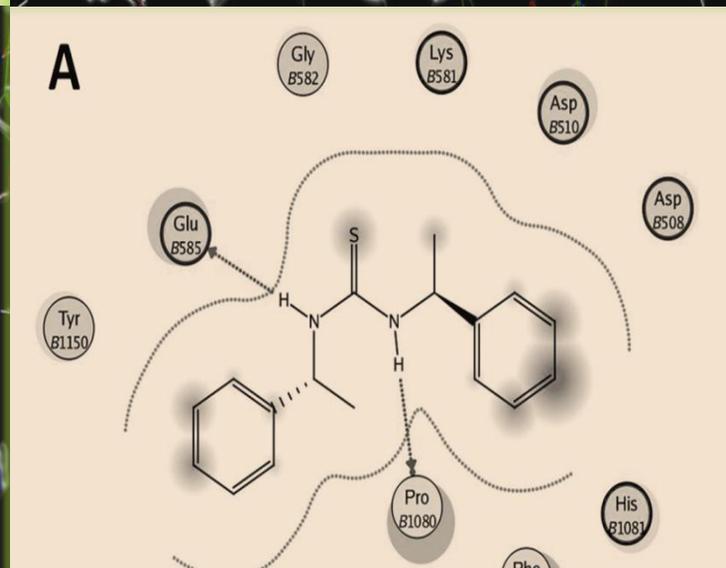
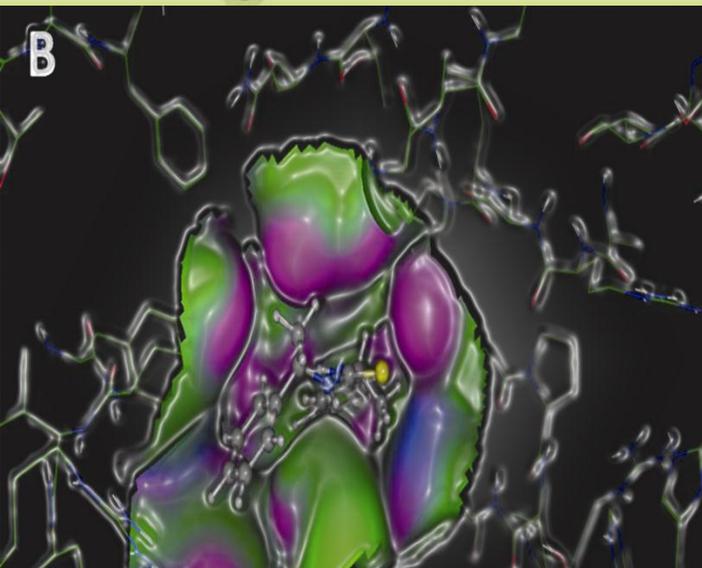
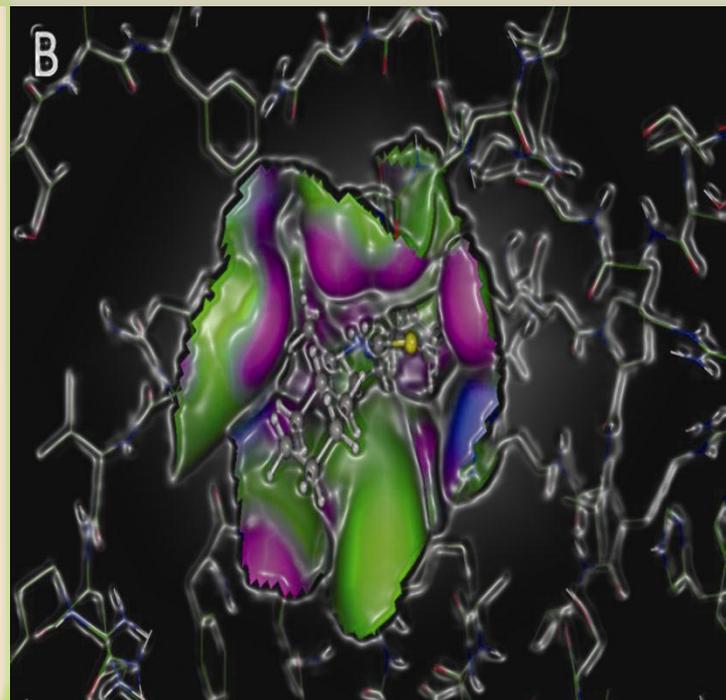
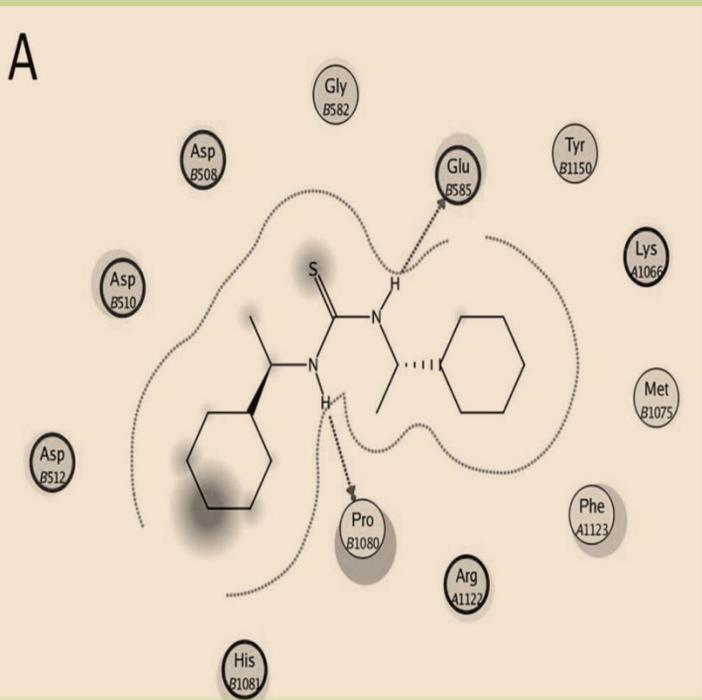


# Avances Biomedicina



may-ago 2013 volumen 2 número 2  
<http://erevistas.saber.ula.ve/biomedicina>



Depósito Legal: ppi201102ME3935  
ISSN: 2244-7881



### ***Sobre la Portada***

La portada muestra el acoplamiento molecular entre los aminoácidos del sitio activo de la DNA girasa y la tiourea (R, R)-*N,N'*-bis(1-ciclohexiletil)tiourea (CYTU1) y (R,R)-*N,N'*-bis(1-feniletil)tiourea (CYTU2). Resultados pertenecientes al manuscrito de *Martínez-Flores F y col.* publicado en éste número.

## AVANCES EN BIOMEDICINA

Publicación Oficial del Instituto de Inmunología Clínica

### Autoridades ULA

**Dr. Mario Bonucci**

*Rector de la Universidad de los Andes*

**Dr. Patricia Rosenzweig Levy**

*Vicerrector Académico*

**Dr. Manuel Aranguren**

*Vicerrector Administrativo*

**Dr. José María Andréz**

*Secretaría*

**Dr. Gerardo Tovitto**

*Decano de la Facultad de Medicina*

**Dra. Siham Salmen Halabi**

*Directora del Instituto de Inmunología  
Clínica*

### Consejo Editorial

**Director Editorial**

Siham Salmen Halabi

**Editor Adjunto**

Lisbeth Berrueta Carrillo

**Comité Editorial**

Daniela Montes-Berrueta

Guillermo Terán-Ángel

Joselyn Rojas Quintero

Leidith Berrueta Carrillo

Luisa Barboza Carrillo

Nubia H Silva

Rima C Bahsas Saky

**Comisión de Arbitraje**

Andrés Soyano

Barbara E Bierer

Carmen Mazei de Dávila

Darrell L Peterson

Diego F Dávila Spinetti

Jesús Alfonso Osuna

José H Donis

Librado Ortiz-Ortiz

Masyelly D Rojas

Mercedes González Coira

Miguel Aguirre

Morella C Bouchard

Yuleima Díaz

Avances en Biomedicina es el órgano divulgativo oficial del Instituto de Inmunología Clínica – ULA. Esta publicación periódica busca la promoción, difusión y discusión del impacto de los trabajos realizados por los miembros de la comunidad científica regional, nacional e internacional. Pretende además fomentar la actividad científica de difusión de resultados en los investigadores noveles, tanto en el área de pregrado como de postgrado.

Es una revista científica online, que a partir del 2013 tendrá una periodicidad cuatrimestral y cuenta con las siguientes secciones: Revisiones, artículos originales, casos clínicos, cartas al editor, comunicaciones rápidas; y dos secciones destinadas a los investigadores noveles y a los pioneros en los diferentes campos de las ciencias de la medicina, biología y biotecnología. Esta revista cuenta con sistema de arbitraje, llevado a cabo por al menos dos revisores expertos en el área, seleccionados por el Consejo Editorial.

Avances en Biomedicina no se hace responsable del contenido, opiniones, aplicaciones o material que sea suministrado por los autores. Además, se asume que todas las publicaciones recibidas se rigen por las normas de honestidad científica y ética profesional, por lo que la revista no se hace responsable en el caso de que algún autor incurra en la infracción de las mismas.

#### Indizada en:

1. Repositorio Institucional de la Universidad de los Andes – SABER-ULA.
2. Índice Mexicano de Revistas Biomédicas Latinoamericanas (Inbiomed).
3. REVENCYT código: RV A040
4. Latindex
5. Index Copernicus International S.A.
6. SHERPA/RoMEO
7. DIALNET
8. eRevistas
9. Directory of Research Journal Indexing (DRJI)
10. Periódica (base de datos bibliográfica de revistas de ciencias y tecnología)
11. Sjournals Index

**VOLUMEN 2, N°2, MAYO-AGOSTO 2013**

**DEPÓSITO LEGAL: PPI201102ME3935**

**ISSN: 2244-7881**

#### Red:

Correos electrónicos:

[avanbiomed.idic@ula.ve](mailto:avanbiomed.idic@ula.ve), [avanbiomed.idic@gmail.com](mailto:avanbiomed.idic@gmail.com)

Acceso online:

<http://erevistas.saber.ula.ve/biomedicina>

<http://www.imbiomed.com.mx>

[http://www.revencty.ula.ve/rev\\_nuevas/principal.htm](http://www.revencty.ula.ve/rev_nuevas/principal.htm)

<http://www.latindex.org/buscador/ficRev.html?folio=21053&opcion=1>

<http://journals.indexcopernicus.com/passport.php?id=7837>

[http://www.sherpa.ac.uk/romeo/search.php?jtitle=avances+en+biomedicina&issn=&zeto\\_cpub=Universidad+de+Los+Andes%2C+Instituto+de+Inmunolog%EDa+Cl%EDnica&romeo\\_pub=Universidad+de+Los+Andes%2C+Instituto+de+Inmunolog%EDa+Cl%EDnica&fiDnum=|&mode=simple&la=en&version=&source=journal&sourceid=23121](http://www.sherpa.ac.uk/romeo/search.php?jtitle=avances+en+biomedicina&issn=&zeto_cpub=Universidad+de+Los+Andes%2C+Instituto+de+Inmunolog%EDa+Cl%EDnica&romeo_pub=Universidad+de+Los+Andes%2C+Instituto+de+Inmunolog%EDa+Cl%EDnica&fiDnum=|&mode=simple&la=en&version=&source=journal&sourceid=23121)

<http://dialnet.unirioja.es/servlet/revista?codigo=19470>

[http://www.erevistas.csic.es/ficha\\_revista.php?oai\\_iden=oai\\_revista751](http://www.erevistas.csic.es/ficha_revista.php?oai_iden=oai_revista751)

#### Agradecimiento:

Financiada parcialmente por **FUNDACITE MÉRIDA S12-3863**

#### Instituto de Inmunología Clínica:

Dirección: Edificio Luis Pasteur, al lado del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes. Av. 16 de Septiembres, Sector Campo de Oro. Mérida 5101. Venezuela.

#### Copyright:

Derechos reservados. Queda prohibida la reproducción total o parcial de todo el material contenido en la revista sin el consentimiento por escrito de los editores.



## Tabla de contenido

### EDITORIAL

#### 50-52 Crisis financiera y educación universitaria

Jesús Alfonso Osuna C.

### ARTÍCULOS ORIGINALES

#### 53-59 Expresión y purificación del antígeno preS1/2 y su utilidad en el estudio de la patogenicidad de la infección por el virus de la hepatitis B

*Expression and purification of preS1/2 antigen and its usefulness in the hepatitis B virus pathogenesis study*

*Masyelly Rojas, Juan Camilo Valencia-Molina, Daniela Montes-Berrueta, Gery Rosmary Ruiz-Carrillo, Leidith Berrueta-Carrillo, Darrell L Peterson, Lisbeth Berrueta, Siham Salmen*

#### 60-67 Frecuencia cardíaca y movimientos fetales posterior a la administración de betametasona para maduración pulmonar fetal

*Fetal heart rate and movements after betamethasone administration for fetal lung maturity*

*Yolima Ruiz-Lopez, Keibis Jiménez-Castillejo, Eduardo-Reyna Villasmil, Duly Torres-Cepeda, Joel Santos-Bolivar, Jhoan Aragon-Charris, Jorly Mejia-Montilla, Nadia Reyna-Villasmil*

#### 68-75 Acoplamiento molecular y actividad antibacteriana de las tioureas (R,R)-N,N'-bis(1-ciclohexiletil)tiourea y (R,R)-N,N'-bis(1-feniletil)tiourea.

*Molecular docking and antibacterial activity thioureas (R,R)-N,N'-bis(1-cyclohexylethyl)thiourea and (R,R)-N,N'-bis(1-phenylethyl)thiourea*

*Fabian Martínez-Flores, José Jaime Vázquez-Bravo, Juan Saulo González-González, Julio Hernández-Rosas, Veronica Castro-Bear, Oscar Zuñiga-Lemus*

### REVISIONES Y ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

#### 76-99 Tipos de diseños de los estudios clínicos y epidemiológicos

*Types of clinical and epidemiologic study designs*

*José H Donis H*

### CASOS CLÍNICOS

#### 100-103 Tumor sólido pseudopapilar de páncreas. Presentación de un caso reportado en Hospital Universitario de Los Andes, Mérida-Venezuela

*Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas. A report in the Hospital Universitario de Los Andes, Mérida-Venezuela*

*Naisbet Ortega-Vásquez, Melisse Milano, Ana Valentina Rojas-Esquerre, Estrella Uzcategui, Carlos Gonzalez-Torres, Pierina Petrosino-Tepedino, Asmiria De Sotolongo, Elymar Barreto, Julio Tabares*



- 
- 104-107 **Eversión vesical completa a través de una fístula vesicovaginal**  
*Complete bladder eversion through vesicovaginal fistul*  
*Jhoan Aragón-Charry, Eduardo Reyna-Villasmil, Joel Santos-Bolíva.*
- 108 **INSTRUCCIONES A LOS AUTORES**
- 109 **INSTRUCTIONS FOR AUTHORS**
- 110-111 **ÉTICA DE LAS PUBLICACIONES & DECLARACIÓN DE MALA PRAXIS/ PUBLICATION ETHICS & MALPRACTICE STATEMENT**

## Editorial

### Crisis financiera y educación universitaria

En años recientes dirigentes europeos han dirigido su mirada hacia América Latina, por considerar que ésta es una de las regiones menos afectada por la crisis de la economía mundial ocurrida en los últimos años. Podemos comprobar tal apreciación en el siguiente comentario sobre las Economías Latinoamericanas: “a lo largo de 2012, los países Latinoamericanos se han convertido en un oasis para los inversionistas, las reglas claras y políticas económicas fortalecidas han provocado un crecimiento sin precedentes en la región”. De igual manera, en foros internacionales como la Cumbre de los países de la Comunidad de Estados Latinoamericanos y Caribeños (CELAC) y la CELAC-Unión Europea (CELAC-UE), que se llevó a cabo en Santiago de Chile durante los días 26 y 27 de enero de 2013, se hizo patente ese particular interés de la Comunidad Europea por los países Latinoamericanos.

En el supuesto de un crecimiento uniforme de las economías latinoamericanas para los diecinueve países de la región, y la economía venezolana en particular, tal hecho obliga a pensar sobre los efectos positivos derivados de tal comportamiento sobre la educación y en particular sobre la educación universitaria. Veamos alguna información tanto de la economía latinoamericana como de la venezolana. Según CEPAL-2012 “la economía de América Latina y el Caribe registrará un crecimiento de hasta 3,2 % al cierre del 2012, con una expansión proyectada del 4 % para el siguiente año, en reacción a los ajustes en los pronósticos de crecimiento para Brasil y los ajustes para Argentina”. En otro documento la CEPAL señala: “La debilidad de la economía mundial, causada principalmente por la dificultades que enfrentan Europa, Estados Unidos de Norte América y China, ha incidido en el crecimiento de América Latina y el Caribe, región que tendrá en 2012 una expansión menor que en años anteriores”. De acuerdo con el Banco Central de Venezuela, “la economía venezolana creció 5,2% durante el tercer trimestre de 2012, impulsada por la inversión social que mantiene el Gobierno Nacional, y el desarrollo de la actividad privada interna en casi todos los sectores productivos”. El informe reciente del Banco Mundial (15/04/2013) prevé un estancamiento económico en Venezuela. Según ese organismo “Venezuela y Jamaica tendrán el más bajo crecimiento de la región”. Además “prevé que Venezuela crecerá 0,1% este año, lo que se ubicará muy por debajo de la media regional de crecimiento de 3,5% que se espera para América Latina para 2013. Meses atrás el pronóstico era de 3,5%. La “desaceleración aguda” se debe al “declive del ritmo del gasto fiscal”, así como a expectativas de una bajada del consumo por la reciente devaluación monetaria y un “endurecimiento” de los controles de cambio”. A su vez, el Fondo Monetario Internacional (FMI) prevé que la economía venezolana se estancará este año, creciendo apenas una décima, con un repunte al 2,3% en el 2014.

Las consideraciones anteriores son necesarias para aproximarnos a realidades que en el corto plazo enfrentará la

Universidad Venezolana. Información del Ministerio Popular Para la Educación Universitaria (MPPEU) sobre el Presupuesto Global para el Sector Universitario que se hará efectivo en el Año Fiscal 2013, el mismo será de **18.646.215.000 bolívares, 26% más que en el año 2012** que fue de Bs. 14.754.515.245. De los 18.6 millardos, 76% corresponden a las Instituciones de Educación Universitaria (64% a las Universidades y 12% a los Institutos y Colegios Universitarios), mientras que los entes adscritos tendrán 22% y el 2% restante al ente central. El MPPEU cerró el ejercicio fiscal 2012 con Bs. 28.179.752.341 de los cuales 13.4 millardos se obtuvieron mediante créditos adicionales (Bs.13.425.237.046). Estas cifras necesariamente deben relacionarse con el número de instituciones de educación universitaria de nuestro país. De acuerdo con la Ley de Presupuesto 2010, Memoria y Cuenta 2010 del MPPEU, las Instituciones de Educación Universitaria de Venezuela eran CIENTO CINCUENTA Y NUEVE (159), de las cuales SESENTA (60) corresponden al Sector Público y NOVENTA Y NUEVE (99) al Sector Privado. De las 60 Instituciones del Sector Público, 4 corresponden a Colegios Universitarios; 32 a Institutos Universitarios; 19 a Universidades Experimentales y 5 **Universidades Autónomas**. Es necesario tomar en cuenta que a varios Institutos Universitarios (Tecnológicos), recientemente se les elevó a la categoría de Universidades.

Según el MPPEU la matrícula estudiantil para el año 2010 fue de **UN MILLÓN NOVECIENTOS CINCUENTA Y UN MIL SEICIENTOS OCHENTA Y SEIS (1.951.686)**. Las Instituciones Oficiales contaban con 1.365.484 estudiantes (69,9%) y las Privadas con 586.202 estudiantes (30%). El total del Presupuesto para el Sector Universitario deberá repartirse entre las 60 Instituciones del Sector Público, entre ellas las 5 Universidades Autónomas. Uno de los criterios que priva para la distribución de alícuotas entre dichas instituciones, es la matrícula estudiantil, la cual crece desmesuradamente en las del sector oficial. El Gobierno Nacional sacrificó la calidad de la educación universitaria para favorecer su masificación.

Es necesario recordar que el **Proyecto Ley de Presupuesto para el Ejercicio Fiscal 2013, de acuerdo con el Ministro de Planificación y Finanzas, fue calculado en Bs. 396 mil 406 millones**, lo que representa un incremento de 33,09% con relación al del año 2012, cuando se ubicó en Bs. 297.836 millones. Se estimó el precio del barril de petróleo de la cesta venezolana en 55 dólares, y se mantuvo el tipo de cambio en 4,30 bolívares por dólar. Según esa fuente, la inflación en el Ejercicio Fiscal 2011 cerró con 27,6%; en septiembre 2012 se ubicaba en 18%, cerrando en 22%; en el primer trimestre del 2013 la inflación alcanzó 7,9%. Se estima que al final del 2013 se ubicará en alrededor del 30%. Tómese en cuenta además la reciente devaluación, con un cambio oficial que pasó de Bs. 4,30 por dólar a Bs. 6,30 por dólar.

## Evaluación de la educación universitaria

Sobre la calidad de la educación universitaria en nuestro país y en América Latina, es necesario tomar como referencia indicadores confiables. Con frecuencia se recurre a los "ranking" internacionales para ubicar en ellos a nuestras universidades. Pues bien, a través de organismos que evalúan la Educación Universitaria, como la consultora en educación Quacquerelli Symonds (QS)-QS World University Rankings (1), es posible conocer parte de la realidad. Uno de los últimos informes (QS-2012) en educación universitaria revela que ninguna de las universidades latinoamericanas está ubicada entre las cien primeras del mundo. De 300 universidades en el mundo, sólo seis son de América Latina. La mejor evaluada fue la Universidad de São Paulo, Brasil (USP) en la posición 139; le siguen la Universidad Autónoma de México (UNAM) en el puesto 146; y la Pontificia Universidad de Chile en el puesto 195. También figuran en ese grupo la Universidad Estadual de Campinas en Brasil, la Universidad Nacional de Chile y la Universidad Nacional de Buenos Aires. Entre las 250 universidades más reconocidas de América Latina están la Universidad de São Paulo, Brasil, calificada como la mejor de la región; le siguen la Pontificia Universidad Católica de Chile y la Universidad Estadual de Campinas, Brasil. En este grupo están las universidades venezolanas, en el siguiente orden de importancia: Universidad Central de Venezuela (UCV), Simón Bolívar (SB), Los Andes (ULA), Católica Andrés Bello (UCAB) y Metropolitana (UniMet). Las categorías que establece la QS está basada en 3 diferentes elementos de registro: 1) Prestigio – Importancia académica; 2) Análisis de la calidad del personal; 3) indicador de citas (referencias-impacto) por docentes. Otros criterios: Influencia o efectos de la investigación. Capacidad para generar empleo. Enseñanza: medio ambiente para el aprendizaje. Proporción Profesores-Estudiantes: nacionales e internacionales. Innovación - Investigación: aportes de la industria. Transferencia de conocimientos.

En el mundo universitario venezolano tenemos indicadores que se pueden tomar en cuenta para medirnos en el escenario de las universidades nacionales. Uno de ellos es el número de Trabajos Científicos presentados en las Convenciones Anuales de la Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia (AsoVAC). En la LXII Convención Anual realizada en la Universidad Metropolitana (UniMet) en Caracas entre el 18 y 23 de noviembre de 2012, participaron 598 investigadores y fueron presentados 730 Trabajos Científicos, en diferentes áreas del conocimiento. Revisando la historia de estas Convenciones Anuales de AsoVAC encontramos que en la cita en Caracas del año 2000 se presentaron 1717 trabajos científicos. En los cinco años previos la cifra de trabajos osciló entre 2010 (año 1995) y 1374 (año 1999). En el 2001 en la Convención realizada en San Cristóbal-Táchira se presentaron 2038 trabajos. Se observa que el número de trabajos se va reduciendo progresivamente hasta los 730 trabajos científicos presentados en la LXII Convención Anual realizada en Caracas en 2012. En los registros de esta actividad realizada por AsoVAC y los capítulos correspondientes, se puede comprobar en cada ocasión el número de investigadores participantes y de trabajos presentados por cada una de las universidades nacionales. Las Universidades Autónomas usualmente ocupan los primeros lugares, junto con la Universidad Simón Bolívar (USB) y el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). En la última década se observa una mayor participación de las Universidades Nacionales Experimentales.

Son muchas las limitaciones de nuestros investigadores para participar en estos eventos: poco apoyo para los viáticos y gastos en general, a lo cual se suma los cada vez más disminuidos recursos para la investigación. Los Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de cada Universidad son soporte fundamental

para esta actividad, pero sus aportes resultan insuficientes. En el análisis de lo ocurrido en los últimos catorce años en lo que concierne a ciencia y desarrollo tecnológico, el efecto de las políticas del Estado ha sido negativo. El sector se ha visto seriamente afectado por escasas o nulas facilidades laborales: el poco estímulo y reconocimiento para los investigadores; las pobres remuneraciones; las limitaciones para la reposición de cargos de la planta profesoral, necesaria para formar personal y para sustituir plazas vacantes, por jubilación; o peor aún, lo observado en años recientes: el éxodo de nuestros mejores talentos.

Otra variable a tomar en cuenta en relación con la ciencia y la investigación en Venezuela es el Programa de Promoción al Investigador (PPI), puesto en marcha en 1990 por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT), como respuesta al reto planteado para un desarrollo sustentado en el conocimiento. Este programa permitió construir una base de datos para registro de los investigadores, según la cual en el año 2008 estaban acreditados 6.038 investigadores, poniendo en evidencia que Venezuela tenía un déficit de aproximadamente 78% de investigadores, de acuerdo con estándares internacionales. En el 2009 el Gobierno calificó de elitista y excluyente al PPI, eliminándolo, porque supuestamente no reflejaba la realidad de la investigación en el país. En 2011 el Ministerio del Poder Popular de Ciencia y Tecnología sustituyó el PPI por el Programa de Estímulo a la Investigación (PEI), posteriormente PEII, incorporándole la actividad innovación. El registro en dicho programa se ha prolongado. No hay información sobre de dicho programa.

Una iniciativa a todas luces favorable para el sector científico-tecnológico fue la Ley Orgánica de Ciencia Tecnología e Innovación (LOCTI-2005), que establecía el aporte de un porcentaje de las ganancias de las empresas públicas y privadas, para proyectos de investigación, desarrollo y formación, en una relación acordada de manera directa entre la empresa privada, el sector público y las universidades. Una decisión desafortunada reformó dicha Ley en el año 2010, colocando los recursos obtenidos mediante ese mecanismo bajo el control discrecional del Ministerio del Poder Popular para Ciencia y Tecnología, lo que para muchos dolientes del sector ciencia y tecnología, fue equivalente al secuestro de los recursos obtenidos mediante la relación sector público y privado con las universidades.

Todos estos factores limitan la participación de Venezuela en el concierto de los países que sustentan sus economías en el conocimiento. Los sociólogos de la educación reiteradamente señalan el ritmo arrollador de la sociedad del conocimiento, recordándonos que las diferencias en el dominio del conocimiento marcan los nuevos linderos entre los pueblos y sus culturas. El conocimiento forma individuos y a la sociedad, aptos para la competitividad en el saber. En eso estriba el desarrollo de un país. **En el Libro Reflexiones y Propuestas para la Educación Universitaria, Editado por Las Academias Nacionales de Venezuela, La Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales, Capítulo Coordinado por el Profesor Claudio Bifano (2), un distinguido grupo de investigadores presentan un análisis crítico sobre la educación universitaria y sobre la universidad venezolana, acompañado de propuestas tanto para el Estado, como para la Institución Universitaria. Esta es una referencia de consulta obligada sobre este tema.**

Volvamos al tema de la economía y la percepción de líderes europeos de una evolución favorable de la economía de los países de América Latina, y su impacto positivo sobre áreas como la educación universitaria. Es lo esperado, deseable y necesario, pero no ha ocurrido así, tal como lo muestra la consultora Quacquerelli

Symonds (QS) World University Rankings, mencionada anteriormente. Es así como el posicionamiento de las universidades venezolanas, tomando en cuenta niveles de desarrollo que les permitan ubicarse, si no cerca de las mejores del mundo, por lo menos compartir lugares con aquellas de la región cuyo nivel de competitividad aumenta significativamente, lamentablemente muestra una realidad distante de la apreciación de los líderes europeos.

Tal vez lo ocurrido en nuestro país en materia económico-financiera, permita pensar a extraños a nuestra realidad, en el florecer de nuestros sistema educativo, de nuestras universidades y de la ciencia y la tecnología venezolanas, como entes privilegiados en estos tres últimos lustros. Los ingresos obtenidos por nuestro país por concepto de la renta petrolera durante la actual administración, así lo hace pensar, ya que los mismos se ubican en la inmensa cifra de **UN MILLÓN DE MILLONES DE DOLARES (UN BILLÓN DE DÓLARES)**. Sin embargo, otras fueron las prioridades, como los miles de millones de dólares destinados a la compra de armas (3). Es cierto que un monto importante de aquella cantidad fue destinada por el Gobierno Nacional para programas sociales. Llegará el momento de evaluar el impacto real de esa inversión sobre el bienestar de los venezolanos, y en particular sobre cuántos de ellos fueron rescatados de la situación de pobreza. Pero es que no ocurrió lo mismo con el sector universitario. Nuestras universidades, particularmente las autónomas, sufren en los últimos años un terrible acoso financiero, negándoles recursos para sus funciones esenciales, además de colocar a su personal en la casi total indefensión en relación con programas de protección social integral. Súmese a esas calamidades, la agresión de que son objeto sus instalaciones, no sólo la planta física, sino sus Laboratorios y espacios para la actividad creadora, agresiones que se llevan a cabo con la mayor impunidad. Todos estos factores, lejos de ayudar a su crecimiento, frenan sensiblemente su desarrollo y capacidad para robustecerse académicamente.

En lo que concierne a las nuevas políticas gubernamentales sobre la economía y sobre la educación universitaria, se deben pensar estrategias para minimizar los efectos indeseables de las mismas.

### Conclusiones y Recomendaciones

El análisis de la educación universitaria debe ser realizado en el contexto global de la educación de nuestro país. Para lo cual se deben tomar en cuenta variables que guardan relación entre sí; una de ellas es la económico-financiera, sin desestimar otros componentes de la estructura de funcionamiento de nuestras universidades. En diferentes foros sobre la Universidad Venezolana, se ha reconocido que el “modelo actual de universidad es financieramente inviable”, planteando que es necesario hacer mayores esfuerzos internos para ganar más autonomía en la disponibilidad y administración de recursos. Lo cual obliga a explorar otras alternativas, locales y a nivel internacional, para financiamiento de estudios de postgrado y para la investigación. Por ejemplo, tomar en cuenta lo expresado en la Declaración Conjunta del 27 de enero de 2013 (Declaración de Santiago de Chile) de la Cumbre Comunidad de Estados Latinoamericanos y Caribeños – Comunidad Europea (CELAC-UE). De los 47 puntos acordados, en el 29 se expresa: “Felicitamos los avances en la adopción de una hoja de ruta para la implementación de la Iniciativa Conjunta de Investigación e Innovación para contribuir a un nuevo dinamismo en la construcción del Área de Conocimiento de la UE-CELAC”....

“reconocemos la importante contribución de los programas de educación superior para la cooperación académica”.....“Creemos firmemente en la importancia de las inversiones en el campo de la educación superior, investigación e innovación para promover el crecimiento, desarrollo y empleo sustentable”. En el mismo numeral se expresa lo relacionado con facilidades para “la movilidad del personal académico y de investigadores entre nuestras regiones”. Estas declaraciones debieran ser objeto de estudio para hacer efectivos tales propósitos.

En el estudio del problema y posibles soluciones, es indispensable que la Universidad Venezolana se mire detenidamente en lo interno, con la mayor honestidad en el análisis crítico, para poder aplicar oportunamente los correctivos necesarios. En tal sentido es fundamental lo relacionado con el funcionamiento institucional, pensando y diseñando estrategias que la conviertan en una entidad más ágil, más dinámica en la aplicación de su propia normativa. La Ley de Universidades vigente permite aplicar parte de esos correctivos, con base en lo que establecen sus reglamentos y los que la misma Ley permite incorporar. Se deben revisar conceptos y prácticas como el de la **autonomía** usualmente manejado y aplicado al arbitrio de cada quien. Es necesario reconocer que los postulados, ideales y valores de la Reforma de Córdoba de 1918, usualmente son mediatizados por intereses que los pervierten, con acciones que debilitan su esencia, convirtiéndolos de esa manera en pesado lastre para que la Universidad Venezolana tenga presencia digna en el mundo del conocimiento, y para garantizar su mayor eficiencia en la participación en los proyectos necesarios para construir país. Por lo tanto, debemos mirar más allá de aquellos ideales que intentaron dar respuestas a demandas en momentos que vivía el mundo y la universidad latinoamericana, en el albor de las luchas sociales que entonces se vislumbraban. Los problemas de gestión universitaria, en el más amplio sentido del término, deben ser sometidos a un análisis crítico poniendo de lado intereses grupales. Por ejemplo, la elección de autoridades universitarias no debe ser contaminada por la politización de los procesos. Se deben privilegiar méritos académicos sobre aquellos que desnaturalizan al propio proceso de elección y a quienes de ellas resultan electos. En fin, es un trabajo que nos debe convocar a todos los universitarios, para la mejor gobernanza de la Institución. No es otra cosa que el esfuerzo y la voluntad necesaria para diferenciarnos cualitativamente.

### Referencias

1. Quacquerelli Symonds (QS)-QS World University Rankings.
2. Reflexiones y Propuestas para la Educación Universitaria, Editado por Las Academias Nacionales de Venezuela, La Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales. pp 113-202, 2012.
3. Educación para Transformar el País. <http://educapais.wordpress.com/>

**Doctor Jesús Alfonso Osuna C.**

Email: [jesusosuna@gmail.com](mailto:jesusosuna@gmail.com)

**Como citar éste artículo:** Osuna JA Crisis financiera y educación universitaria. *Avan Biomed* 2013; 2: 50-2



## Expresión y purificación del antígeno preS1/2 y su utilidad en el estudio de la patogenia de la infección por el virus de la hepatitis B (Expression and purification of preS1/2 antigen and its usefulness in the hepatitis B virus pathogenesis study)

Masyelly Rojas<sup>1</sup>, Juan Camilo Valencia-Molina<sup>2</sup>, Daniela Montes-Berrueta<sup>1,2</sup>, Gery Rosmary Ruiz-Carrillo<sup>2</sup>, Leidith Berrueta-Carrillo<sup>1</sup>, Darrell L Peterson<sup>3</sup>, Lisbeth Berrueta<sup>1</sup>✉, Siham Salmen<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>Instituto de Inmunología Clínica, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela,

<sup>2</sup>Estudiante de Medicina de la Universidad de los Andes (ULA), Núcleo Mérida.

<sup>3</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, USA

[ARTÍCULO ORIGINAL]

Recibido: 13 de Octubre de 2012. Aceptado: 23 de Noviembre de 2012.

### Resumen

El preS1/2 es parte de las proteínas de envoltura del virus de la hepatitis B (VHB), con funciones importantes en la inmunopatogenia de la enfermedad. Para su estudio es necesario contar con la proteína pura y así dilucidar su participación en el daño generado en el tejido hepático. Para ello se procedió a la expresión del preS1/2 previamente clonado en el vector pET3d, en la cepa de *E coli* HMS174 (DE3), seguido por su purificación mediante columnas de afinidad hacia residuos de histidina (6xhistidina) y finalmente sometidas a liberación de contaminantes mediante el uso de columnas de afinidad hacia endotoxina y filtración por centrifugación, de esta manera utilizarla para evaluar su efecto sobre hepatocitos humanos. El procedimiento utilizado permitió obtener 1,5 mg de proteína pura funcionalmente estable por cada litro de medio de cultivo. En este trabajo se describe un método sencillo de expresión y purificación del preS1/2 recombinante y se evidencia la obtención de un producto intacto, con potencial uso en estudios funcionales y futuros ensayos terapéuticos

### Palabras clave

Proteína recombinante, preS1/2, clonaje, expresión, Virus de la hepatitis B.

### Abstract

The preS1/2 belongs to the envelope proteins of the hepatitis B virus (HBV), and has an important role in the pathogenesis of the disease. A pure protein is important for their study, and thus elucidates their involvement in the liver tissue damage observed during the diseases. For this purpose preS1/2 previously cloned into the pET3d was expressed in *E. coli* strain HMS174 (DE3), subsequent was purified by affinity columns histidine residues (6xhistidine) and finally treated to release contaminants by using affinity columns endotoxin and filtration by centrifugation, thereby used it to assess their effect on human hepatocytes. The procedure yielded 1,5 mg pure protein per liter of culture medium, functionally stable. In this paper we describe a simple method of expression and purification of preS1/2, which is an intact product with potential use in functional studies and future therapeutic trials

### Keywords

Recombinant protein, preS1/2, cloning, expression, Hepatitis B virus

### Introducción

La producción de proteínas recombinantes ha revolucionado todas las áreas de la ciencia, debido a que ha permitido el estudio de proteínas puras desde el punto de vista estructural, funcional y de su

relevancia en la patogenia de múltiples enfermedades, conocimientos que han contribuido enormemente con el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, de hecho más de 200 proteínas recombinantes, han sido aprobadas para ser utilizadas con fines terapéuticos

✉ **Autor de correspondencia:** Lisbeth Berrueta Carrillo, correo electrónico: [lberruet@ula.ve](mailto:lberruet@ula.ve). y Siham Salmen Halabi, correo electrónico: [sihamsa@ula.ve](mailto:sihamsa@ula.ve). Instituto de Inmunología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela

(1). Existen diversas maneras de clonar y expresar las proteínas recombinantes, y a pesar de que en las últimas tres décadas se han desarrollado varios sistemas no bacterianos (levaduras, sistemas libre de células, baculovirus, etc.), el uso de *E. coli* como sistema de expresión, sigue siendo el preferido (2), debido a que es una de las formas más rápida, económica y fácil de aplicar, además de ser el sistema de expresión utilizado en el 50% de la producción de proteínas recombinantes. Sin embargo, tiene la desventaja que debido a la rápida expresión de las proteínas o a fallas en las modificaciones postraduccionales presentes en las células eucariotas, tales como la glicosilación, formilación, acetilación, entre otras; algunas pueden plegarse inadecuadamente o no plegarse. Esta desventaja se ha ido solventando a través del uso de nuevas estrategias destinadas a preservar la estructura tridimensional de la proteína en estudio (3).

Muchas de las proteínas recombinantes utilizadas provienen de agentes infecciosos, y su uso ha mejorado ostensiblemente, los sistemas diagnósticos y el desarrollo de vacunas (4). El virus de la hepatitis B (VHB), es uno de estos agentes infecciosos cuyo genoma ha sido caracterizado y secuenciado (5). El VHB es uno de los virus ADN más pequeño de la naturaleza, su genoma está compactado en una doble hebra de ADN parcialmente relajada circular, de aproximadamente 3200 nucleótidos, con cuatro marcos de lectura solapados que codifican para: *presS/S*, *preC-C*, *p* y *X*. El *presS/S* codifica para las tres proteínas estructurales de la envoltura: proteína larga (constituida por antígeno S o HBsAg (226 aa), *preS2* (55 aa) y *preS1* (108-119 aa), mediana (antígeno S y *preS2*) y pequeña (sólo el antígeno S) (6). Hallazgos recientes han asociado la presencia de variantes del *preS1/2*, con la cantidad de HBsAg circulantes, con su retención en el retículo de los hepatocitos (7), con la patogenia de la enfermedad y con el desarrollo del carcinoma hepatocelular (8). Adicionalmente, se ha evidenciado que los niveles de HBsAg séricos están en estrecha correlación con la cantidad de *preS1/2* soluble, y se han detectado concentraciones de hasta 100mg/ml del antígeno de superficie en circulación (9).

La proteína de envoltura del HBV, constituida por los tres componentes (S, *preS1* y *preS2*), es sintetizada en el retículo endoplasmático, el HBsAg tiene dos dominios transmembrana y es el encargado del anclaje, mientras que tanto el *preS1* y *preS2*, son los encargados de permitir el plegamiento adecuado de la proteína de envoltura (10, 11), de mediar la

activación transcripcional (12) dependiente PKC/MAPK e incrementar la tasa de proliferación de los hepatocitos (13), así como también incrementa la susceptibilidad del hepatocito a sufrir muerte celular (14). Debido a su importancia en la inmunopatogenia de la infección, en este trabajo describimos detalladamente un procedimiento para la expresión y purificación del *preS1/2* del virus de la hepatitis B, que puede contribuir como guía y punto de partida para su utilización en estudios funcionales y estructurales, y como componente patogénico importante durante la evolución de la enfermedad hepática.

## Materiales y métodos

### Materiales

Las *Escherichia coli* Top10 y HMS174 (DE3) fueron adquiridas de Stratagene La Jolla, CA. El Medio LB fue adquirido de Sigma, USA. El Isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (IPTG), la ampicilina, el cloramfenicol, el medio de cultivo D-MEM, el suero bovino fetal y el DAPI fueron adquiridos de Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA. El anti-*preS1* y anti-*preS2* del virus de la hepatitis B fue adquirido de Santa Cruz Biotechnology Inc., California, USA. Anti-IgG de ratón conjugado con Rhodamina fue adquirido de Jackson Laboratories, West Grove, PA. La columna IMAC fue adquirida de Profinity-BioRad, Hercules, CA. La columna polymixina B fue adquirida de Detoxi-Gel Pierce, Rockford, IL. Centrifugal filter units Amicon Ultracel fue adquirido de Millipore Corporation.

### Clonaje y transformación de *E. coli* con el vector pET3d-*preS1/2*:

Para el clonaje del gen *preS1/2* se utilizó la secuencia ADZ98695.1 del GenBank para el diseño de las siguientes sondas: forward, 5'-GGA TCG AGA TCT CGA TCC CGC-3'; reverse, 5'-GGG GAG ATC TCT ACT AATGGT GAT GGT GAT GGT GGT TCA GCG CAG GGT CCC C-3', que incluyó un sitio de restricción para la endonucleasa BglII, requerida para su inserción en el vector pET3d (15). La plantilla utilizada del ADN del HBV fue adquirida ACURUM y la PCR se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen). El producto amplificado fue purificado, tratado con la endonucleasa al igual que el plásmido y ambos sometidos a ligamiento en presencia de la ligasa T4 (Invitrogen); esta mezcla fue utilizada para transformar la cepa *E. coli* Top10 competente. Una vez transformada la cepa de *E. coli* Top10, fue crecida en medio de agar selectivo con ampicilina (50µg/ml) y después de 18 horas diez colonias fueron expandidas

en medio LB líquido, con el fin de purificar el plásmido, determinar los clones con el inserto y posteriormente enviar a secuenciar al Departamento de Biología Molecular de Virginia Commonwealth University. El plásmido con la secuencia correcta se utilizó para transformar la cepa HMS174 (DE3) de *E. coli* competente mediante choque térmico (16). HMS174 (DE3). El cultivo fue incubado con 3 µl del plásmido pET3d-preS1/2, durante 30 minutos en hielo, luego sometido a choque térmico a 42°C durante 1 minuto, colocadas en hielo inmediatamente y finalmente se le añadió 1 ml de medio LB frío, a fin de ser transferidas a 37°C e incubadas durante 1 hora (16). Pasado este tiempo, un inóculo de 200 µl fue agregado a 10 ml de medio LB líquido con ampicilina (50 µg/ml) y se dejó crecer durante toda la noche a 37°C con agitación (140 rpm) (Lab Companion SI300R). De este cultivo de bacterias, se realizaron alícuotas con glicerol al 10%, para congelarlas a -80°C hasta su uso y otra porción fue utilizada para obtener más plásmido puro.

Una muestra de las células congeladas fue utilizada para inocular 50 ml de medio LB/ampicilina, e incubadas durante toda la noche a 37°C en agitación. Este medio fue luego empleado para inocular 2 litros de LB/ampicilina 5% (p/v) de Glucosa/1mM de MgCl<sub>2</sub>, e incubado hasta que el cultivo alcanzara una densidad óptica de 0.600 a 0.800 (A<sub>600nm</sub>), momento en el que se le añadió 100 µg/ml de IPTG a fin de inducir la síntesis proteica durante las tres horas siguientes. Finalizado este tiempo las células fueron centrifugadas a 5000 rpm (4000xg) y el sedimento congelado a -20°C.

#### **Expresión y purificación de preS1/2**

La secuencia del preS1/2 fue analizada utilizando el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/pepinfo/>) a fin de predecir sus características fisicoquímicas, así como también su coeficiente de extinción molar, este último permitió hacer el cálculo aproximado de la concentración proteica. Los sedimentos fueron resuspendidos en el tampón de lisis (volumen total 20ml), compuesto por: 6 ml de STE 2X (50 mM Tris HCl pH 8, 25mM NaCl, 2mM EDTA), 8 ml de triton X100 al 5% (v/v), 100 µl de DTT 100mM, 200µl de PMSF 200mM, 200 µl de lisozima 10mg/ml, 20 µl de aprotinin/leupeptin a 1µg/ml y 20 µl de ortovanadato a 1µM), incubados durante 20 minutos en frío y sonicados en frío con 5 ciclos de 30 segundos, seguidos cada uno de 60 segundos de reposo (Fisher Sonic Modelo 150). Finalmente se añadió urea a una concentración final de 4M y se pasó por el homogenizador (5 pases). El lisado de bacterias se centrifugó a 15000 rpm (14000xg) durante 30 minutos

a 40°C, y el sobrenadante o lisado post-nuclear fue aplicado en la columna IMAC previamente cargada con NiSO<sub>4</sub> (200 mM). Una vez que todo el lisado paso a través de la columna, fue lavada con el tampón A (25 mM Tris pH 8, 300 mM de NaCl y 10mM de Imidazol), hasta que la densidad óptica (A<sub>280nm</sub>) del tampón colectado a través fue inferior a 0,05. Luego la columna fue tratada con el tampón B o de elusión (25 mM Tris, 300 mM de NaCl, 10mM de Imidazol, 100mM de EDTA, el tampón fue ajustado a pH 5), y el fluido a través de la columna fue colectado en fracciones de 3 ml cada una y la absorbancia monitorizada por el espectrofotómetro (UV 280 nm). Las fracciones se dejaron de coleccionar al momento que la absorbancia fue inferior a 0,05. Se tomó una muestra de cada una de las fracciones a fin de evaluar su pureza mediante electroforesis.

#### **Evaluación mediante SDS-PAGE y Western-blot**

Las muestras tomadas de cada una de los pasos del proceso de expresión y purificación, fueron diluidas ½ con el tampón de muestra, hervidas durante 3 minutos y luego sometidas a electroforesis en un gel discontinuo de poliacrilamida al 12% (p/v) (17). La corrida fue inicialmente sometida a 70 voltios hasta atravesar el gen concentrador y luego el voltaje se incrementó a 110 voltios para el corrido en el gen separador. Finalizada la corrida, el gel fue teñido con azul de coomassie.

Una vez visualizada la corrida se procedió a seleccionar las fracciones que se someterían a diálisis durante 48 horas en frío con tres cambios con agua deionizada ultrapura y 2 cambios con tampón Tris 25mM, a fin de eliminar el contenido de urea, EDTA e imidazol. La muestra fue liofilizada durante toda la noche, resuspendida en 2 ml de agua estéril y sometida a columna de afinidad para endotoxina (columna de agarosa acoplada a polymixina B, Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Finalmente, concentrada mediante el uso de columnas Amicon® (Millipore Corporation), esterilizada por filtración (0.22µm), cuantificada y alícuotada. Una muestra de esta preparación final fue sometida a electroforesis, electrotransferencia y revelado mediante Quimioluminiscencia (ECL, Pierce), utilizando anti-preS1 y anti-preS2 (Santa Cruz Biotechnology, CA), para la caracterización definitiva de la proteína purificada.

#### **Evaluación funcional del preS1/2**

En vista de que el preS1/2 es la proteína encargada de favorecer el tropismo y entrada del virus a la célula blanco y promover el proceso de muerte

**Tabla 1.** Características bioquímicas del preS1/2

Característica	Secuencia
Peso molecular	18 kDa
Número de residuos	174
Carga	5.5
Punto isoelectrico	10.6012
Coefficiente de extinción molar (A280)	29730
Coefficiente de extinción molar (A280) 1mg/ml =	1.628
Improbabilidad de ubicarse en los cuerpos de inclusión	0.893
	mggwsskprkgmgtlnsvnpn lgffpghqldpafgansnnpdw dfnknkdqwpqahqvgvsfg pgftpphgnllgwsppaqgilttv paappastnrqsgrqptpispp lrdshpqamqwnsstfhqalld prvrglyfpaggssstgvnvpvtt aspissifsrtdpapn

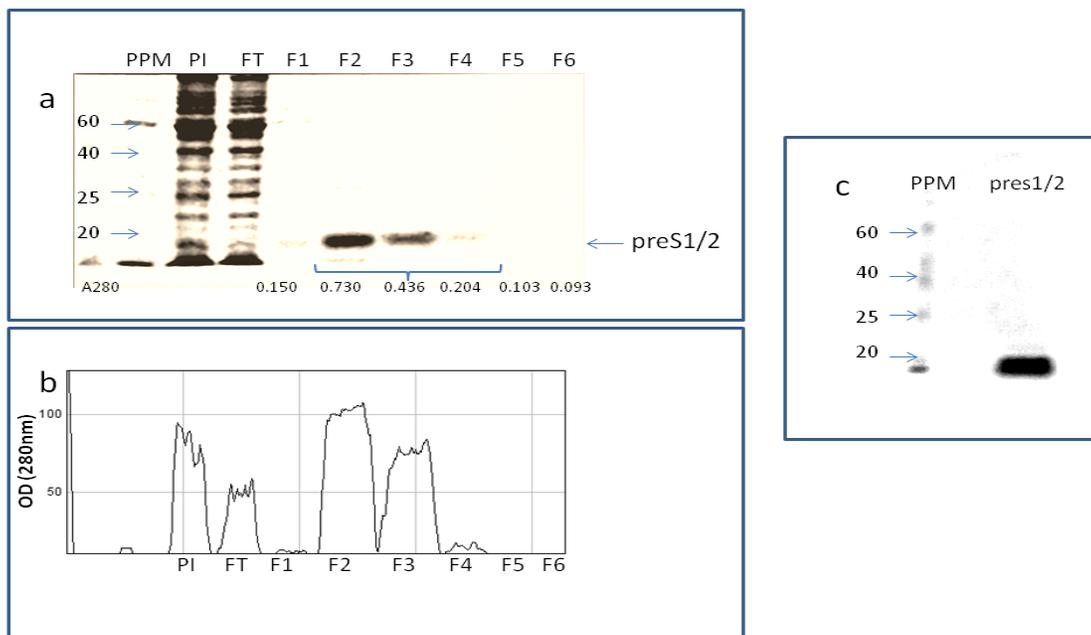
celular, se trató una línea celular de hepatocitos humanos (HepG2) con 65 µg/ml de preS1/2 durante 96 horas (dosis establecida mediante la realización de una curva dosis/tiempo), a fin de determinar el efecto de la proteína sobre la condensación de la cromatina a través de la tinción con DAPI y su unión e internalización en la célula hepática. Paralelamente, para los ensayos de apoptosis los hepatocitos fueron tratados con el producto de la purificación de bacterias tratados con el vector vacío o con 200ng/ml de anti-Fas (CH11) durante 48 horas (18). Las células

cultivadas en laminillas cubreobjetos estériles, fueron fijadas durante 10 minutos con metanol a -20°C, luego de tres lavados con PBS, las células fueron tratadas con Tritón-X100 a 0,1% (v/v) en PBS, lavadas y teñidas con anti-preS1/2 (1:20), lavadas 5 veces con PBS gelatina y teñidas con anti-IgG de ratón acoplada a rodamina (1:100), luego de tres lavados con PBS gelatina fueron incubadas con DAPI 0,5 µg/ml (1:1000), finalmente las laminillas fueron lavadas tres veces con PBS gelatina, dos con PBS, una vez con agua destilada y se montaron en laminas portaobjeto y se sellaron, a fin de visualizarse a través del microscopio de fluorescencia (LEICA DMR, Microsystems Wetzlar GmbH).

## Resultados y discusión

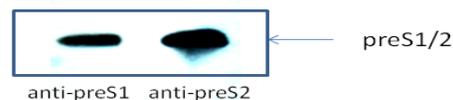
### Análisis y purificación del preS1/2

El preS1/2 del virus de la hepatitis B ha sido implicado en la inmunopatogenia de la infección y en los mecanismos de entrada (10) y destrucción de la célula blanco (14, 19), de ahí la importancia de poder tenerla como una proteína pura a fin de profundizar en cada una de estas funciones. El preS1/2 corresponde a una proteína de alrededor de 174 aminoácidos (20) y



**Figura 1. Evaluación bioquímica del preS1/2 recombinante.** La figura 1a muestra la corrida electroforética del lisado total post-inducción (PI), fluido a través de la columna (FT), y las 6 fracciones colectadas posterior a la elución (identificadas desde F1 a F6). En la parte inferior a las fracciones se indica las absorbancias obtenida para cada una de ellas. Figura 1b. Muestra análisis densitométrico de la presencia del preS1/2 en cada una de las muestras. La figura 1c, evidencia la corrida electroforética del preS1/2 posterior a la destoxificación, liofilización, filtración y esterilización.

con un peso molecular aproximado de 18 kDa (la tabla 1 resume sus características fisicoquímicas), y según su coeficiente de extinción molar la densidad óptica de 1.628 es el equivalente a 1mg/ml. En la figura 1 se evidencia la expresión del preS1/2 en el lisado post-inducción con IPTG y en las fracciones 2-4 como resultado de la elusión de la columna de níquel (Figuras 1a y 1b). Reportes previos (20) indican que la expresión del preS1/2 presenta dificultades debido a que es altamente susceptible a proteólisis y una porción considerable es expresada en los cuerpos insolubles, debido a esto se decidió utilizar en el tampón de lisis la urea 4M como agente que permite su solubilización y previene la proteólisis (21) y tampón ácido al momento de la elusión. Se evidenció con este método que las fracciones 2-4 (figura 1a) y la final (figura 1c), no tenían contaminantes y sin evidencia de degradación proteica. Las fracciones 2-4 fueron agrupadas para el proceso de diálisis y posterior liofilización. Las proteínas recombinantes expresadas en sistemas bacterianos tales como *E. coli*, tienen el inconveniente de que pueden contener contaminantes como las endotoxinas (22), constituidos principalmente por los lipopolisacáridos (LPS), que se encuentran adosados a la envoltura externa de las bacterias Gram negativas (23), durante el proceso de sonicación los LPS son extensivamente liberados (24), y representa una dificultad en el caso de ensayos biológicos, por lo que se recomienda en estos casos utilizar métodos adicionales para su eliminación (25). Existen varios métodos para eliminar las endotoxinas contaminantes de las proteínas recombinantes dentro de ellos están el uso de Triton-X114 que favorece la formación de micelas donde quedan atrapadas las endotoxinas (26), sin embargo su principal

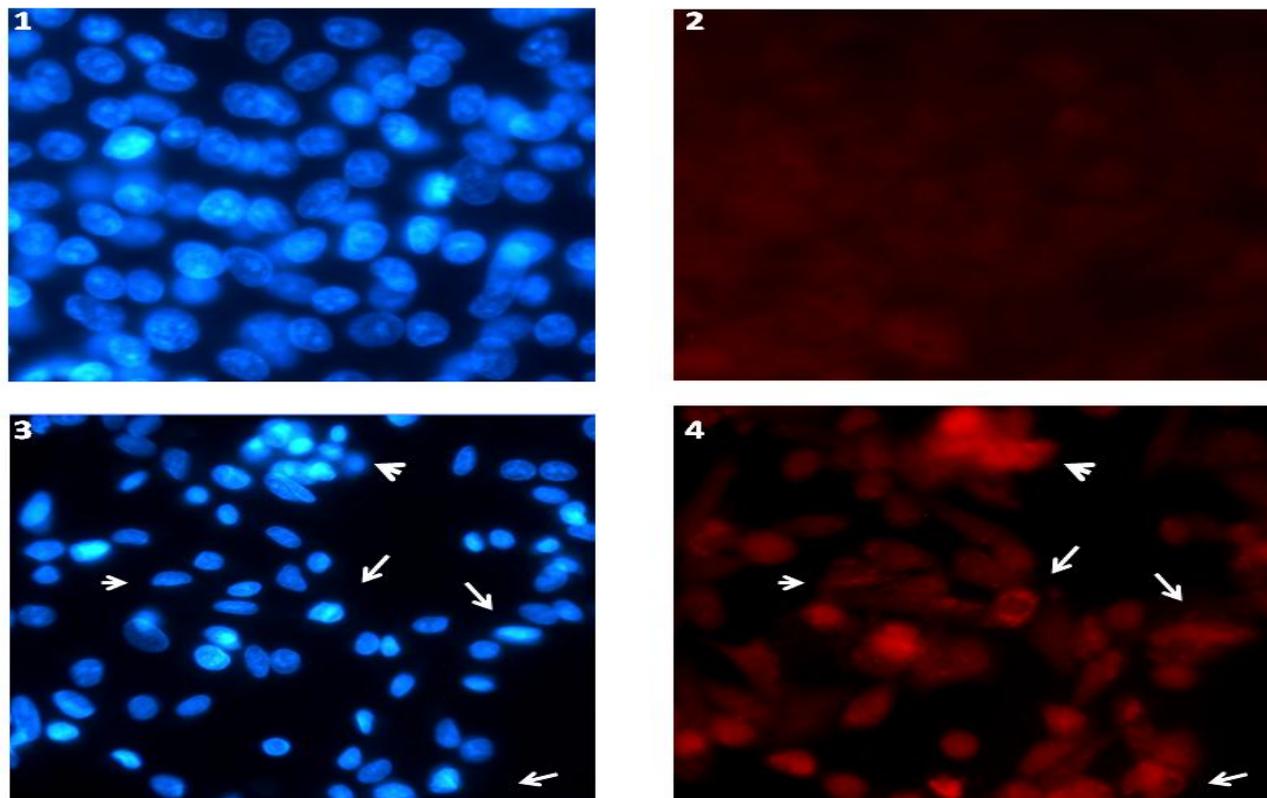


**Figura 2. Evaluación inmunogénica del preS1/2 recombinante.** Muestra el Western blot revelado por quimioluminiscencia de la proteína preS1/2, que es reconocida por dos anticuerpos monoclonales específicos contra cada uno de los componentes del preS del VHB.

inconveniente es que el Triton-X114 residual es difícil de eliminar. Otro método utilizado, es el uso de las columnas de polymixina B que tienen afinidad hacia los LPS, son fáciles de manejar y no presentan el inconveniente del Triton-X114 (27), así que en este trabajo se decidió utilizar estas columnas. Para ello la suspensión fue aplicada a la columna de polymixina B, se lavó tres veces con agua estéril y estas fracciones colectadas y agrupadas con la muestra original. Debido a que se triplicó el volumen inicial, fueron concentradas mediante centrifugación (Amicon®, Millipore Corporation) y de esta manera eliminar restos de sales presentes en la suspensión. Finalmente la proteína fue esterilizada mediante filtración con una membrana 0,22 estéril. La muestra fue alícuotada y una porción utilizada para cuantificación, electroforesis y Western blot. La concentración final obtenida fue de 1,5 mg/ml (volumen total 2 ml). La figura 1c, evidencia el preS1/2 una vez filtrado y liberado de endotoxinas y sales contaminantes. La identificación final de la proteína se realizó mediante Western blot contra las dos proteínas, mediante el uso de dos anticuerpos monoclonales específicos



**Figura 3. Inducción de la condensación de la cromatina nuclear por el preS1/2 recombinante.** Se evidencia los núcleos teñidos con DAPI de células tratadas con el producto purificado de bacterias transformadas con el vector vacío, durante 96 h (1), tratadas con anti-Fas (200ng/ml CH11, durante 48 horas) (2) y con preS1/2 recombinante (64µg/ml durante 96h) (3). Las flechas indican las células con la cromatina condensada



**Figura 4. Presencia del preS1/2 recombinante soluble en el interior de los hepatocitos (HepG2).** Las células incubadas en ausencia (1 y 2) y en presencia del preS1/2 recombinante (3 y 4) fueron marcadas con anti-preS2 monoclonal y luego con un anti-ratón acoplado a Rodamina. Se evidencia que el preS1/2 es internalizado por los hepatocitos humanos (4). Las flechas indican las células positivas para preS1/2.

contra el preS1 y preS2, en la figura 2 se puede evidenciar que la proteína es identificada por los anticuerpos específicos utilizados.

#### **El preS1/2 purificado preserva su actividad funcional**

Dos de las funciones más importantes en las que se ha implicado el preS1/2, es la de marcar el tropismo viral (28, 29) y mediar apoptosis en la célula blanco (19). Por ello se decidió incubar a una línea celular de hepatocitos humanos (HepG2) con el preS1/2 durante 96 h; finalizado este tiempo de incubación las células fueron tenidas a fin de identificar la presencia del preS1/2 en los hepatocitos y evaluar el grado de fragmentación y condensación nuclear, como evidencia de inducción de muerte celular. En la figura 3, se muestra que el preS1/2 purificado es capaz de marcar cambios asociados con la muerte celular de los hepatocitos humanos, asociado con la condensación de la cromatina, similares a los observados en las muestra tratadas con anti-Fas (CH11, un anticuerpo inductor de muerte celular extrínseca). Asimismo, en la figura 4 se muestra

presencia del preS1/2 en el interior de los hepatocitos, con una localización predominantemente citoplasmática y perinuclear, indicando su reconocimiento e internalización por los hepatocitos humanos. Finalmente, estos resultados muestran que este procedimiento es adecuado para la obtención del preS1/2 recombinante, con usos potenciales en estudios biológicos e incluso en ensayos terapéuticos.

#### **Agradecimiento**

Este proyecto fue financiado a través del CDCHTA-ULA código M-996-10-07-A

## Referencias

- Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat Biotechnol* 2010; 28:917-24. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Yin J, Li G, Ren X, Herrler G. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J Biotechnol* 2007; 127:335-47. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Francis DM, Page R. Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Curr Protoc Protein Sci* 2010; Chapter 5:Unit 5 24 1-9. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Egelkroun E, Rajan V, Howard JA. Overproduction of recombinant proteins in plants. *Plant Sci* 2011; 184:83-101. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Schaefer S, Magnius L, Norder H. Under construction: classification of hepatitis B virus genotypes and subgenotypes. *Intervirology* 2009; 52:323-5. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 2007; 13:48-64. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Pollicino T, Amaddeo G, Restuccia A, Raffa G, Alibrandi A, Cutroneo G, Favalaro A, Maimone S, Squadrito G, Raimondo G. Impact of hepatitis B virus (HBV) preS/S genomic variability on HBV surface antigen and HBV DNA serum levels. *Hepatology* 2012;10.1002/hep.25592. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Chen BF, Liu CJ, Jow GM, Chen PJ, Kao JH, Chen DS. High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. *Gastroenterology* 2006; 130:1153-68. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Lian M, Zhou X, Wei L, Qiu S, Zhou T, Li L, Gu X, Luo M, Zheng X. Serum levels of preS antigen (HBpreSAg) in chronic hepatitis B virus infected patients. *Virology* 2007; 4:93. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol* 2007; 13:65-73. [[PubMed](#)]
- Bruss V, Vieluf K. Functions of the internal pre-S domain of the large surface protein in hepatitis B virus particle morphogenesis. *J Virol* 1995; 69:6652-7. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Rothmann K, Schnolzer M, Radziwill G, Hildt E, Moelling K, Schaller H. Host cell-virus cross talk: phosphorylation of a hepatitis B virus envelope protein mediates intracellular signaling. *J Virol* 1998; 72:10138-47. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Hildt E, Munz B, Saher G, Reifenberg K, Hofschneider PH. The PreS2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice. *EMBO J* 2002; 21:525-35. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Liang X, Qu Z, Zhang Z, Du J, Liu Y, Cui M, Liu H, Gao L, Han L, Liu S, Cao L, Zhao P, Sun W. Blockade of preS2 down-regulates the apoptosis of HepG2.2.15 cells induced by TRAIL. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 369:456-63. [[PubMed](#)]
- Nunez E, Wei X, Delgado C, Rodriguez-Crespo I, Yelamos B, Gomez-Gutierrez J, Peterson DL, Gavilanes F. Cloning, expression, and purification of histidine-tagged preS domains of hepatitis B virus. *Protein Expr Purif* 2001; 21:183-91. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. NY 2012.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Aoudjehane L, Podevin P, Scatton O, Jaffray P, Dusanter-Fourt I, Feldmann G, Massault PP, Grira L, Bringuier A, Dousset B, Chouzenoux S, Soubrane O, Calmus Y, Conti F. Interleukin-4 induces human hepatocyte apoptosis through a Fas-independent pathway. *FASEB J* 2007; 21:1433-44. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Liang X, Du J, Liu Y, Cui M, Ma C, Han L, Qu Z, Zhang Z, Sun Z, Zhang L, Chen YH, Sun W. The hepatitis B virus protein MHBs(t) sensitizes hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through ERK2. *Apoptosis* 2007; 12:1827-36. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Heermann KH, Goldmann U, Schwartz W, Seyffarth T, Baumgarten H, Gerlich WH. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-S sequence. *J Virol* 1984; 52:396-402. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Sadana A. Review: Protein refolding and inactivation during bioseparation: Bioprocessing implications. *Biotechnol Bioeng* 1995; 48:481-9. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Fraker DL, Stovroff MC, Merino MJ, Norton JA. Tolerance to tumor necrosis factor in rats and the relationship to endotoxin tolerance and toxicity. *J Exp Med* 1988; 168:95-105. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Schletter J, Heine H, Ulmer AJ, Rietschel ET. Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbiol* 1995; 164:383-9. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Salek-Ardakani S, Stuart AD, Arrand JE, Lyons S, Arrand JR, Mackett M. High level expression and purification of the Epstein-Barr virus encoded cytokine viral interleukin 10: efficient removal of endotoxin. *Cytokine* 2002; 17:1-13. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Remick DG, Kunkel RG, Larrick JW, Kunkel SL. Acute in vivo effects of human recombinant tumor necrosis factor. *Lab Invest* 1987; 56:583-90. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Liu S, Tobias R, McClure S, Styba G, Shi Q, Jackowski G. Removal of endotoxin from recombinant protein preparations. *Clin Biochem* 1997; 30:455-63. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Montbriand PM, Malone RW. Improved method for the removal of endotoxin from DNA. *J Biotechnol* 1996; 44:43-6. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Hao Z, Zheng L, Kluwe L, Huang W. Ferritin light chain and squamous cell carcinoma antigen 1 are coreceptors for cellular attachment and entry of hepatitis B virus. *Int J Nanomedicine* 2012; 7:827-34. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Park JH, Choi EA, Cho EW, Lee YJ, Park JM, Na SY, Kim KL. Detection of cellular receptors specific for the hepatitis B virus preS surface protein on cell lines of extrahepatic origin. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277:246-54. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

**Como citar este artículo:** Rojas M, Valencia-Molina JC, Montes-Berrueta D, Ruiz-Carrillo GR, Berrueta-Carrillo L, Peterson DL, Berrueta L, Salmen S. Expresión y purificación del antígeno preS1/2 y su utilidad en el estudio de la patogenia de la infección por el virus de la hepatitis B. *Avan Biomed* 2013; 2: 53-9

## Frecuencia cardiaca y movimientos fetales posterior a la administración de betametasona para maduración pulmonar fetal (Fetal heart rate and movements after betamethasone administration for fetal lung maturity)

Yolima Ruiz-Lopez<sup>1</sup>, Keibis Jiménez-Castillejo<sup>1</sup>, Eduardo-Reyna Villasmil<sup>1</sup>✉, Duly Torres-Cepeda<sup>1</sup>, Joel Santos-Bolivar<sup>1</sup>, Jhoan Aragon-Charris<sup>1</sup>, Jorly Mejia-Montilla<sup>1</sup>, Nadia Reyna-Villasmil<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Servicio de Obstetricia y Ginecología, Maternidad "Dr. Nerio Belloso", Hospital "Dr. Urquinaona", Maracaibo - Venezuela.

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas "Dr. Félix Gómez", Maracaibo - Venezuela.

[ARTICULO ORIGINAL]

Recibido: 31 de Diciembre de 2012. Aceptado: 03 de Abril de 2013.

### Resumen

El objetivo de la investigación fue demostrar las modificaciones de la frecuencia cardiaca y los movimientos fetales producidas por la administración de betametasona para maduración pulmonar fetal. Se realizó una investigación de tipo explicativa, prospectiva y longitudinal con un diseño cuasi-experimental y una muestra no probabilística de 106 gestantes entre 24 y 34 semanas, con diagnóstico de amenaza de parto pretérmino tratadas con betametasona (12 mg intramuscular cada 24 horas por dos dosis) que acudieron al Hospital Central "Dr. Urquinaona". Se evaluaron los movimientos fetales y frecuencia cardiaca materna y fetal. No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia cardiaca materna comparado con los valores iniciales ( $p = ns$ ). Se observó que el valor inicial de la frecuencia cardiaca fetal fue de  $135,1 \pm 9,7$  latidos por minuto para aumentar luego a  $137,2 \pm 8,9$  latidos por minuto ( $p = ns$ ) para presentar un nuevo aumento hasta ( $142,9 \pm 9,9$  latidos por minuto) que fue significativo comparado con los valores iniciales ( $p < 0,05$ ). Se observó una disminución significativa de movimientos fetales medidos en 30 minutos después de la primera inyección ( $23,1 \pm 6,0$  movimientos comparado con  $14,8 \pm 7,0$  movimientos), para aumentar después de la segunda inyección pero aun presentando valores significativamente más bajos comparado con los valores iniciales ( $20,0 \pm 6,7$  movimientos;  $p < 0,05$ ). Se concluye que la administración de betametasona para maduración pulmonar fetal produce incremento significativo en la frecuencia cardiaca y reducción marcada de los movimientos fetales.

### Palabras clave

*Betametasona, Maduración pulmonar, Movimientos fetales.*

### Abstract

The objective of research was to demonstrate fetal heart rate and movements modifications by the use of betamethasone for fetal lung maturity. An explicative, prospective and longitudinal research was done with a quasi-experimental design and a non-probabilistic sample of 106 pregnant patients between 24 and 34 weeks treated with betamethasone (12 mg IM BID) that assisted to Hospital Central "Dr. Urquinaona." Fetal movements, maternal and fetal heart rates were evaluated. There were not differences in materna heart rate compared with initial values ( $p = ns$ ). There was observed that fetal heart rate initial values were  $135.1 \pm 9.7$  beats per minute and increases to  $137.2 \pm 8.9$  beats per minute ( $p = ns$ ) and showed a new increase to  $142.9 \pm 9.9$  beats per minute that was significant compared with initial values ( $p < 0.05$ ). There was observed a significant decrease in fetal movement measured in 30 minutes after first injection ( $23,1 \pm 6,0$  movements compared with  $14,8 \pm 7,0$  movements), to increase after second injection but still were significant lower compared with initial values ( $20,0 \pm 6,7$  movements;  $p < 0.05$ ). It is concluded that the use of betamethasone for induction of fetal lung maturity produced significant reduction in fetal movements and an increase of fetal heart rate.

### Keywords

*Betamethasone, Lung maturity, Fetal movements.*

## Introducción

La eficacia de la administración de corticosteroides prenatales para la inducción de la maduración pulmonar fetal ha sido ampliamente demostrada (1). Los esteroides más estudiados son la betametasona y la dexametasona, los cuales son ampliamente utilizados para este propósito debido a su alta capacidad para atravesar la placenta y su larga vida media (2). Estos dos compuestos son casi idénticos desde el punto de vista estructural, y solo difieren entre ellos en la posición alfa y beta del grupo metilo en la posición 16 (3).

Varios estudios han sugerido que la administración de corticosteroides prenatales afecta la frecuencia cardíaca fetal (4). Sin embargo, efectos opuestos se han observado en respuesta a la betametasona cuando se compara con otros corticosteroides. Se ha encontrado que la betametasona induce modificaciones transitorias de la frecuencia cardíaca (5,6), número de desaceleraciones (5,7) y amplitud máxima de las aceleraciones (5). En algunos casos ocurre supresión marcada de la frecuencia cardíaca lo cual puede mal interpretarse como sufrimiento fetal (8). Esto produce un parto iatrogénico de un feto prematuro. Jellyman y col. (6) reportaron que algunos corticosteroides aumentan la variación de la frecuencia cardíaca.

Debido a que la monitorización pre-parto de la frecuencia cardíaca fetal es una herramienta importante para la determinación del bienestar fetal, los efectos farmacológicos de los corticosteroides sobre los parámetros de la frecuencia cardíaca son importantes en la práctica clínica, por lo que el objetivo de la investigación fue demostrar las modificaciones de la frecuencia cardíaca y los movimientos fetales producidas por la administración de betametasona para maduración pulmonar fetal.

## Metodología

La investigación de este estudio fue explicativa, prospectiva y longitudinal con un diseño cuasi-experimental y una muestra no probabilística intencional de 106 pacientes que acudieron a la consulta prenatal de alto riesgo del Hospital Central "Dr. Urquinaona". El Comité de Ética del hospital aprobó la investigación y se obtuvo el consentimiento informado de todas las pacientes.

Se incluyeron embarazadas entre 18 y 40 años de edad, con embarazos de 24 a 34 semanas de gestación un índice de masa corporal menor de 30 Kg/m<sup>2</sup> y embarazos de alto riesgo que ameritaron la administración de betametasona para la inducción de la maduración pulmonar fetal. Se excluyeron las embarazadas con polihidramnios, hemorragia del tercer trimestre, sospecha de restricción del crecimiento intrauterino del feto (circunferencia cefálica, circunferencia abdominal y longitud del fémur menor del percentil 10 de referencia) (9), síndrome de HELLP, amenaza de parto pretérmino, alteraciones de la frecuencia cardíaca fetal, gestaciones múltiples, presencia de infección intrauterina o materna activa, enfermedad hipertensiva crónica o gestacional, enfermedad cardíaca, hepática, renal o sistémica crónica, diabetes mellitus pre o gestacional y hábito tabáquico. También se excluyeron a las pacientes que recibieron cualquier otro medicamento diferente a la vitaminoterapia y aquellas que se negaron a participar en la investigación. A todas las gestantes seleccionadas por los investigadores se les explicó el estudio y luego de su consentimiento, se les realizó la historia clínica integral, tomando en cuenta la anamnesis (fecha de la última regla, paridad, edad gestacional), examen físico (peso, talla, índice de masa corporal, frecuencia cardíaca, presión arterial y otros hallazgos) y el perfil biofísico. Una vez seleccionadas las pacientes se le administró inyecciones intramusculares de betametasona (12 mg) por dos días consecutivos. El índice de masa corporal (IMC) se calculó por el peso dividido por la talla al cuadrado (kg/m<sup>2</sup>).

Las mediciones de la frecuencia cardíaca y los movimientos fetales se realizaron en todas las pacientes entre las 12 m y las 6 pm tomando en cuenta el ritmo circadiano de la actividad biofísica del feto. Las mediciones de frecuencia cardíaca materna y fetal se realizaron en tres ocasiones: La primera, antes de la administración de la primera dosis de betametasona; la segunda, 24 horas después de la segunda y última inyección; y la tercera ocasión, siete días luego de la administración de la última dosis de betametasona para la maduración pulmonar fetal. Todas las pacientes fueron colocadas en posición supina, ligeramente lateralizada a la izquierda para evitar la hipotensión supina. La frecuencia cardíaca fue evaluada y analizada utilizando medios electrónicos (Sonicaid® BD4000xs). El sistema suministra información computarizada sobre la frecuencia cardíaca basal, aceleraciones y desaceleraciones y características de los episodios. Cada periodo de observación fue de 60 minutos. Posteriormente se

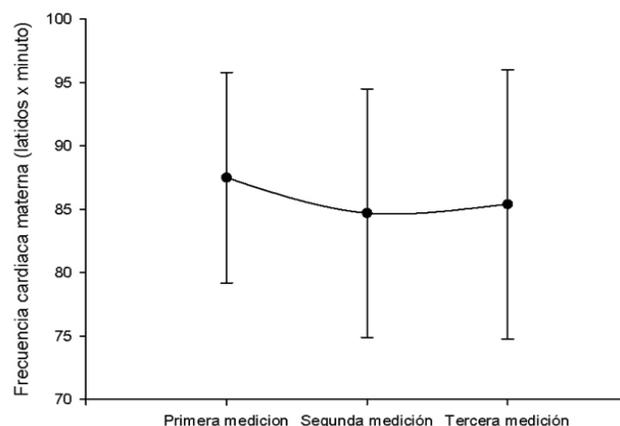
realizó una evaluación ecográfica de 30 minutos usando un Ecógrafo General Electric® Logiq Pro 3 utilizando un transductor abdominal convexo. Fueron evaluados los movimientos del tronco, los miembros y respiratorios.

Los datos se expresaron como valores absolutos y relativos, y otros como media aritmética±desviación estándar y son presentados en tablas. Se utilizará la prueba de ANOVA con post-test de Dunnet tomando como control los valores iniciales. Se consideró  $p < 0,05$  como nivel de confiabilidad estadística.

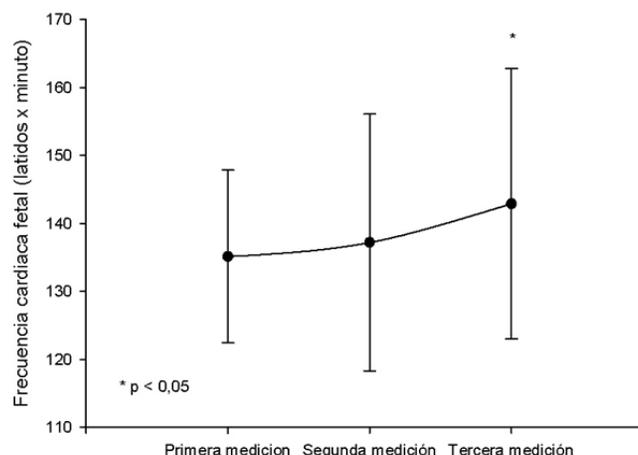
## Resultados

Se incluyeron 106 pacientes que fueron sometidas a inyecciones de betametasona para inducir la maduración pulmonar fetal. La edad promedio de las pacientes fue de  $22,6\pm 5,1$  años y la edad gestacional al momento del tratamiento fue de  $31,8\pm 3,0$  semanas. El IMC de las pacientes fue de  $26,7\pm 5,2$  Kg/m<sup>2</sup>.

En la tabla 1 se muestran los valores iniciales y las modificaciones de la frecuencia cardíaca materna, frecuencia cardíaca fetal y movimientos fetales. Con relación a la frecuencia cardíaca materna, se observó que el valor inicial fue de  $87,5\pm 8,3$  latidos por minuto, luego de la inyección de la primera dosis de betametasona los valores fueron de  $83,7\pm 9,8$  latidos por minuto y luego de la segunda inyección los valores promedio fueron de  $85,4\pm 10,6$  latidos por minuto. No se encontraron diferencias significativas comparado con los valores iniciales (figura 1;  $p = ns$ ). Al analizar la



**Figura 1.** Relación entre la frecuencia cardíaca materna con respecto a las dosis de Betametasona.



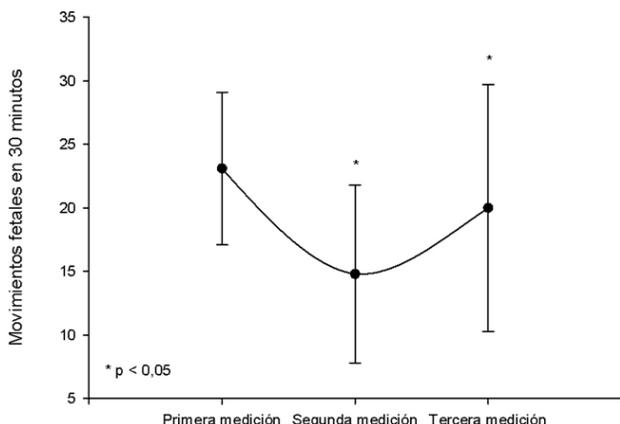
**Figura 2.** Relación entre la frecuencia cardíaca fetal con respecto a las dosis de Betametasona.

frecuencia cardíaca fetal (figura 2), se observó que el valor inicial fue de  $135,1\pm 9,7$  latidos por minuto para aumentar luego a  $137,2\pm 8,9$  latidos por minuto ( $p = ns$ ) para presentar un nuevo aumento hasta  $142,9\pm 9,9$  latidos por minuto que fue significativo comparado con los valores iniciales ( $p < 0,05$ ). Con respecto a los valores de movimientos fetales medidos en 30 minutos (figura 3), el valor inicial fue de  $23,1\pm 6,0$  movimientos para presentar una disminución significativa y alcanzar  $14,8\pm 7,0$  movimientos después de la primera inyección, para presenta un ligero aumento después de la segunda inyección ( $20,0\pm 6,7$  movimientos) pero aun presentando valores significativamente más bajos comparado con los valores iniciales ( $p < 0,05$ ).

Al relacionar la frecuencia cardíaca materna con los movimientos fetales, se observó que en ninguno de los tres periodos existía una relación significativa entre estos dos parámetros (inicial  $r=0,091$ , luego de la primera inyección  $r=-0,110$  y luego de la segunda inyección  $r=-0,275$ ;  $p=ns$ ).

Con respecto a las variaciones de la frecuencia cardíaca materna, frecuencia cardíaca fetal y movimientos fetales por índice de masa corporal de las embarazadas (tabla 2) y por semanas de gestación (tabla 3). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores promedio de las tres determinaciones en cada uno de los periodo de medición en las pacientes con índice de masa corporal  $< 25$  kg/m<sup>2</sup>, entre  $25-29$  kg/m<sup>2</sup> y aquellas con  $> 30$  kg/m<sup>2</sup> ( $p=ns$ ). Tampoco se encontraron diferencias entre las pacientes con embarazos  $< 30$  semanas,

aquellos entre 30 y 32 semanas y con las pacientes de >33 semanas ( $p=ns$ ).



**Figura 3.** Relación entre los movimientos de detalles con respecto a las dosis de Betametasona.

### Discusión

El principal hallazgo de la presente investigación es que la inyección de betametasona para la inducción de la maduración pulmonar fetal es que produce aumento en la frecuencia cardíaca fetal y una disminución transitoria de los movimientos fetales, elementos utilizados para la evaluación del bienestar fetal.

Los resultados de esta investigación son apoyados por las observaciones de de Heus y col. (7) quienes reportaron una disminución de los

movimientos fetales, al igual que los movimientos respiratorios y la variabilidad de la frecuencia cardíaca fetal en respuesta a la betametasona. En contraste, Jellyman y col. (6) observaron un incremento de la variabilidad a corto plazo 2 días después de la inyección de corticosteroides. En esta investigación, no se encontró los efectos supresores de los corticosteroides sobre la frecuencia cardíaca fetal en las pacientes tratadas con betametasona, como se ha descrito para otros corticosteroides. De Heus y col. (7) propusieron que las diferencias entre sus hallazgos y los resultados de Jellyman y col. (6) no pueden ser explicadas por la administración de diferentes periodos de medición (periodos cortos o largos), respectivamente. En la presente investigación se observó el aumento de la frecuencia cardíaca, lo cual es contrario a lo descrito previamente.

Las discrepancias entre los resultados de los tres estudios es particularmente sorprendente, debido a que investigaciones previas (6,7) y esta investigación es que en todos se utilizó análisis electrónico de la frecuencia cardíaca fetal y las tres poblaciones tenían edades gestacionales similares. Sin embargo, la población de un estudio fue única, ya que 21 de los 28 fetos fueron obtenidos por cesárea debido a sufrimiento fetal agudo (6). Estas características podrían sugerir que esos fetos estaban posiblemente enfrentando condiciones hipoxémicas al momento de la evaluación, lo cual puede posiblemente haber alterado las respuestas del sistema nervioso central a los esteroides.

Los movimientos corporales y de los miembros (al igual que los movimientos respiratorios) presentaron una respuesta temporal diferente en

**Tabla 1.** Modificaciones en la frecuencia cardíaca materna, Frecuencia cardíaca fetal y movimientos fetales.

n=106	Primera Medición (Antes de la primera dosis)	Segunda Medición (24 horas después de la segunda dosis)	Tercera Medición (7 días después de la segunda dosis)
Frecuencia cardíaca materna, latidos por minuto	87,5 +/- 8,3	84,7 +/- 9,8	85,4 +/- 10,6
Frecuencia cardíaca fetal, latidos por min	135,1 +/- 12,7	137,2 +/- 18,9	142,9 +/- 19,9*
Movimientos fetales en 30 minutos	23,1 +/- 6,0	14,8 +/- 7,0*	20,0 +/- 9,7*

\*  $p < 0,05$  comparado con los valores iniciales.

relación a la exposición a la corticosteroides para lo descrito para la frecuencia cardíaca fetal (6,7). En efecto, este parámetro fue marcadamente afectado por el uso de la betametasona. Aunque se ha descrito que la respuesta a otros corticosteroides es menos pronunciada en comparación a la betametasona, la reducción de los movimientos en más de 50% después de la primera inyección y mayor del 15% después de la segunda inyección permitió establecer diferencias estadísticamente significativas al compararlo con los valores iniciales. Después de la primera inyección de betametasona, 5 fetos (10,8%) presentaron menos de 5 movimientos en 30 minutos. Cuando se analizó la relación de este hecho con la presencia de disminución de la frecuencia cardíaca fetal, se observó que ninguno de los 5 fetos presentó frecuencias cardíacas que podrían ser consideradas patológicas ( $< 120$  latidos x min). Este hallazgo sobre los efectos supresores de la betametasona sobre los movimientos fetales puede ser debido a una susceptibilidad individual de algunos fetos a los efectos farmacológicos de los corticosteroides. Sin embargo, el tamaño muestral es muy pequeño para comprobar esa hipótesis. Se debe ser cuidadoso en este aspecto, ya que la observación de valores bajos de movimientos fetales, como parte

del perfil biofísico fetal, puede llevar a una interrupción iatrogénica del embarazo.

Solo se puede especular sobre los mecanismos por los cuales los corticosteroides causan modificaciones en la frecuencia cardíaca y en los movimientos fetales. Debido a que las actividades físicas y la frecuencia cardíaca están sujetas a un ritmo circadiano (10), es posible que la supresión del eje hipófisis - suprarrenal por la administración de esteroides exógenos afecte la variación diurna. La reactividad máxima de la frecuencia cardíaca y los movimientos fetales durante las últimas 10 semanas de gestación son generalmente observadas en las horas finales de la noche (4), cuando las concentraciones de corticosteroides tienden a ser más bajas. En un modelo de ovejas, los movimientos respiratorios fetales muestran una relación inversa con las concentraciones de ACTH fetal (11). Echeverría y col. (12) han propuesto que la baja actividad fetal en las horas de la mañana y la alta actividad fetal en las horas de la tarde se correlacionan inversamente con las concentraciones de cortisol. Debido a que los corticosteroides maternos atraviesan la placenta, se puede pensar en la existencia de una

**Tabla 2.** Modificaciones de la frecuencia cardíaca materna, frecuencia cardíaca fetal y movimientos fetales por índice de masa corporal.

n=106	Índice de Masa Corporal		
	<25 kg/m <sup>2</sup> (n = 29)	25 - 29 Kg/m <sup>2</sup> (n = 45)	> 30 Kg/m <sup>2</sup> (n = 32)
Frecuencia cardíaca materna, latidos por minuto.			
<i>Primera medición</i>	88,0±6,3	86,8±7,3	84,5±7,9
<i>Segunda medición</i>	84,4±11,1	86,0±11,0	84,9±10,5
<i>Tercera medición</i>	83,1±10,9	84,6± 9,1	83,5±12,2
Frecuencia cardíaca fetal, latidos por min.			
<i>Primera medición</i>	137,0±15,7	135,7±12,4	132,6±12,1
<i>Segunda medición</i>	139,0±17,9	133,7±17,3	134,4±20,1
<i>Tercera medición</i>	145,5±21,5	147,9±21,1	140,3±20,1
Movimientos fetales en 30 minutos.			
<i>Primera medición</i>	24,2±5,6	25,2±5,9	22,0±6,0
<i>Segunda medición</i>	16,4± 8,2	19,9±7,2	14,1±6,3
<i>Tercera medición</i>	20,7±9,2	20,6±10,8	20,9±8,5

**Tabla 3.** Modificaciones de la frecuencia cardíaca materna, frecuencia cardíaca fetal y movimientos fetales por semana de gestación.

n=106	Semanas de Gestación		
	< 30 semanas (n = 16)	30 - 32 semanas (n = 49)	> 33 semanas (n = 41)
Frecuencia cardíaca materna, latidos por minuto.			
<i>Primera medición</i>	86,5 +/- 7,9	86,2 +/- 7,7	86,9 +/- 6,5
<i>Segunda medición</i>	86,0 +/- 9,6	84,0 +/- 12,1	85,2 +/- 6,7
<i>Tercera medición</i>	82,7 +/- 13,3	84,4 +/- 8,3	83,8 +/- 10,6
Frecuencia cardíaca fetal, latidos por min.			
<i>Primera medición</i>	133,9 +/- 11,9	136,4 +/- 14,3	136,4 +/- 14,3
<i>Segunda medición</i>	139,9 +/- 18,4	132,1 +/- 19,0	132,1 +/- 19,0
<i>Tercera medición</i>	144,4 +/- 21,3	147,3 +/- 22,1	147,3 +/- 22,1
Movimientos fetales en 30 minutos.			
<i>Primera medición</i>	23,1 +/- 6,1	24,7 +/- 6,3	23,8 +/- 5,3
<i>Segunda medición</i>	14,8 +/- 7,9	15,4 +/- 7,9	15,5 +/- 7,3
<i>Tercera medición</i>	19,9 +/- 9,9	21,2 +/- 9,6	20,5 +/- 9,3

retroalimentación endocrina trans-placentaria de la actividad de la hipófisis - suprarrenal (12). Es posible, por lo tanto, que la modificación observada en la frecuencia cardíaca fetal y en los movimientos fetales posterior a la administración de corticosteroides refleje una exageración de los mecanismos endocrinos normales los cuales afectan los patrones de actividad fetal *in utero*.

Un mecanismo alternativo puede ser el efecto supresor directo de los corticosteroides sobre la actividad neural fetal. La betametasona rápidamente atraviesa la placenta (13) y los receptores de glucocorticoides se presentan en gran cantidad en el tejido cortical cerebral y los núcleos subcorticales, incluyendo las porciones medias del cerebro (3). La capacidad de los glucocorticoides sintéticos de suprimir la actividad neural también ha sido documentada. Es posible, que un efecto supresor cerebral sobre el sistema activador reticular y / o los centros funcionales del cerebro, afecte los estados conductuales del feto y por lo tanto afectar la frecuencia cardíaca fetal y los movimientos fetales. Aunque los estados conductuales fetales no están completamente organizados antes de las 36 semanas, los variables estados individuales pueden ser afectados por intervenciones farmacológicas (14).

Las contracciones uterinas inducidas por los corticosteroides pueden ser también un mecanismo potencial para los cambios observados, al menos con relación a los movimientos fetales. Se ha demostrado un aumento en la actividad uterina posterior luego de la administración de betametasona intramuscular (15), y estas inyecciones son frecuentemente utilizadas en modelos animales con ovejas para iniciar el parto (16). La reducción o cese de los movimientos en respuesta a las contracciones parece solo ocurrir en la fase activa del parto y no durante la fase latente de este (17). Ninguna de las pacientes en la presente investigación estaba en fase activa del parto.

Es probable que otros fármacos administrados a las pacientes con embarazos pre-términos induzcan las modificaciones en los movimientos fetales. Existen reportes que las pacientes tratadas con clorhidrato de isoxuprina u otros betamiméticos como tocolíticos junto con betametasona o dexametasona, generalmente no afectan las características de la frecuencia cardíaca fetal (18), ya que solamente producen elevación de la frecuencia cardíaca materna comparado con los valores iniciales (19). Más aún, los movimientos fetales tienden a aumentar, más que a disminuir, en respuesta a los betamiméticos (5).

También se debe considerar que los efectos producidos por la betametasona en esta investigación sobre la frecuencia cardíaca fetal y los movimientos fetales puede ser un verdadero sufrimiento fetal. Esta es una posibilidad poco probable, considerando la naturaleza transitoria de los efectos. Más aún, de Heus y col. (7) suministraron evidencia de valores normales de oxígeno fetal posterior a la administración de betametasona, demostrado por la ausencia de cambios en los movimientos oculares fetales. En un modelo animal, la hipoxia moderada o severa está generalmente asociada con disminución de los movimientos oculares fetales (1). La posibilidad que aparezca una verdadera hipoxia, por lo tanto, es poco probable pero no puede ser completamente excluida sin la realización de otras investigaciones.

Desde el punto de vista práctico, sin embargo, los obstetras podrían enfrentarse ocasionalmente a fetos que muestran modificaciones de la frecuencia cardíaca y disminución de los movimientos corporales y respiratorios posterior a la administración de

corticosteroides. Debido a que los corticosteroides suprimen componentes de dos de las más importantes herramientas para la determinación del bienestar fetal (el análisis de la frecuencia cardíaca fetal y el perfil biofísico), el diagnóstico diferencial entre efectos fisiopatológicos y farmacológicos puede ser extremadamente difícil. La forma óptima para la determinación del bienestar fetal bajo estas circunstancias aún debe ser determinada. La monitorización prolongada de la frecuencia cardíaca fetal quizá sea la herramienta más valiosa para obtener información sobre el estado fetal, debido a que por lo menos uno de los componentes del perfil biofísico fetal, como lo son los movimientos corporales fetales, pueden estar más suprimidos en fetos susceptibles.

Sobre la base de los resultados se puede concluir que la administración de betametasona para maduración pulmonar fetal produce incremento significativo en la frecuencia cardíaca y reducción marcada de los movimientos fetales.

## Referencias

1. Mascio CE, Olson AK, Ralphe JC, Tomanek RJ, Scholz TD, Segar JL. Myocardial vascular and metabolic adaptations in chronically anemic fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005; 289: R1736-45. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
2. Vélez G. Esteroides antenatales para maduración pulmonar: ¿Curso único o cursos múltiples? una pregunta aún vigente. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 2004;55: 308-14. [[Google Scholar](#)]
3. Oitzl MS, Champagne DL, van der Veen R, de Kloet ER. Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neurosci Biobehav Rev.* 2010; 34:853-66. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
4. Nasello-Paterson C, Natale R, Connors G. Ultrasonic evaluation of fetal body movements over twenty-four hours in the human fetus at twenty-four to twenty-eight weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol.* 1988;158: 312-6. [[PubMed](#)]
5. Sawdy RJ, Lye S, Fisk NM, Bennett PR. A double-blind randomized study of fetal side effects during and after the short-term maternal administration of indomethacin, sulindac, and nimesulide for the treatment of preterm labor. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188:1046-51. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
6. Jellyman JK, Gardner DS, Edwards CM, Fowden AL, Giussani DA. Fetal cardiovascular, metabolic and endocrine responses to acute hypoxaemia during and following maternal treatment with dexamethasone in sheep. *J Physiol.* 2005; 567: 673-88. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
7. de Heus R, Mulder EJ, Derks JB, Koenen SV, Visser GH. Differential effects of betamethasone on the fetus between morning and afternoon recordings. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008; 21: 549-54. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
8. Kelly MK, Schneider EP, Petrikovsky BM, Lesser ML. Effect of antenatal steroid administration on the fetal biophysical profile. *J Clin Ultrasound.* 2000; 28: 224-6. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
9. Baschat AA, Hecher K. Fetal growth restriction due to placental disease. *Sem Perinatol.* 2004; 28: 67-80. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
10. Gat-Yablonski G. Brain development is a multi-level regulated process--the case of the OTX2 gene. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2011; 9: 422-30. [[PubMed](#)]
11. Gersting J, Schaub CE, Keller-Wood M, Wood CE. Inhibition of brain prostaglandin endoperoxide synthase-2 prevents the preparturient increase in fetal adrenocorticotropin secretion in the sheep fetus. *Endocrinology.* 2008; 149: 4128-36. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
12. Echeverría JC, Álvarez-Ramírez J, Peña MA, Rodríguez E, Gaitán MJ, González-Camarena R. Fractal and nonlinear changes in the long-term baseline fluctuations of fetal heart rate. *Med Eng Phys.* 2012; 34: 466-71. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
13. Schwab M, Coksaygan T, Samtani MN, Jusko WJ, Nathanielsz PW. Kinetics of betamethasone and

- fetal cardiovascular adverse effects in pregnant sheep after different doses. *Obstet Gynecol.* 2006; 108: 617-25. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
14. Lowery CL, Hardman MP, Manning N, Hall RW, Anand KJ, Clancy B. Neurodevelopmental changes of fetal pain. *Semin Perinatol.* 2007; 31: 275-82. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
15. Sloboda DM, Newnham JP, Challis JR. Effects of repeated maternal betamethasone administration on growth and hypothalamic-pituitary-adrenal function of the ovine fetus at term. *J Endocrinol.* 2000; 165: 79-91. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
16. Fletcher AJ, Ma XH, Wu WX, Nathanielsz PW, McGarrigle HH, Fowden AL, Giussani DA. Antenatal glucocorticoids reset the level of baseline and hypoxemia-induced pituitary-adrenal activity in the sheep fetus during late gestation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004; 286: E311-9. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
17. Rotmensch S, Liberati M, Celentano C, Efrat Z, Bar-Hava I, Kovo M, Golan A, Moravski G, Ben-Rafael Z. The effect of betamethasone on fetal biophysical activities and Doppler velocimetry of umbilical and middle cerebral arteries. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1999; 78: 768-73. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
18. Neri I, Monari F, Valensise H, Vasapollo B, Facchinetti F, Volpe A. Computerized evaluation of fetal heart rate during tocolytic treatment: comparison between atosiban and ritodrine. *Am J Perinatol.* 2009; 26: 259-63. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
19. Miller DA, Miller LA. Electronic fetal heart rate monitoring: applying principles of patient safety. *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 206: 278-83. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

**Como citar éste artículo:** Ruiz-Lopez Y, Jiménez-Castillejo K, Reyna-Villasmil E, Torres-Cepeda D, Santos-Bolivar J, Aragón-Charris J, Mejia-Montilla J, Reyna-Villasmil N, Frecuencia cardíaca y movimientos fetales posterior a la administración de betametasona para maduración pulmonar fetal. *Avan Biomed* 2013; 2: 60-7.

## Acoplamiento molecular y actividad antibacteriana de las tioureas (R,R)-N,N'-bis(1-ciclohexiletil)tiourea y (R,R)-N,N'-bis(1-feniletil)tiourea (Molecular docking and antibacterial activity thioureas (R,R)-N,N'-bis(1-cyclohexylethyl)thiourea and (R,R)-N,N'-bis(1-phenylethyl)thiourea)

Fabían Martínez-Flores<sup>1</sup>, José Jaime Vázquez-Bravo<sup>2</sup>, Juan Saulo González-González<sup>1</sup>, Julio Hernández-Rosas<sup>1</sup>, Veronica Castro-Bear<sup>3</sup>, Oscar Zuñiga-Lemus<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup>Universidad de la Cañada. Carretera Teotitlán-San Antonio Nanahuatipan Paraje Titacuaitla, Km. 1.7 s/n; Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, 68540, México.

<sup>2</sup>Instituto Tecnológico Superior de Atlixco, Prolongación Heliotropo No. 1201, Col. Vista Hermosa C.P. 74218, Atlixco, Puebla, México.

<sup>3</sup>Benemerita Universidad Autónoma de Puebla. Carretera Libramiento Tecnológico San Marcos Necoxtla Km. 7.5, Lázaro Cárdenas Sur, 75859 Tehuacán, Puebla

[ARTICULO ORIGINAL]

Recibido: 27 de Febrero de 2013. Aceptado: 27 de Mayo de 2013.

### Resumen

Las tioureas, son compuestos resultantes de sustituir el átomo de oxígeno de la urea (NH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>) por un átomo de azufre (NH<sub>2</sub>CSNH<sub>2</sub>). Actualmente se ha visto que las tioureas presentan diversas actividades biológicas, dentro de las que se encuentra la antimicrobiana. En el presente estudio se evaluó la actividad antibacteriana mediante acoplamiento molecular entre la enzima DNA girasa (receptor) y las tioureas (R, R)-N,N'-bis(1-ciclohexiletil)tiourea (CYTU1) y (R,R)-N,N'-bis(1-feniletil)tiourea (CYTU2) como ligando en busca del posible mecanismo de acción de estos compuestos, los resultados muestran que existe interacción entre la enzima y ambas tioureas en el sitio activo. Por otro lado, también se evaluó la actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens*, mediante el método de microdilución en caldo con la adición de bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), como parte del ensayo de viabilidad, mostrando una disminución de la misma sólo contra las bacterias gram negativas, siendo la tiourea CYTU2 la que mostró mejor actividad antibacteriana.

### Palabras clave

Tioureas N,N'-Disustituidas quirales, Acoplamiento Molecular, DNA girasa, actividad antibacteriana.

### Abstract

Thioureas are resultant compounds of substitute the oxygen atom from urea (NH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>) for a sulfur atom (NH<sub>2</sub>CSNH<sub>2</sub>). There are evidential that show the biological activity of thioureas, within which are antibacterial activity. We studied the antibacterial activity of two thioureas (R,R)-N,N'-bis(1-cyclohexylethyl)thiourea (CYTU1) y (R,R)-N,N'-bis(1-phenylethyl)thiourea (CYTU2) in silico using Molecular Docking between the DNA gyrase enzyme (receptor) and the two thioureas (ligand). The results showed interaction between DNA girase and both thioureas on the pocket of the enzyme. By other hand, the biological activity was evaluated against the following bacterial strains: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*, using the microdilution method broth with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) as part of the viability assay, the results show decrease in viability only in gram-negative strains, being the thiourea CYTU2 the that exhibited a better antibacterial activity.

### Keywords

N,N'-Disubstituted thioureas, Molecular Docking, DNA gyrase, antibacterial activity.

## Introducción

Para que la duplicación del DNA se lleve a cabo en bacterias, la topoisomerasa IV y la DNA girasa juegan un papel muy importante, siendo ambas enzimas topoisomerasas tipo II, capaces de modificar la topología del DNA durante el proceso de replicación facilitando la segregación cromosómica (1). Ambas topoisomerasas son blanco de moléculas antibacterianas, como lo son las quinolonas o las cumarinas (2).

Las quinolonas son antibióticos los cuales han sido utilizados por décadas debido a que poseen un espectro amplio sobre bacterias gram positivas y gram negativas (3). Estos compuestos ejercen su efecto por la unión de manera no covalente al complejo ternario DNA-proteína previamente formado, previniendo que las cadenas de DNA separadas se vuelvan a unir durante el proceso de replicación, con lo cual generan lesiones en el material genético y la muerte de las bacterias (4, 5). Sin embargo, las quinolonas pierden su efecto por la generación de resistencia bacteriana, debido a los mecanismos que estos microorganismos han desarrollado para defenderse. Dentro de estos mecanismos se encuentran: la disminución en porinas en la membrana de gram negativas que evitan la penetración del fármaco al interior de la célula, la obtención de bombas de eflujo como lo es AcrAB/To1C en *Escherichia coli* (6, 7), la protección de DNA girasa y topoisomerasa IV por la proteína Qnr, la cual promueve el desarrollo de mutantes (8) por la adquisición de mutaciones en los genes que codifican para la girasa y topoisomerasa IV (9,10).

Debido a que la resistencia bacteriana a antibióticos se ha convertido en un problema de salud, es perentorio contar con una amplia gama de fármacos antimicrobianos, por lo cual se ha incrementado la necesidad de diseñar nuevos agentes antibacterianos con mejor actividad y menor toxicidad (11); entre estos se encuentran las tioureas, las cuales son compuestos orgánicos resultantes de sustituir el átomo de oxígeno de la urea ( $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ ) por un átomo de azufre ( $\text{NH}_2\text{CSNH}_2$ ). Las tioureas poseen diversas actividades biológicas, entre las que se pueden mencionar: anti-VIH, antiviral, antibacteriana, antifúngica, anticonvulsiva, analgésica, e inhibidores de la corrosión y antioxidantes (11-17).

El objetivo de este estudio fue determinar, mediante estudios *in silico*, la capacidad de

reconocimiento de las tioureas (ligando): (R, R)-*N,N'*-bis(1-ciclohexiletil)tiourea denominada CYTU1 y (R,R)-*N,N'*-bis(1-feniletil)tiourea denominada CYTU2 hacia la DNA girasa, ya que esta enzima juega un papel importante en la duplicación del material genético durante la división celular y evaluar la actividad antibacteriana de estos compuestos "in vitro", usando para ello el método de microdilución en caldo (18) con la adición de bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), como parte del ensayo de viabilidad.

## Materiales y metodos

### Síntesis de la (R, R)-*N,N'*-Bis(1-ciclohexiletil)tiourea (CYTU1) y (R, R)-*N,N'*-Bis-[1-(1-fenil)etil]tiourea (CYTU2).

La reacción de (R)-(+)-1-(1-naftil)etilamina o (R)-(-)-1-ciclohexiletilamina en presencia de  $\text{CS}_2$  (2:1) y etanol bajo irradiación de microondas condujo a la formación de la correspondientes tioureas (CYTU1) y (CYTU2). Los productos fueron sólidos blancos con punto de fusión de 163-165 °C y 181-183 °C respectivamente, que al recristalizarse en EtOH dieron lugar a la formación de agujas incoloras. La rotación óptica de los compuestos es  $[\alpha]_D^{25} +31.2^\circ$  (R, R) para (CYTU1) y  $[\alpha]_D^{25} -171.4^\circ$  (R, R) para (CYTU2) (c 1,  $\text{CHCl}_3$ ). Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN se efectuaron en los espectrómetros Varian Mercury-400, Varian Mercury-300, Varian Mercury-200 con software VNMR 6.1 C y un Jeol GX 400, los espectros de RMN bidimensionales de correlación homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY), heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC) y (HMBC) se efectuaron en el espectrómetro Varian Mercury-400; los desplazamientos químicos se expresan en ppm hacia campo bajo tomando como referencia al tetrametilsilano (TMS,  $\delta = 0.0$ ); las constantes de acoplamiento (J), en Hertz (Hz). Los espectros de masas mediante la técnica de impacto electrónico IE fueron registrados con un espectrómetro JEOL JMS-SX 102A operado en el modo ion positivo a 70 eV; los datos se expresaron en unidades masa/carga (m/z). Los espectros de masas FAB+ se registraron con un espectrómetro JEOL JMS AX505HA. Los espectros de IR fueron registrados en un aparato Nicolet FT-IR Magna 700 en pastillas de KBr y de polietileno. La rotación óptica fue medida en un polarímetro Perkin-Elmer 241 (19).

### Minimización de las estructuras

La estructura tridimensional de la DNA girasa a evaluar se obtuvo del Protein Data Bank con código

de identificación 2XCT (www.pdb.org). Para llevar a cabo el acoplamiento molecular, las estructuras moleculares minimizadas de las tioureas (R, R)-*N,N'*-bis(1-ciclohexiletil)tiourea (CYTU1) y (R,R)-*N,N'*-bis(1-feniletil)tiourea (CYTU2) (Figura 1) se generaron mediante minimización a 300°K por 10ps, empleando como campo de fuerza CHARMM22-PROT mediante el software VEGA ZZ ver 3.0.1, para posteriormente optimizarlas hasta un gradiente menor o igual a 0.01kcal/Å empleando un análisis conformacional en gradiente conjugado con Ammp. Las propiedades calculadas incluyen el coeficiente de partición octanol agua (LogP), el área topológica de la superficie polar (tPSA) y el Coeficiente de Refractividad Molar (CMR) obtenidos por medio del software Molecular Operating Environment (MOE) ver 2010.10.

#### **Acoplamiento Molecular**

El acoplamiento molecular se realizó usando como molde la enzima DNA girasa obtenida del Protein Data Bank (PDB), la cual reporta como ligando el antibiótico ciprofloxacina en el sitio activo. El dominio catalítico de la enzima descargada presenta una resolución de 3.35Å, el sitio activo fue determinado mediante el Site-Finder del programa MOE ver 2010.10. Para llevar a cabo el análisis conformacional, se uso un método estocástico, basados en el protocolo de acoplamiento rígido-rígido, seguido de un rígido-flexible y flexible-flexible. Finalmente, el complejo enzima-ligando fue visualizado con MOE. Usando este

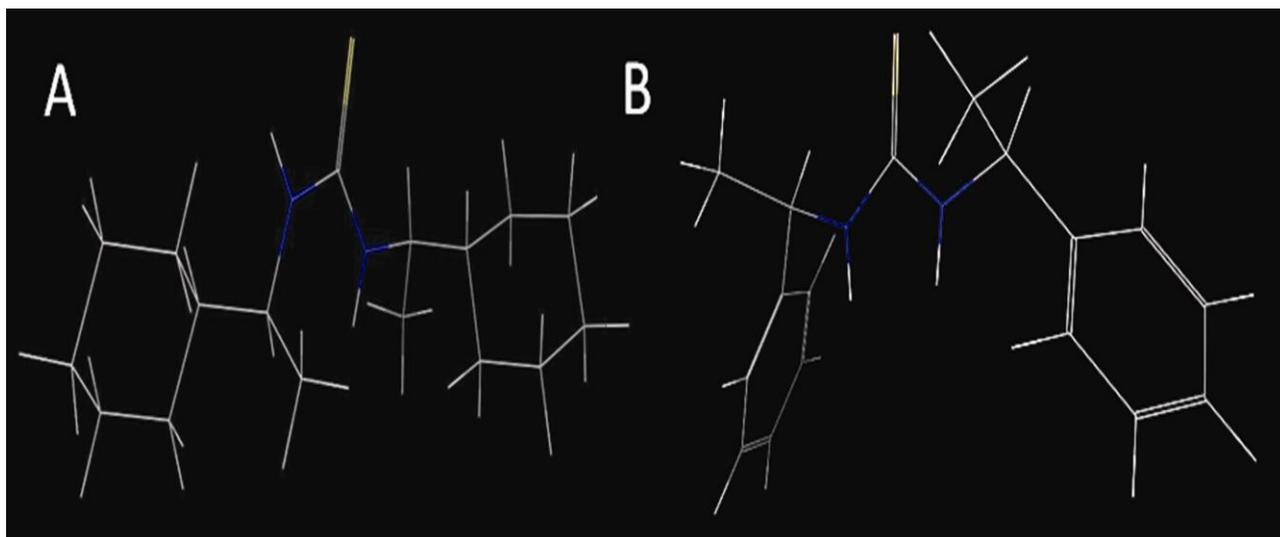
mismo protocolo, se obtuvieron los datos con la Ciprofloxacina, el cual no fue necesario minimizar ya que la estructura obtenida del PDB lo ubica en el sitio activo de la enzima.

#### **Crecimiento bacteriano.**

Para este estudio se trabajó con cepas *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* y *Escherichia coli* las cuales fueron aisladas de muestras clínicas e identificadas en el laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Estudios Superiores (FES) Cuautitlán perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Las bacterias se crecieron en agar Müller-Hinton por 24 horas a 37°C. Una vez en fase exponencial se inoculó un matraz con 20 mL de caldo Müller-Hinton tomando cinco colonias aisladas de la misma forma morfológica por cada 5mL de caldo, se incubó a 37°C hasta alcanzar la turbidez de 0.5 del Nefelometro de McFarland monitoreado espectrofotométricamente a 650 nm (20).

#### **Actividad antimicrobiana**

Las bacterias en fase exponencial y ajustadas a 0.5 del Nefelometro de McFarland, se colocaron en tubos ependorff estériles de 1mL en donde se expusieron por 24 y 48 horas a una concentración de 10 y 100µM de las tioureas disueltas en dimetil sulfóxido (DMSO), como control positivo se utilizó ciprofloxacina en las mismas concentraciones y



**Figura 1.** Estructura moleculares minimizadas de las tioureas. La figura A corresponde a la estructura minimizada de (R, R)-*N,N'*-bis(1-ciclohexiletil)tiourea (CYTU1), la figura B corresponde a la estructura minimizada de (R,R)-*N,N'*-bis(1-feniletil)tiourea (CYTU2).

**Tabla 1.** Parámetros fisicoquímicos: Coeficiente de partición Octanol-Agua (LogP), área topológica de superficie polar (tPSA) y Coeficiente de Refractividad Molar (CMR). Afinidad (pki), energía y eficiencia de las tioureas y la ciprofloxacina en los experimentos de acoplamiento con la DNA girasa

Compuestos	Parámetros fisicoquímicos					
	LogP	tPSA	CMR	Energía (Kcal/mol)	pKi	Eficiencia
CYTU1	4.388	56.15	9.8003	-9.758 + 2.47	6.229 + 0.49	0.311 + 0.02
CYTU2	4.164	56.15	9.6119	-11.846 + 2.15	6.714 + 0.27	0.335 + 0.01
Ciprofloxacina	1.101	72.88	8.7159	-13.853 + 1.34	11.323 + 0.88	0.472 + 0.04

Parámetros fisicoquímicos de los complejos con DNA girasa y los derivados de tioureas (R, R)-N,N'-bis(1-ciclohexiletíl)tiourea (CYTU1) y (R,R)-N,N'-bis(1-feniletíl)tiourea (CYTU2), calculadas con MOE

tiempos de exposición. Como control negativo se usaron las bacterias sin tratamiento. La actividad antimicrobiana (concentración inhibitoria mínima, CIM) se determinó por el método de microdilución en caldo de acuerdo al protocolo M7 descrito por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (18), el cual fue modificado al usar bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), como parte del ensayo de viabilidad (21). El MTT es usado en estudios de proliferación celular ya que es posible cuantificar la actividad de la deshidrogenasa presente en las células vivas, esta enzima reduce el Tetrazolio (MTT) a formazan, el cual es insoluble en agua y posee una coloración púrpura, permitiendo correlacionar la viabilidad en los cultivos. El MTT fue adicionado a todos los cultivos 30min antes de sacarlos de incubación. Los cristales azules de formazan generados en el interior de las células se solubilizaron con isopropanol ácido permitiendo la cuantificación espectrofotométricamente a una longitud de onda de 570nm (22, 23) previa separación del paquete celular mediante centrifugación.

#### Análisis Estadístico

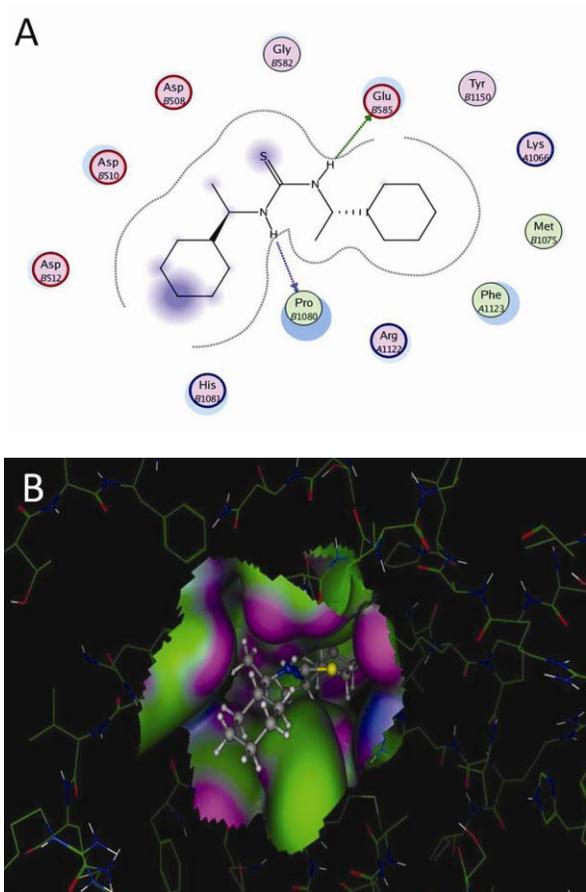
Se realizaron 3 réplicas por separado para cada uno de los ensayos antimicrobianos. Los valores del porcentaje de viabilidad bacteriana están reportados como el promedio  $\pm$  desviación estándar (SD) de los cultivos por triplicado obtenidos en ensayos distintos. Los datos se analizaron por ANOVA seguidos por una prueba de Dunn. Estas pruebas estadísticas fueron realizadas usando el software Stata 8.0 (Stata Corp., College Station, TX). Las diferencias en los tratamientos fueron consideradas como significativas cuando la  $P < 0.05$ .

### Resultados

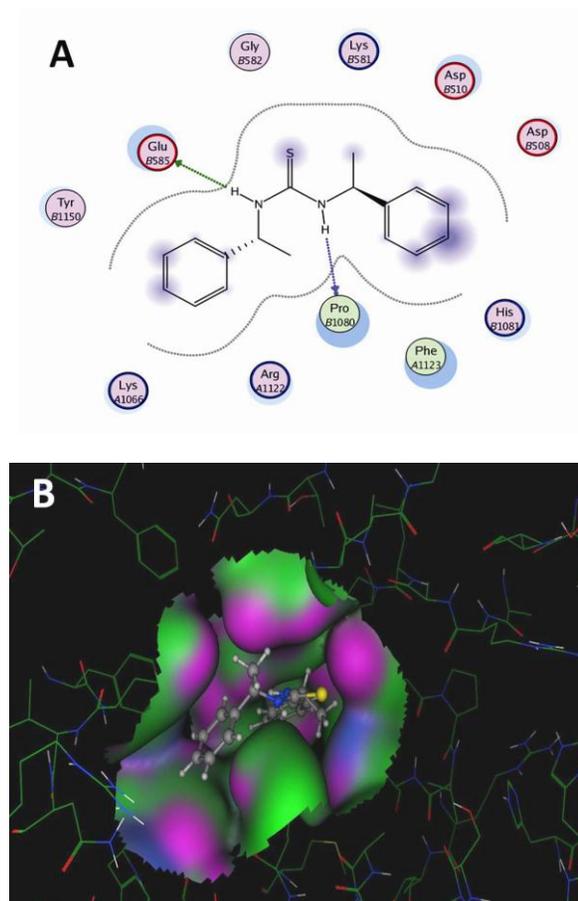
La Tabla 1 muestra las propiedades moleculares de las tioureas estudiadas. Se obtuvieron valores de LogP de 4.388 para CYTU1 y 4.164 para CYTU2, lo que indica que ambas moléculas son más solubles en octanol, siendo para CYTU1 ligeramente mayor que para CYTU2. El valor del área topológica de la superficie polar (tPSA) es de 56.15 para ambas tioureas ya que ambas estructuras presentan el mismo número de grupos funcionales polares, el valor de tPSA es de 72.88 para ciprofloxacina. El Coeficiente de Refractividad molar es de 9.8003 para CYTU1, de 9.6119 para CYTU2 y de 8.7159 para la ciprofloxacina.

Los resultados del acoplamiento molecular entre la enzima DNA girasa y las tioureas CYTU1 y CYTU2 con MOE (ver 2010.10) muestran un posible reacomodo entre las tioureas (ligando) y la enzima DNA girasa (receptor) indicando una probable interacción entre ambas estructuras. Esta interacción puede causar la inhibición del crecimiento bacteriano. Ya que uno de los mecanismo de los antibacterianos es el reconocimiento de la DNA girasa (3). Los datos muestran que los aminoácidos que presentan mayor interacción con la enzima son Glu585 y Pro1083 con los grupos amino de ambas tioureas por formación de puentes de hidrógeno (Figuras 2 y 3).

Los resultados mostraron que las tioureas presentan una afinidad de  $6.229 \pm 0.49$  para CYTU1 y de  $6.714 \pm 0.27$  para CYTU2, por lo que es posible considerarse como de buena afinidad (pKi) por esta enzima (Tabla 1), presentan una eficiencia superior a 30% en ambos casos y una energía libre de Gibbs negativa  $-9.758 \pm 2.47$  para CYTU1 y de  $-11.846 \pm 2.15$



**Figura 2.** Acoplamiento molecular. Interacciones entre los aminoácidos del sitio activo de la DNA girasa y la tiourea (R, R)-N,N'-bis(1-ciclohexiletil)tiourea (CYTU1). La figura A muestra los aminoácidos que interaccionan entre la DNA girasa y la tiourea CYTU1. La figura B corresponde al contacto Gaussiano en la superficie de la DNA girasa y la tiourea CYTU1; el verde indica el área hidrofóbica, el púrpura las áreas de formación de puentes de hidrógeno y el azul el área polar



**Figura 3.** Acoplamiento molecular. Interacciones entre los aminoácidos del sitio activo de la DNA girasa y la tiourea (R,R)-N,N'-bis(1-feniletil)tiourea (CYTU2). La figura A muestra los aminoácidos que interaccionan entre la DNA girasa y la tiourea CYTU2. La figura B corresponde al contacto Gaussiano en la superficie de la DNA girasa y la tiourea CYTU2; el verde indica el área hidrofóbica, el púrpura las áreas de formación de puentes de hidrógeno y el azul el área polar

para CYTU2, siendo en todos los casos mejor para CYTU2 que para CYTU1, por lo cual es posible que CYTU2 se una a la DNA girasa de manera similar que la ciprofloxacina ya que el estudio con este antibiótico arrojó una energía libre de Gibbs de  $-13.853 \pm 1.34$  y una afinidad de  $11.323 \pm 0.88$  (Tabla 1).

Los ensayos de actividad antibacteriana con la adición del MTT indicaron que la tiourea CYTU2 es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de manera dosis y tiempo dependiente (Tabla 2) sobre las cepas gram negativas de *Pseudomonas fluorescens* y *Escherichia coli* obteniendo porcentajes de viabilidad de  $45.03 \pm 3.37$  (\*) y  $55.97 \pm 2.65$  (\*) respectivamente

a una concentración de  $100 \mu\text{M}$  en un tiempo de 48 horas, comparado con el antibiótico ciprofloxacina el cual inhibió el crecimiento bacteriano de manera significativa únicamente sobre la cepa de *Pseudomonas fluorescens* obteniendo un porcentaje de viabilidad de  $55.91 \pm 4.05$  (\*) en la concentración de  $100\mu\text{M}$  en el tiempo de 24 horas, de  $60.23 \pm 3.05$  (\*) y de  $49.19 \pm 0.72$  (\*) en la concentración de  $10\mu\text{M}$  y  $100\mu\text{M}$  respectivamente a 48 horas. Estos datos concuerdan con los datos in silico. Demostrando de esta manera que la tiourea CYTU2 presenta mejor actividad que la tiourea CYTU1.

**Tabla 2.** Porcentaje de Viabilidad de los cultivos bacterianos expuestos a los derivados de tioureas y la ciprofloxacina

Microorganismo	Compuesto	Concentración $\mu\text{M}$	TIEMPO (Hrs)	
			24	48
<i>Staphylococcus aureus</i>	CYTU1	0	100.0 $\pm$ 4.86	100 $\pm$ 7.33
		10	110.41 $\pm$ 7.28	97.28 $\pm$ 4.6
		100	123.47 $\pm$ 4.19	93.20 $\pm$ 4.01
	CYTU2	0	100 $\pm$ 0.26	100 $\pm$ 1.97
		10	119.9 $\pm$ 7.39	115.2 $\pm$ 5.76
		100	114.3 $\pm$ 1.79	100.9 $\pm$ 1.22
<i>Escherichia coli</i>	CYTU1	0	100 $\pm$ 8.39	100 $\pm$ 5.06
		10	97.57 $\pm$ 5.31	88.06 $\pm$ 2.05
		100	100.0 $\pm$ 2.98	81.31 $\pm$ 3.23
	CYTU2	0	100 $\pm$ 7.82	100 $\pm$ 5.31
		10	95.65 $\pm$ 7.08	80.68 $\pm$ 5.01
		100	87.67 $\pm$ 1.11	55.97 $\pm$ 2.65(*)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CYTU1	0	100 $\pm$ 3.13	100 $\pm$ 4.49
		10	87.88 $\pm$ 3.85	89.57 $\pm$ 1.7
		100	73.07 $\pm$ 3.05	80.47 $\pm$ 3.89
	CYTU2	0	100 $\pm$ 7.82	100 $\pm$ 4.49
		10	79.83 $\pm$ 3.09	51.27 $\pm$ 4.05(*)
		100	78.37 $\pm$ 0.29	45.03 $\pm$ 3.37(*)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ciprofloxacina	0	100 $\pm$ 4.86	100 $\pm$ 0.4
		10	100 .01 $\pm$ 5.9	98.89 $\pm$ 1.26
		100	97.03 $\pm$ 1.45	87.81 $\pm$ 2.76
<i>Escherichia coli</i>	Ciprofloxacina	0	100 $\pm$ 2.09	100 $\pm$ 1.93
		10	89.1 $\pm$ 4.79	88.02 $\pm$ 63
		100	88 $\pm$ 3.09	82.56 $\pm$ 4.56
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ciprofloxacina	0	100 $\pm$ 3.13	100 $\pm$ 4.49
		10	75.4 $\pm$ 7.54	60.23 $\pm$ 3.05 (*)
		100	55.91 $\pm$ 4.05 (*)	49.19 $\pm$ 0.72 (*)

Los resultados denotan porcentaje de viabilidad bacteriana en experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos denotan diferencia significativa con respecto al control usando la prueba de Dunn ( $P < 0.05$ ). (R, R)-*N,N'*-bis(1-ciclohexiletíl)tiourea (CYTU1) y (R,R)-*N,N'*-bis(1-feniletíl)tiourea (CYTU2).

### Discusión

Todos los organismos poseen fuentes para preservar su información e integridad estructural del genoma. Muchas funciones celulares involucran el DNA, incluyendo replicación, transcripción y recombinación (24). En bacterias gram negativas como gram positivas, la resistencia bacteriana está asociada con mutaciones en la topoisomerasa IV, DNA girasa,

puede estar mediada por la salida del fármaco por bombas (25, 26) o en asociación con más de dos mecanismos (27, 28). En este sentido, las tioureas las cuales se presentan como moléculas con posible actividad antibacteriana se estudiaron para conocer si poseen esta actividad biológica, los resultados *in silico* entre la DNA girasa (enzima) y las tioureas (ligando) mostraron una interacción favorable, además de mostrar una inhibición significativa del crecimiento bacteriano al evaluarse la tiourea denominada CYTU2

en la concentración de 100µM a 48 horas mediante el protocolo modificado M7 del NCCLS sobre las cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Escherichia coli*.

Los parámetros fisicoquímicos obtenidos indican que ambas tioureas poseen una baja solubilidad en agua sin embargo tienen la capacidad de pasar a través de membranas celulares, por lo cual pueden ser catalogadas dentro del grupo II de la clasificación biofarmacéuticas (BSC) como moléculas de baja solubilidad y con alta permeabilidad (29). El valor de tPSA para la ciprofloxacina es mayor que para las tioureas por la presencia de una mayor cantidad de grupos polares, de igual forma el valor de CRM para el antibiótico es mayor que el de las tioureas debido a la presencia de los anillos en los extremos lo que aumenta la densidad electrónica de las moléculas.

La ciprofloxacina la cual es un antibiótico de amplio espectro, reconoce las enzimas encargadas de la remodelación del genoma (topoisomerasa IV y la DNA girasa) (1), en este estudio presentó un efecto antibacteriano sólo sobre la cepa de *Pseudomonas fluorescens*, no así sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Mientras que la tiourea CYTU2 mostró un efecto antibacteriano sobre las cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Escherichia coli*

presentando un espectro antibacteriano más amplio que el antibiótico.

Los datos del acoplamiento molecular sugieren una interacción entre la enzima DNA girasa (receptor) y las tioureas CYTU1 y CUTU2 (ligando) en el sitio activo de la enzima. Inicialmente se reconstruyó el sitio activo de la enzima usando el programa MOE y modeló la conformación más estable de las tioureas, mediante el programa VEGA ZZ y MOE. Dicho acoplamiento mostró que la tiourea CYTU2 posee una afinidad por la DNA girasa similar a la ciprofloxacina, lo que ayudaría a explicar el efecto de inhibición observado mediante el ensayo de MTT al ser expuestos los cultivos bacterianos de *Pseudomonas fluorescens* y *Escherichia coli* a esta tiourea.

Con la información obtenida en este estudio se puede concluir que la tiourea compuesto (R,R)-N,N'-bis(1-feniletil)tiourea (CYTU2) presenta actividad antibacteriana similar a la ciprofloxacina, permitiendo considerar a esta tiourea como candidato a seguir estudiando en la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antibacteriana.

## Referencias

1. Zechiedrich EI, Cozzarelli Nr. Replications of topoisomerases IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 1995; 9:2859-69. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
2. Sifaoui F, Lamour V, Varon E, Moras D, Gutmann L. ATP-Bound conformation of Topoisomerase IV: a Possible Target for Quinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 2003; 185: 6137-46. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
3. Naber KG, Adam D. Classification of fluoroquinolones. *Int J Antimicrob Agents* 1998; 10: 255-7. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
4. Goss WA, Deitz WH, Cook TM. Mechanism of action of nalidixic acid an *Escherichia coli* -II - Inhibition of deosyribonucleic acid synthesis. *J Bacteriol.* 1965; 89:1068-74. [[PubMed](#)]
5. Pohlhaus JR, Kreuzer KN. Norfloxacin-induced DNA gyrase cleavage complexes block *Escherichia coli* replication forks, causing double-stranded breaks in vivo. *Mol. Microbiol.* 2005; 56: 1416-29. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
6. Barbosa TM, Levy SB. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resist Updat.* 2000; 3: 303-11. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
7. Grkovic S, Brown MH, Skurray RA. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002; 66(4):671-701. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
8. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.* 2006; 12: 83-8. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
9. Yohida H, Kojima T, Yamagishi J, Nakamura S. Quinolone-resistant mutations of the gyrA gene of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* 1988; 211: 1-7. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
10. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrA gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990; 34: 1271-2. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
11. Limban C, Marutescu L, Chifiriuc MC. Synthesis, Spectroscopic properties and Antipathogenic Activity of New Thiourea derivatives. *Molecules.* 2011; 16: 7593-607. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
12. Abdullah BH, Salh YM. Synthesis, characterization and biological activity of N-phenyl-N-(2-phenyl)thiourea (PPTH) and its metal complexes of Mn(II), Co(II),

- Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II), Pd(II), Pt(II) and Hg(II). *Oriental J Chem* 2010; 26: 763-73. [\[Google scholar\]](#)
13. Çelen AÖ, Kaymakçioğlu B, Gümrü S, Toklu HZ, Arıcıoğlu F. Synthesis and anticonvulsant activity of substituted thiourea derivatives. *Marmara Pharm J* 2011; 15: 43-7. [\[Google scholar\]](#)
  14. Desai AD, Mahajan DH, Chikhalia K. Synthesis of novel aliphatic thiourea derivatives containing s-triazine moiety as potential antimicrobial agents. *Ind J Chem.* 2007; 46B: 1169-73. [\[Google scholar\]](#)
  15. Kilcigil GA, Altanlar N. Synthesis and antifungal properties of some benzimidazole derivatives. *Turk J Chem.* 2006; 30: 223-8. [\[Google scholar\]](#)
  16. Patel RB, Chikhalia KH, Pannecouque C, de Clercq E. Synthesis of novel PETT analogues: 3,4-dimethoxy phenyl ethyl 1,3,5-triazinyl thiourea derivatives and their antibacterial and anti-HIV studies *Braz Chem Soc.* 2007; 18: 312-21. [\[Google scholar\]](#)
  17. Struga M, Kossakowski J, Kedzierska E, Fidecka S, Stefanska J. Synthesis and pharmacological activity of urea and thiourea derivatives of 4-azatricyclo[5.2.2.0(2,6)]undec-8-ene-3,5-dione. *Chem Pharm Bull.* 2007; 55: 796-9. [\[Google scholar\]](#)
  18. Vázquez J, Bernès S, Reyes Y, Moya M, Sharma P, Alvarez C, Gutiérrez R. Solvent-free synthesis of chiral N,N'-disubstituted thioureas by "just mixing" the reagents. *Synthesis* 2004; 12: 1955-8. [\[Google scholar\]](#)
  19. Cavaleri JS, Rankin DI, Harbeck JK, Sautter LR, McCarter SY, Sharp SE, Ortez HJ, Spiegel AC. *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing.* American Society for Microbiology, Seattle, Washington, 2005.
  20. McFarland J. The nephelometer: An Instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *JAMA.* 1907; 14: 1176-78. [\[Google scholar\]](#)
  21. Ramírez-A LS, Marin Castaño D. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de Compuestos de origen vegetal. *Scientia et Tech.* 2009; 42: 263-8. [\[Google scholar\]](#)
  22. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55-63. [\[PubMed\]](#) [\[Google scholar\]](#)
  23. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods.* 1986; 89: 271-7. [\[PubMed\]](#) [\[Google scholar\]](#)
  24. Corbett KD, Schoeffler AJ, Thomsen ND, Berger JM. The structural basis for substrate specificity in DNA topoisomerase IV. *J Mol Biol.* 2005; 351, 545-61. [\[PubMed\]](#) [\[Google scholar\]](#)
  25. Baranova NN, Neyfakh AA. Apparent involvement of a multidrug transporter in the fluoroquinolone resistance of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41: 1396-8. [\[PubMed\]](#) [\[Google scholar\]](#)
  26. Brenwald NP, Gill MJ, Wise R. Prevalence of a putative efflux mechanism among fluoroquinolone-resistant clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42: 2032-5. [\[PubMed\]](#) [\[Google scholar\]](#)
  27. Hooper DC. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect Dis.* 2002; 9: 530-38. [\[PubMed\]](#) [\[Google scholar\]](#)
  28. Varon E, Janoir C, Kitzis MD, Gutmann L. ParC and GyrA may be interchangeable initial targets of some fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43:302-6. [\[PubMed\]](#) [\[Google scholar\]](#)
  29. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res.* 1995; 12:413-20. [\[PubMed\]](#) [\[Google scholar\]](#)

**Como citar este artículo:** Martínez-Flores F, Vázquez-Bravo JJ, González-González JS, Hernández-Rosas J, Castro-Bear V, Zuñiga-Lemus O. Acoplamiento molecular y actividad antibacteriana de las tioureas (R,R)-N,N'-bis(1-ciclohexiletíl)tiourea y (R,R)-N,N'-bis(1-feniletíl)tiourea *Avan Biomed* 2013; 2: 68-75.

## Tipos de diseños de los estudios clínicos y epidemiológicos (Types of clinical and epidemiologic study designs)

José H Donis H<sup>1</sup> ✉

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Cardiovasculares, Universidad de los Andes, Mérida - Venezuela.

[ARTICULO DE REVISION]

Recibido: 10 de Enero de 2013. Aceptado: 17 de Mayo de 2013.

### Resumen

Muchos reportes clínicos no son leídos en forma crítica, por esta razón se presenta esta revisión sobre la investigación clínica y epidemiológica dirigida a los clínicos e investigadores afines. La investigación se puede dividir en dos categorías generales: Observacional y Experimental, basadas en que el investigador realice o no alguna intervención. Los Estudios Observacionales pueden ser Descriptivos o Analíticos. Los estudios Descriptivos, tales como los reportes de casos y series de casos, no tienen grupo de comparación y el investigador no puede establecer asociaciones; dentro de estos estudios Descriptivos también están los Estudios Transversales los cuales son parecidos a la toma de una foto en el tiempo midiendo así la exposición y desenlace en el mismo momento. A diferencia de estos están los estudios Analíticos, cuya característica principal es que tienen un grupo de comparación o grupo control. Dentro de los estudios Analíticos se encuentran los estudios de Cohorte, los cuales siguen a las personas estudiadas en forma prospectiva hacia adelante en el tiempo, desde la exposición hasta el desenlace. En contraste, los estudios de Casos y Controles trabajan en forma inversa, siguiendo al individuo hacia atrás, desde el desenlace hasta la exposición. Los estudios Experimentales pueden ser subdivididos en dos: Aleatorizados y No Aleatorizados. En este manuscrito se definen y se explican los diferentes diseños de estudios epidemiológicos y clínicos en forma extensa, para la comprensión completa de ellos. Además, se explican las medidas de asociación las cuales son las herramientas preferidas de expresar los resultados de un desenlace dicotómico.

### Palabras clave

Estudio de caso y controles, estudios de cohorte, estudios transversales, estudios no aleatorizados, estudios experimentales clínicos aleatorizados, riesgo relativo, intervalos de confianza.

### Abstract

Many clinician reports that they cannot read the medical literature critically, to address this difficulty, we provide a clinical Research for clinicians and researches alike. Epidemiologic and Clinical Research fall into two categories: Observational and experimental based on whether the investigator not assigns or assigns the exposition. Observational studies can be either descriptive or analytical. Descriptive studies such as case report and case-series reports do not have a comparison group. In this way in these kinds of studies the investigator cannot examine the association and very often they ignore it. Cross-sectional studies are like a snapshot, which measure both exposure and outcome at one time point. Analytical studies feature a comparison group (control), whereas descriptive studies do not. Within analytical studies, cohort track peoples forward in time from exposition to outcome. By contrast, case-control studies work in reverse tracking back from outcome to exposition. Experimental trials can also be subdivided into two: non-randomized and randomized In this review we define and explain the different designs of epidemiologic and clinical studies in extensive form for a better understood of them. Also explain the association measures, such as relative risk and odds ratio, which are the preferred way of expressing results of dichotomous outcome e.g, sick versus healthy.

### Keywords

Case-control study, cohort study, cross-sectional study, non-randomized trial, clinical randomized trial, relative risk, odds ratio, confidence interval

Indice	
Introducción	77
I. Descripción de los tipos de estudios: Estudio observacional y descriptivos individuales	78
IA1.- Reporte de caso	80
IA2.- Reportes de series de casos	80
IA3.- Estudios transversales o “cross sectional” (estudio de prevalencia)	80
IA4.- Estudios de vigilancia o de supervisión	81
IB.- Estudios ecológicos o poblacionales	81
II.- Estudios analíticos	82
IIA.- Estudios de cohorte	83
IIB.- Estudio de casos y controles	86
III.- Estudios experimentales	89
IIIA.- Estudios no aleatorizados o cuasiexperimentales	89
IIIB.- Estudios antes y después	89
IIIC.- Estudios experimentales aleatorizados	89
IV.- Revisión sistemática de la literatura y metanálisis	91
V.- Estudios económicos	91
VI.- Estudios de farmacoepidemiología y farmacovigilancia	92
VII.- Formas de medidas del desenlace	92
VIII.- Medidas de asociación	93
IX.- Intervalos de confianza y niveles de investigación	95
X.- Conclusiones	97
Bibliografía	98

## Introducción

Así como la anatomía dicta a la fisiología, el conocimiento de la anatomía de los estudios científicos nos permite identificar como es en realidad el diseño de una investigación científica. En ocasiones en los estudios no se reporta el tipo de investigación utilizada o no se describen los detalles de este para comprender como los autores de un estudio abordaron la investigación. En otras ocasiones, el diseño es identificado de manera incorrecta, los errores más típicos son: incluir a los llamados estudios controlados no Aleatorizados, como estudios experimentales Aleatorizados (RCT) (1), o a los estudios de cohorte no concurrentes, como estudios de casos y controles (2-4), o a los estudios casos y controles, como cualquier estudio con grupos de comparación. Es por ello que en la investigación científica se debería hacer una jerarquización o gradación de la evidencia científica clínica y epidemiológica, como ha sido recomendado por el Sistema de Evaluación US Preventive Services Task Force (5, 6), el cual es mostrado en la tabla 1.

El tipo de investigación depende de dos aspectos fundamentales: **1.-** Si el investigador realiza un análisis sin asignar una exposición o una intervención, es decir solo observando la práctica clínica usual (7-11). **2.-** Si el investigador asigna una exposición o intervención, (administración de un tratamiento). Tomando en cuenta estos dos aspectos, se puede observar en la figura 1a, un algoritmo que permite orientar sobre el tipo de estudio a desarrollar: En el primer caso, se trata de estudios observacionales, es decir solo se observa sin intervenir, estos son los estudios que predominan en la literatura médica (11). Seguidamente debe distinguirse si el estudio tiene un grupo de comparación o grupo control. Cuando no existe un grupo control o de comparación, el estudio se define como **descriptivo**, mientras que si el estudio contempla un grupo control se define como **analítico**. Si el estudio es **analítico**, el siguiente paso es saber la direccionalidad temporal del estudio, de tal manera que si el estudio determina que la exposición y el evento o desenlace, ocurren al mismo tiempo o en un punto determinado del tiempo, el estudio se denomina **transversal o “cross-sectional”** (10, 12).

**Tabla 1.** Nivel jerárquico y gradación de la evidencia clínica (5, 13).

Calidad de la evidencia	Fortaleza de la recomendación
I) Evidencia por lo menos un estudio con diseño de Ensayo Clínico Controlado Aleatorizado (RCT)	A.- Buena evidencia que permite sustentar la intervención
II-1) Evidencia obtenida de un estudio de Ensayo bien Controlado no Aleatorizado	B.- Evidencias Regulares que soporten la intervención
II-2) Evidencias obtenidas de un buen estudio diseñado de Cohorte o Caso Control Multicéntrico	C.- Evidencias que sean insuficientes para recomendar o ir en contra de la intervención, pero ésta recomendación podrían ser hechas en otros terrenos lo cuales estén más claros
II-3) Evidencia de Múltiples Series en el Tiempo con o sin Intervención, así como Experimentos no Controlados	D.- Evidencias regulares en contra de la intervención
III) Opinión autorizada y respetadas basadas en experiencias clínicas, estudios Descriptivos o Reportes de un comité de expertos en el tema a tratar	E.- Buena evidencia en contra de la intervención

En cambio, si el estudio comienza con la exposición (Ej. uso de anticonceptivos orales) y se realiza un seguimiento a las usuarias por varios años para determinar la ocurrencia de un evento (Ej. la trombosis venosa profunda), estamos en presencia de un **estudio de cohorte**. Cuando el estudio se comienzan observando el evento (ej. la trombosis venosa profunda) y se evalúa en retrospectiva la exposición (ej. consumo de anticonceptivos orales), son considerados estudios analíticos **casos y controles**. En la figura 1a se muestra el algoritmo para la clasificación de los tipos de investigación clínica y epidemiológica (13). Los **estudios experimentales** son aquellos donde se asigna una exposición, intervención o tratamiento; debe distinguirse si la exposición fue asignada por una técnica aleatoria o no aleatoria o asignación alternante (12). A continuación la explicación detallada de cada uno de ellos.

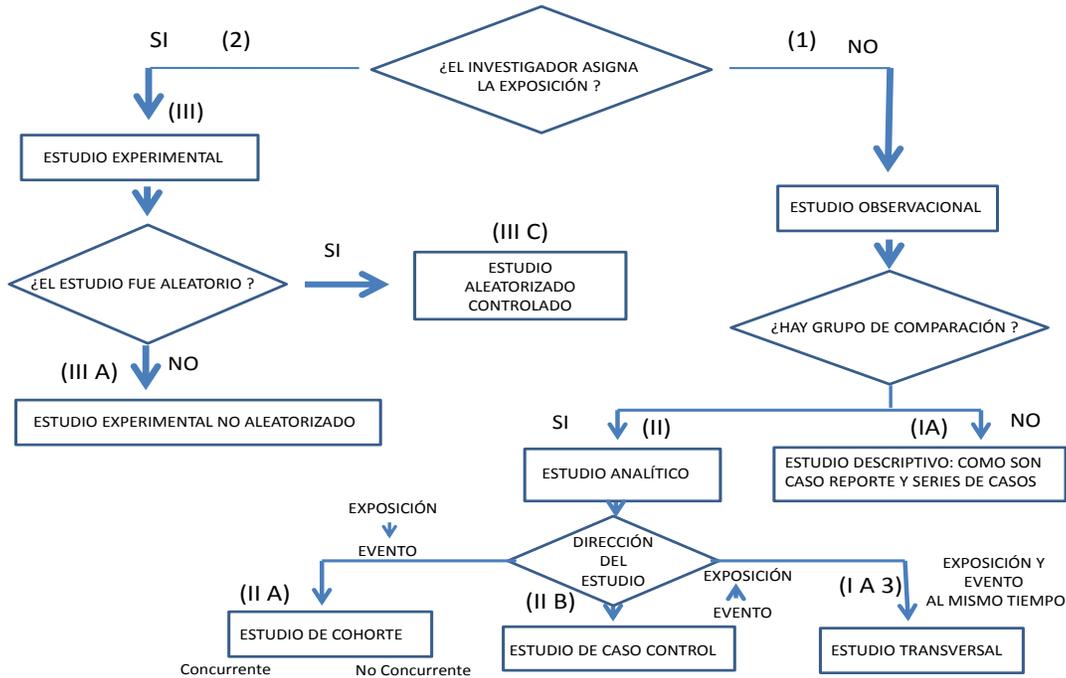
**I. Descripción de los tipos de estudios: estudio observacional y descriptivo individual**

Por definición, los estudios descriptivos no tienen grupo de comparación o grupo control y se enfocan sobre: 1) persona, lugar y tiempo (14) o 2) sobre el agente, el hospedador y el ambiente (15). En

ambos casos debe responder las 5 preguntas básicas: “Quién”, “qué”, “porqué”, “cuándo” y “dónde”, y opcionalmente: “y así Que”. En este tipo de estudios el mensaje clave es describir el estado de salud o explorar las características de una población, permitiendo así el desarrollo de nuevos estudios derivados de éstos resultados. Los elementos que componen a los estudios descriptivos se resumen en la tabla 2.

Los estudios sin grupo de comparación o **estudios descriptivos**, permiten investigar la jerarquía de la patología o enfermedad, de estos se derivan: los **reporte de casos**, en donde se describe la patología de un solo paciente de forma completa, en tiempo, lugar y espacio. **Las series de casos**, cuando se reúne un grupo de pacientes y se les describe la patología de manera conjunta a todos los individuos con la misma patología; un ejemplo de series de casos fue la descrita en el año 1981, en donde investigadores de Nueva York y California observaron en hombres homosexuales jóvenes, gozando previamente de buena salud, una inusual presencia del Sarcoma de Kaposi, infecciones oportunistas como la neumonía a *Pneumocystis carinii* y linfadenopatías inexplicables y persistentes. Posteriormente, se hizo evidente que estos hombres tenían un déficit del sistema inmune, asociado con una pérdida significativa de linfocitos T CD4+ (18).

a



b



**Figura 1.** 1a Representa un algoritmo que orienta el tipo de estudio a desarrollar. 1b Relación entre la exposición y el desenlace y la definición del tipo de estudio.

Los estudios descriptivos son el primer paso de la investigación biomédica, y permiten describir la frecuencia, historia natural y los posibles determinantes de la condición a investigar (16-18). Sus resultados muestran como muchas personas desarrollan una enfermedad o presentan un evento en el tiempo, por lo tanto permiten describir las características de una enfermedad y quiénes son los afectados. Otra característica importante de estos estudios es que a partir de ello se pueden generar hipótesis acerca de las causas de las enfermedades,

para luego ser exploradas mediante otros tipos de investigación, más rigurosos como son los estudios analíticos y los estudios experimentales aleatorizados (RCT) (19). Una precaución importante que se debe tener presente en los estudios descriptivos es que **no tienen grupos de comparación o grupo control**, por lo que no permiten determinar la asociación entre las variables que intervienen, a diferencia de los estudios analíticos y los experimentales, que si tienen grupos de comparación y permiten valorar la asociación casual (6, 12).

**Tipos de estudios descriptivos**

Los estudios descriptivos consisten en dos grandes grupos: **IA)** Individuales: aquellos que se refieren al individuo, ejemplo de estos son los reportes de casos, los reportes de serie de casos, los estudios transversales y los estudios de supervisión **IB)** Poblacionales: aquellos que se refieren a la población, como por ejemplo los estudios ecológicos (14). A continuación se detallarán cada uno de ellos:

**Tabla 2.** Elementos que caracterizan a los estudios descriptivos.

Pueden ser puntuales o bien longitudinales	Nunca pueden valorar ni probar una asociación causal
<b>Responden las clásicas preguntas:</b>	-¿Cuál es el problema o condición de salud de interés? Descripción clara y específica
	-¿Dónde se produce el problema o condición de salud? Distribución geográfica
	-¿Quién tiene el problema o condición de salud? Raza, sexo, ocupación...
	-¿Cuándo se manifiesta el problema o condición de salud? Brotes, patrones estacionales

**IA.- Estudio descriptivo individual:**

**IA1.- Reporte de caso.** En estos estudios a menudo el clínico observa y reporta un caso con una enfermedad o asociación de eventos inusual en un individuo, ejemplo de ello el reporte de un tumor poco frecuente, el adenoma hepatocelular en paciente femenina que recibe anticonceptivos orales (20).

**IA2.- Reporte de serie de casos.** Son estudios descriptivos donde se reporta una serie de casos con una condición o enfermedad. Este tipo de estudio usualmente es capaz de generar una hipótesis, pero no puede probar una hipótesis debido a que no incluye un grupo de comparación apropiado. Comprende el estudio de casos agrupados en un solo reporte, por ejemplo la aparición de varios casos de una enfermedad en un periodo corto de tiempo, que anuncia una epidemia. El ejemplo clásico son los primeros casos documentados del síndrome de

Imunodeficiencia adquirida (SIDA), evidenciado por la aparición de neumonía asociada a *Pneumocistis sp*, en un grupo de hombres homosexuales en la ciudad de los Ángeles, esa serie de casos alertó a la comunidad médica sobre la epidemia del SIDA en Norte América (18, 21). Estos estudios pueden a su vez constituir el punto de partida para estudios de casos y controles y utilizarse para evidenciar las causas de la enfermedad.

**IA3.- Estudio Transversal o “cross sectional” (estudio de prevalencia).** Es un estudio observacional que es realizado para examinar la presencia o ausencia de una enfermedad y simultáneamente se investiga la presencia o la ausencia de una exposición, en el mismo momento del tiempo. Así la exposición y el desenlace son tomados en el mismo momento de realizar el estudio, pero no está claro si la exposición precede el desenlace. Los estudios de prevalencia o transversales describen la salud de una población, un ejemplo clásico es el estudio “Health Interview Survey and Health and Nutrition” (5), que ha permitido la supervisión periódica del estado de salud de la población de los USA, y es análogo a un censo, proporcionando una fotografía inmediata de la población en un momento particular. Debido a que en este tipo de estudio la exposición y eventos son obtenidos al mismo momento, sus costos son reducidos y la pérdida del seguimiento no es un problema en estos estudios, sin embargo, es imposible saber la secuencia temporal de eventos. En estos estudios la prevalencia y no la incidencia es el principal foco de atención. En la figura 1b (6) se puede observar como en los estudios transversales la exposición y el desenlace son obtenidos en el mismo momento del tiempo, así la relación temporal entre ellos es incierta. Las ventajas y limitaciones de estos estudios se resumen en la tabla 3.

Los estudios transversales también pueden dar información sobre la relación entre dos o más variables en un mismo grupo de sujetos, sin considerar a una de ellas como dependiente de la otra, es decir, sin asumir ninguna secuencia temporal, ni relación causa-efecto entre ellas, un ejemplo es la asociación entre las cifras de colesterol y la tensión arterial en una muestra de sujetos, y otro ejemplo sería si la obesidad es más frecuente en mujeres que tienen artritis, basados en que la carga de peso extra en las articulaciones conduciría a la artritis o que la artritis hace más inactiva a las personas en forma involuntaria y estos las hace más propensas a la obesidad (5).

**Tabla 3.** Ventajas y limitaciones de los estudios de Prevalencia o de corte Transversal.

Ventajas	Limitaciones
Permiten estimar simultáneamente la frecuencia de la enfermedad y de la exposición o la probabilidad de que una persona expuesta presente la enfermedad.	Se estudian los <b>casos prevalentes</b> (pueden no ser representativos de todos los pacientes con la enfermedad al no incluirse los rápidamente letales).
Pueden estudiarse múltiples enfermedades simultáneamente.	No se puede establecer la <b>secuencia temporal</b> de las variables estudiadas.
Son más cortos y económicos que los estudios longitudinales, ya que no requieren de seguimiento.	Difícil de separar <b>factores de riesgo y de pronóstico</b> .

**IA4.- Estudio de vigilancia o de supervisión.**

Estos estudios tienen como objetivo fundamental la vigilancia a través de la observación de una comunidad, ésta puede realizarse mediante una recolección sistemática, con análisis e interpretación de los datos de salud a fin de planificar, implementar y evaluar la práctica de la salud pública. La clave esencial en este caso es la prevención y el control de los problemas de una comunidad. Un ejemplo clásico de los estudios de supervisión o de vigilancia epidemiológica, fue la erradicación y eliminación de la viruela en el mundo, con un extraordinario alcance en la salud pública, cuando la inmunización en masa de la población mundial falló en detener su transmisión; la correcta identificación de los casos con la vigilancia y supervisión y de esta manera aplicación de una correcta inmunización de las personas susceptibles en las comunidades, jugó un papel importante en el control de esta enfermedad al identificar el vector no humano (22). En un estudio de supervisión la vigilancia que se lleva a cabo, puede ser pasiva o activa. *La vigilancia pasiva*, es la obtenida a través de los certificados médicos de mortalidad, mientras que *la vigilancia activa* investiga la supervisión de los casos, como por ejemplo la realizada utilizando múltiples métodos del reporte de muertes relacionadas con los abortos durante el año 1972, y publicado por el centro de prevención y control de enfermedades de los Estados Unidos (CDC de Atlanta, USA). Una de las

estrategias utilizadas en este estudio fue la organización y formación de profesionales en esta materia a fin de identificar las posibles causas (5, 14).

La Indicación de los estudios descriptivos es recoger toda la información epidemiológica sobre las características de salud, la utilización de los recursos de salud o la satisfacción en un problema médico en particular, así como conocer la prevalencia de una condición de interés como es una enfermedad crónica para detectar la prevalencia de casos en estas enfermedades, por lo tanto se puede estimar su frecuencia y examinar la tendencia de la enfermedad en la población (23).

**IB- Estudios ecológicos o poblacionales**

Son estudios Descriptivos en los que la unidad de análisis son poblaciones o grupos de personas geográficamente bien delimitados (municipio, ciudad, región, país, etc.), en lugar de individuos. Son estudios de correlación y permiten observar la asociación entre la exposición y el desenlace en poblaciones, en lugar de observar a los individuos como tal (16). Analizan la frecuencia de la enfermedad o problema de salud desde una perspectiva colectiva-espacial muy bien definida. Sus medidas son agregadas que resumen las características individuales de todos los miembros de un colectivo. Por ej., la tasa de mortalidad por una enfermedad, el nivel medio de consumo de un nutriente o la situación nutricional de la población, el consumo medio de alcohol, etc. De esta manera muchos datos podrían recolectarse y aplicarse en los estudios de correlación y así se podría generar una hipótesis para iniciar una investigación en relación a un problema colectivo. La medida de asociación que se utiliza aquí entre la exposición y el evento es el coeficiente de correlación  $r$ , que indica cuán lineal es la relación entre las dos variables, un ejemplo de este estudio ecológico es la frecuencia de muertes por enfermedad de las arterias coronarias, correlacionada con el consumo per cápita de cigarrillos (24), o la determinación de una relación inversa entre las ciudades con mayor nivel de radiación solar y las tasas de cáncer de ovario (a mayor exposición a la radiación solar menor tasa de cáncer de ovario) y las muertes por cirrosis de hígado y bebidas alcohólicas (25, 26) Estos estudios ecológicos, sin embargo, tienen limitaciones importantes, como es la **falacia ecológica**, debido a la imposibilidad de generalizar o extrapolar la

información obtenida a nivel de grupo hacia los individuos. Es decir, las asociaciones observadas en los datos agregados o colectivos obtenidos a nivel del grupo, pueden no ser ciertas a nivel individual. Es un tipo de error el dar por supuesto que todos los miembros de un grupo muestran las mismas características a nivel individual. Este error se produce cuando existen otros factores de riesgo asociados e ignorados con la enfermedad, la cual no se distribuyen por igual entre los individuos de los grupos que se comparan dentro del estudio. Un ejemplo de ello sería cuando se observa la frecuencia de muerte por enfermedad de las arterias coronarias, la cual se correlaciona con el número de equipos de televisión per cápita (14); se sabe que los equipos de televisión no tienen ninguna relación con la formación de los coágulos en las arterias coronarias, por esto se podría argumentar que esto es una "falacia ecológica" (27, 28).

Otro ejemplo de falacia ecológica sería la data recogida de un estudio al norte de California donde exploraron la posible relación entre la exposición prenatal al virus de la Influenza durante una epidemia de esta enfermedad, que estuvo relacionada al desarrollo de leucemia linfocítica aguda en los niños (29). Los datos presentados muestran la incidencia en los niños que no habían estado expuestos a esta epidemia de influenza, con relación a los niños que estaban expuesto durante la epidemia en el útero de las madres en su primer, segundo y tercer trimestre del embarazo. Estos datos indican un alto riesgo relativo para leucemia en los niños que estaban en el útero de las madres durante esta epidemia de influenza, sobre todo en el primer trimestre. El autor concluyó que había una asociación entre los embarazos durante esta epidemia de influenza y la leucemia en los descendientes. El problema aquí es que están faltando los datos individuales sobre la exposición a esta epidemia de influenza. Uno podría preguntarle al investigador porqué no obtuvo los datos de exposición necesarios de los individuos individuales. La principal razón es que el investigador usó los certificados de nacimiento y los datos de registro de leucemia ya que ambos datos son relativamente fáciles de obtener. Así, en este estudio los datos recogidos no requieren seguimiento o contacto directo con los sujetos en forma individual. Si hay interés por esos **datos ecológicos**, se podría llevar a cabo un estudio específicamente diseñado para explorar la posible relación entre la influenza prenatal y la leucemia en forma individual, pero tal estudio probablemente es considerado más difícil de realizar y

por supuesto más costoso para obtener los datos individuales.

**Conociendo los diferentes tipos de Estudios Descriptivos, se puede resumir su utilidad en tres aspectos principales:**

**1.- Análisis de tendencia:** Permiten la vigilancia de salud en el tiempo, es decir, permite monitorizar la salud en una población para una mejor administración de los servicios. Un ejemplo es la detección de una epidemia internacional de nacimientos múltiples, prematuros y de bajo peso, debido al incremento en el uso de las técnicas de reproducción asistida (30-33).

**2.- Planificación de cuidados de salud:** Ejemplo de ello son los estudios que han permitido determinar que si se implementan de manera oportuna las terapias antiretrovirales para pacientes infectados por el VIH, se reduce el ingreso a los hospitales de los pacientes infectados (34).

**3.- Desarrollar hipótesis causal de los eventos:** Ejemplo de ello son los estudios clínicos que han permitido detectar una asociación entre las altas concentraciones de oxígeno en las incubadoras y la ceguera de los bebés. Este hallazgo ha conducido a realizar estudios analíticos y posteriormente estudios RCT, permitiendo así la confirmación de dicha asociación (35).

Los estudios descriptivos tienen fortalezas y debilidades; entre sus fortalezas se destaca que a menudo los datos son fácilmente disponibles, por lo que son estudios poco costosos y se usan en forma eficiente, además de tener pocas dificultades éticas; sin embargo, su principal limitación es que la asociación temporal entre las causas putativas y los efectos, no son claras o son inciertas, y que el investigador podría extraer inferencias causales cuando ninguna de éstas son posibles y generar repercusiones negativas en el entendimiento de un proceso o en la toma de decisiones (36).

La indicación de los estudios ecológicos es obtener información de la población respecto a una exposición o un efecto de una enfermedad o daño y su relación con factores de riesgo, por lo tanto, permiten obtener tasa de incidencia o mortalidad

## II.- Estudios Analíticos

Los estudios analíticos se clasifican en estudios de cohorte y estudios de casos y controles, que a continuación se describen:

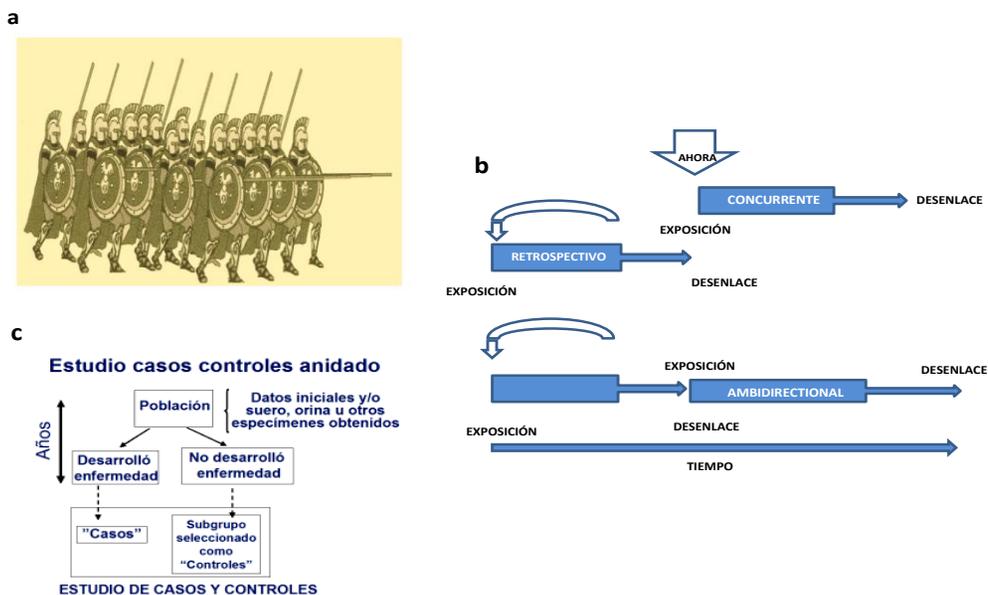
**IIA.- Cohorte**

Es un estudio observacional en el cual los sujetos con la exposición de interés (por ejemplo hipertensión) y los sujetos sin la exposición (sin hipertensión), son identificados y seguidos en el tiempo hasta que el desenlace ocurra (ejemplo accidente cerebrovascular). A diferencia de los estudios descriptivos los estudios de cohorte, proceden de la secuencia lógica de la exposición hacia el evento o desenlace, son prospectivos (figura 1b). El estudio de Cohorte es un término militar en su raíz y es similar a las cohortes de las legiones romanas que avanzaban hacia adelante (figura 2a), así, un estudio de cohorte consiste en grupos de personas que están marchando hacia adelante en el tiempo, desde una exposición a uno o más eventos (37) (figura 1b).

Si el grupo expuesto desarrolla una incidencia de eventos mayor al grupo no expuesto, se podría decir que la exposición está asociada con el aumento de riesgo de eventos en el grupo expuesto. En la figura 2b se exponen los diferentes tipos de estudios de cohorte (37), con la finalidad de comprender mejor, ya que tienen muchos sinónimos que tienden a crear confusión como son: estudios de incidencia, longitudinal, concurrentes, de seguimiento y prospectivos, pero la idea de los estudios de *cohorte* es que son estudios dirigidos hacia adelante.

**a.- Mecanismos de recolección de la información en los estudios de cohorte.** Un aspecto

crucial en los estudios de cohorte, es la manera de recolectar la información; en estos estudios se contempla el seguimiento a dos o más grupos, desde la exposición al desenlace, si el grupo expuesto tiene más alta o más baja la frecuencia de un desenlace que el grupo no expuesto, se evidenciaría la asociación entre la exposición y el desenlace, así la característica principal de estos estudios es el seguimiento de las personas hacia adelante en el tiempo, desde la exposición al desenlace. La investigación para esta clase de estudio debe, por lo tanto, ir hacia adelante en el tiempo, desde el presente hacia el futuro, o desde un tiempo atrás, donde se escoge la cohorte, hacia el presente (figura 2b). Así, el estudio de cohorte se mueve en la misma dirección, aunque la obtención de los datos no siempre sea así. Por ejemplo, un investigador que quiere estudiar si la causa de una epidemia de nacimientos múltiples es debido al uso de técnicas de reproducción asistida mediante un estudio de cohorte, el investigador selecciona a dos grupos de mujeres: un grupo de mujeres sometidas a esa técnica y otro grupo de mujeres no sometidas al procedimiento, ambos grupos son seguidos en el tiempo (hacia adelante) y así se determina la frecuencia de nacimientos múltiples, este tipo de estudio de cohorte es denominado: **estudio de cohorte concurrente** (figura 2b). Alternativamente, para resolver esta misma interrogante pudiera plantearse el estudio de otra manera: el investigador pudiera buscar en las historias clínicas anteriores de varios años aquellas mujeres que recibieron reproducción asistida y aquellas que no la recibieron con esa información, se



**Figura 2.** Descripción de los estudios de cohorte. 2a. Cohortes de las legiones romanas que avanzaban hacia adelante. 2b Estudios de cohorte. 2c. Estudios de casos controles anidado

sigue en el tiempo hacia adelante para determinar el desenlace o no de embarazos múltiples y así poder identificar a aquellas mujeres expuestas y no expuestas a la técnica de reproducción asistida, y de esta manera el estudio se mueve de la exposición al evento a través de los datos de registro que ocurrieron antes del desenlace, este tipo de estudio es denominado de cohorte retrospectivo (figura 2b). Otra variante de los estudios de cohorte son estudios de cohorte ambidireccionales, como lo indica su nombre, la recolección de los datos se obtiene en ambas direcciones; este estudio puede ser útil para exposiciones que tienen desenlaces en corto o largo tiempo. Si se utiliza el mismo ejemplo anterior sobre el uso de las técnicas de reproducción asistida y su asociación con los nacimientos múltiples y se desea investigar otra variable, como es la relación con cáncer de ovario, que sería un efecto a largo plazo (38), el investigador podría mirar hacia atrás a través de las historias para conocer sobre los nacimientos múltiples y además pudiera seguir a este grupo hacia adelante para determinar si estas mujeres desarrollarán o no cáncer de ovario (figura 2b).

**b.- Ventajas y desventajas de los estudios de cohorte.** Los estudios de cohorte tienen muchas características fascinantes:

1.- A través de ellos se puede determinar tanto la incidencia como la historia natural de una enfermedad (39), mediante la evaluación de la secuencia temporal entre la causa y el desenlace, ya que el expuesto y el no expuesto están libres del evento al comienzo del estudio, particularidad que no tienen los estudios de casos y controles o los estudios transversales.

2.- Los estudios de *cohorte* son bastante útiles en la investigación de múltiples desenlaces que podrían producirse después de exponerse a un factor de exposición único. Ejemplo de esto es el fumar cigarrillos (exposición) y la producción de diferentes desenlaces como son ACV, enfisema, cáncer y enfermedades cardiovasculares.

3.- En los estudios de cohorte no se presenta el sesgo de recordado o "Recall", que es muy común en los estudios de casos y controles, y lo explicaremos más adelante (El sesgo se define como cualquier error sistemático en el diseño o conducción del estudio que puede resultar en una distorsión o error en estimar el efecto de la exposición sobre el riesgo de la enfermedad).

4.- Los estudios de cohorte son también útiles en los casos de exposiciones raras o infrecuentes, un ejemplo sería la exposición a radiaciones ionizantes o a productos químicos en el ambiente laboral (Ej. en un hospital), donde un gran número de individuos pertenecientes a esa institución están expuestos, a este producto, pero es bastante rara en la población general y de esta manera se pueden estudiar los individuos sin asignar una exposición tóxica, evitándose el factor ético.

5.- Los estudios de cohorte también reducen el sesgo de sobrevivencia, ya que en las enfermedades que son rápidamente letales es bastante difícil de precisar el factor causante.

6.- Estos estudios permiten el cálculo de la tasa o "rate" de incidencia, el riesgo relativo (RR) y la Razón de Peligro o Hazard Ratio (RP o HR), así como también determinar el riesgo atribuible o la diferencia de riesgo, y el número necesario de tratar (NNT).

7.- Adicionalmente, permiten la determinación del estudio de tablas de vidas y curvas de sobrevivencia, a diferencia de los estudios de *casos y controles* que no permiten determinar la tasa de incidencia, pero sí podrían determinar un riesgo denominado razón de ventaja u odds ratio (OR), que es una aproximación al riesgo relativo o RR, pero solo en los casos en que el desenlace sea bastante infrecuente (menos del 5%) (40).

A pesar de todas las bondades descritas, los estudios de cohorte tienen limitaciones importantes:

1.- Cuando se realizan los estudios de cohorte se puede cometer el sesgo de selección, un ejemplo sería investigar el efecto del ejercicio físico sobre las enfermedades cardiovasculares (CV), ya que los individuos atléticos también pueden diferenciarse de los sedentarios en otros hábitos como: consumo de cigarrillos, tipo de dieta y comportamiento antes las enfermedades, por lo cual hay un sesgo en la selección de los individuos atléticos en comparación a los individuos que no realizan ejercicio físico en cuanto a estas otras variables, las cuales deben ser tomadas en cuenta (40). Ambos grupos deberían ser iguales en todos los aspectos excepto por el factor de exposición de interés (en este caso el ejercicio físico).

2.- El diseño que se usa en los estudios de cohorte no es óptimo para enfermedades de muy baja frecuencia, por ejemplo ciertos cánceres o las de enfermedades del colágeno, ya que ambas enfermedades toman mucho tiempo en desarrollarse. Sin embargo, varios estudios de cohorte han tenido una importante contribución en el conocimiento de enfermedades infrecuentes en los estudios

prospectivos de Framingham Heart Study (41), nurse Health Study (14) y British Physician Study (36).

3.- Otra importante limitación es la consecuencia de pérdida de seguimiento. Los estudios longitudinales necesitan seguirse por largos periodos de tiempo, a veces décadas para que finalicen o se desarrolle el evento y tienen una probabilidad muy importante de pérdida de seguimiento, y, si esta pérdida se hace de manera diferente entre los expuestos y los no expuestos, puede haber un sesgo en su resultado final.

4.- También se evidencia que en la medida que transcurre el tiempo, el estado de exposición de los que participan en el estudio puede cambiar. Un ejemplo sería que una gran proporción de aquellas mujeres que utilizan anticonceptivos orales pueden cambiar a usar aparatos intrauterinos en el tiempo y así cambiar el resultado final de estos estudios o viceversa (42) resultando de esta manera en un sesgo.

**c.- Consideraciones con los estudios de cohorte:** Cuando se piensa en desarrollar este tipo de estudios, es importante que el investigador considere los siguientes aspectos: 1.- *¿Cuál es la población que tiene riesgo de desarrollar la enfermedad?*. Todos los participantes (expuestos y no expuesto) pueden estar en riesgo de desarrollar la enfermedad o el desenlace (39), por ejemplo, en el caso de evaluar el riesgo a desarrollar enfermedad inflamatoria pélvica, debiendo excluirse del estudio todas las mujeres con esterilización tubarica, ya que este grupo no está en riesgo de desarrollar salpingitis (43). 2.- *Definir adecuadamente la exposición.* Para ello se requiere definir desde el inicio del estudio y sin ambigüedades cuál es la exposición y como se cuantificará el desenlace, además establecer una escala que permita su gradación; ejemplo: definición de un número mínimo de cigarrillos para indicar exposición y establecer los grados en el consumo (24). 3.- *Selección de los controles adecuados y apropiados.* El grupo no expuesto debería ser similar en todos los aspectos al grupo expuesto, excepto en la falta de la exposición. El grupo no expuesto puede provenir de un origen interno, es decir de la misma área geográfica o ambiente (ej. de la misma sala del hospital) o de origen externo, es decir de diferentes áreas geográficas. En los estudios de exposición ocupacional, el hallazgo de un número adecuado de empleados en la fábrica sin la exposición a veces es difícil, por lo que se deberían escoger empleados que trabajan en otra fábrica muy similar, de la misma comunidad pero sin el factor de exposición que se está evaluando. Este es un factor

importante, ya que en ocasiones se comete el error de comparar la frecuencia de muerte por cáncer pulmonar entre trabajadores de una fábrica, con la frecuencia general en las personas de la misma edad y sexo pero proveniente de la población, esto representaría un sesgo debido a que se está comparando una población laboralmente activa con otra heterogénea (44). 4.- *El desenlace debe compararse en forma similar en ambos grupos.* El desenlace debe ser definido en forma clara, específica y de forma medible, así como también debe ser comparado de la misma manera para el expuesto y el no expuesto, para evitar el riesgo de sesgo de información o de recordado (Recall). Debería además mantenerse el anonimato en aquellos en que se determine el desenlace, de manera que se desconozca el estado de exposición de los participantes (ciegos a la exposición). La información del desenlace puede provenir de múltiples orígenes; por ejemplo en los estudios de mortalidad, a menudo es usada la muerte certificada, aunque ésta información es clínicamente válida, puede ser altamente variable. En el caso de la fuente de los desenlaces no fatales, ésta puede provenir de los records o las historias de hospitales, de compañías de seguro, registro de laboratorios, registros de enfermedades, del examen físico, etc. La clave en estos casos es que el evaluador del desenlace, desconozca cuáles son los individuos expuestos y no expuestos. 5.- *El seguimiento de los participantes en el tiempo en los estudios de cohortes es fundamental y durante su diseño, esto debe ser uno de los parámetros más críticos a considerar,* para reducir al máximo las pérdidas, ya que podría resultar en un sesgo importante, en particular cuando la pérdida ocurre en los individuos expuestos que presentan los desenlaces. Una de las mejores maneras para evitar estas pérdidas de seguimiento, sería obtener los nombres de varios miembros de la familia o amigos, que no viven con los participantes, desde el inicio del estudio, para así, poder contactarlos al momento que no podamos encontrar al sujeto en estudio, o solicitar asistencia de médicos de la familia o implementar cualquier otra estrategia que permita su fácil ubicación en caso de mudanzas o reubicaciones.

**d.- Variación de los estudios de cohorte.** Se han descrito varias variantes de los estudios de cohorte, que se describen a continuación:

**1.- Los estudios de series en el tiempo o los estudios antes y después.** En estos casos los investigadores pueden tomar medidas en los participantes expuestos y no expuestos, como por ejemplo, tomar las medidas previa de la exposición a

un factor de riesgo en ambos grupos y luego se repite la medida después de ser expuesto al factor de riesgo con la finalidad de compararlos. En estos estudios no deben modificarse las medidas que fueron asignadas desde el inicio del estudio, es decir que un valor de laboratorio asignado como alto al inicio, debe mantenerse de igual manera hasta su finalización (45). Otra particularidad de estos estudios de series son las tendencias seculares, producidas por las estaciones, las cuales podrían cambiar la frecuencia de las enfermedades como por ejemplo los cambios seculares en la aparición de neumonías o diarreas, que pudieran afectar los resultados y por último es necesario conocer los periodos de lavados, para evitar el efecto de las drogas o medicamentos con efecto residual que se podrían mantener en el periodo inicial de observación (40)

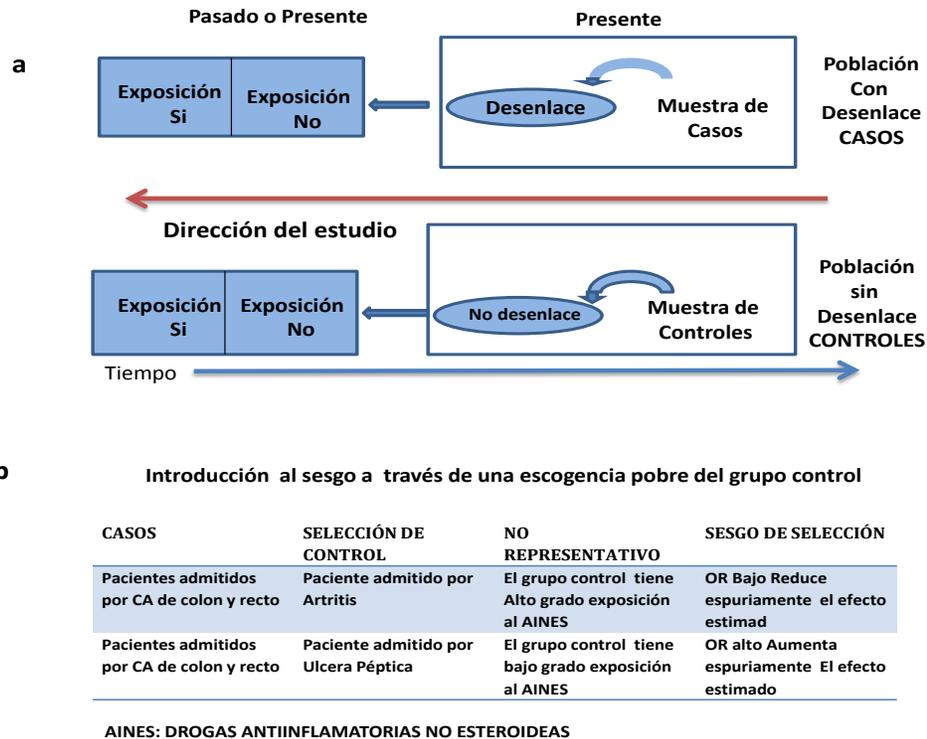
**2.- Estudios de casos y controles anidado.** Los estudios de cohorte algunas veces pueden generar otros estudios, el más frecuente es el **estudio de casos y controles anidados** (44,46). Un ejemplo de este tipo de estudio sería que desde el inicio del estudio de cohorte, se tome una muestra de sangre a todos los participantes y se almacene hasta su culminación. Una vez finalizado, los individuos que desarrollaron el desenlace o evento de interés, constituirían **los casos del estudio anidado**. Luego el investigador selecciona las muestras en forma aleatoria, de todos los participantes que no han desarrollado el desenlace de interés (conformado el grupo control anidado) y en ellos se realizan ensayos más específicos, es decir solo en los casos y controles tomados aleatoriamente y no del grupo total inicial de cohorte expuesto y no expuesto. Los controles son generalmente pareados con los casos por las características demográficas como son edad y sexo (8,47) (figura 2c).

La indicación de los estudios de cohorte es ensayar hipótesis de causalidad y de riesgo, ya que la exposición precede al desenlace, por lo tanto, se busca la causa de una enfermedad en la medicina clínica; otra indicación, es que permiten medir la incidencia de una enfermedad o condición, con la obtención de tasas de incidencia de la enfermedad o condición en estudio, permitiendo Estudiar la Historia Natural de la enfermedad desde su causa hasta el efecto que produzca (23).

## IIB.-Estudios de casos y controles

Este tipo de estudio es observacional, primero se identifica un grupo de sujetos con cierto tipo de desenlace o enfermedad y otro grupo control sin el desenlace o evento y después se evalúa en forma retrospectiva en el tiempo (por ejemplo la historia clínica) a fin de encontrar si fueron sometidos a una exposición o al factor de riesgo asociado con la enfermedad en estudio o desenlace. Son estudios que se utilizan para explorar enfermedades infrecuentes o raras (6). En este tipo de estudio la dirección es hacia atrás, es decir se comienza con el evento, desenlace o enfermedad y a partir de ahí, se mira hacia atrás, en el tiempo a fin de explorar la exposición que pudo desencadenar el evento. Como se evidencia en la figura 1b, el investigador define a un grupo con el desenlace (Ej. cáncer de ovario o infarto del miocardio) identificado como *casos*, y un grupo sin el evento o desenlace identificado como *grupo control*. A partir de este momento el investigador mediante diferentes herramientas, como por ejemplo la revisión de historias clínicas, entrevistas u otro medio, determina la prevalencia o la frecuencia de exposición al factor de riesgo, por ejemplo el uso de anticonceptivos orales o hipertensión arterial, respectivamente. Si la prevalencia de exposición es más alta entre los *casos* que entre los *controles*, la exposición está asociada con un aumento del desenlace o evento (6,48, 49) (figura 3a)

Debido a que en los estudios de *casos y controles* falta el denominador en el cálculo, es decir la población a riesgos, los investigadores no pueden determinar o calcular la "rate" o tasa de incidencia, riesgo relativo (RR), ni el riesgo atribuible (RA); en su lugar pudieran determinar la Razón de Chance o ventaja "Odds Ratio (OR)" que son medidas de asociación utilizadas en este tipo de estudios (27), derivado de la probabilidad de que ocurra un evento o enfermedad en los individuos a riesgo, contra la probabilidad de que dicho evento no ocurra o no haya ocurrido en los individuos sin el factor de riesgo. Cuando la tasa o "rate" de incidencia o RR de un desenlace particular en la población de interés, es relativamente baja (usualmente inferior al 5% en ambos grupos, expuestos y no expuestos), aquí la OR es considerada como un buen estimador del RR (48).



**Figura 3.** Estudios de casos y controles. 3a Relación entre la exposición y el desenlace. 3b Riesgo de sesgo en relación con el grupo control

Los estudios de *casos y controles* son ideales para desenlaces raros los cuales tomarían largo tiempo en desarrollarse, tales como las enfermedades cardiovasculares o el cáncer. La escogencia de los *controles* debe ser similar a los *casos* en todos sus aspectos, excepto en el desenlace, la escogencia de un grupo *control* de manera inapropiada corre el riesgo de arruinar este tipo de estudio. Adicionalmente, en estos estudios puede ocurrir el sesgo del recambio o Recall, este sesgo se define como una mejor recolección de exposición entre los *casos* que entre los *controles*, esta es una deficiencia de estos estudios y es necesaria hacer uso de la memoria de exposición. Las epidemias de las enfermedades transmitidas por los alimentos son los prototipos de los estudios de *casos y controles*; por ejemplo en un buque o crucero donde el universo completo de aquellos a riesgo de una enfermedad es conocido, porque ellos han tenido síntomas como vómitos, diarreas y náuseas, que en este caso serían los *casos*, se preguntaría acerca de una posible exposición a un alimento y también se investigaría en aquellos que no presentaron estos síntomas (*grupo control*). Si una alta proporción de individuos enfermos reportan haber comido un

alimento en particular, en mayor proporción que aquellos que están sin los síntomas, entonces este alimento se convierte en el factor sospechoso de los síntomas (50).

**a.-Ventajas y desventajas de los estudios de casos y controles.** Los estudios de *casos y controles* son efectivos y eficientes para la investigación de enfermedades que tienen un periodo de latencia bastante largo, como en el caso del cáncer o enfermedades cardiovasculares, es decir enfermedades que requerirían de muchos años de seguimiento mediante estudios de cohorte. Los estudios de cohorte pueden ser más eficientes, cuando la tasa o "rate" de exposición es bastante baja, ya que en los estudios de *casos y controles* los investigadores necesitarían examinar muchos casos y controles, para poder encontrar uno que haya sido expuesto al factor de riesgo o de exposición; por ejemplo, es realmente impráctico realizar en África estudios de *casos y controles* donde se pretenda evaluar la relación de los anticonceptivos orales, con la transmisión de VIH-1, ya que su uso en África es bastante bajo.

Como regla general se acepta que los estudios **de casos y controles** son más eficientes cuando la incidencia de desenlace, es más alta que la prevalencia de exposición. Otra de sus ventajas, es que para realizarse ameritan menos tiempo, menos esfuerzo y no son tan costosos como los de cohorte.

Se considera que la principal debilidad de los estudios de *casos y controles*, es la escogencia apropiado del grupo control. Se ha descrito que existen dos importantes factores que afectan su validez:

1.-La escogencia del grupo *control* y

2.- La forma como se obtiene la historia de exposición, lo que los hace ser más vulnerables para producir sesgo. Siendo estos aspectos factores críticos para el buen desarrollo de estos estudios, a continuación se discutirán más a fondo:

#### **b.- Selección de Casos y Controles:**

**1.- Grupo de casos** Todos los casos de una población teóricamente podrían ser incluidos en un estudio de *casos y controles*, sin embargo por razones prácticas solo una muestra es seleccionada, por lo que la selección se convierte en un factor importante. Así, como aspecto inicial, debería establecerse como se seleccionará la muestra, a través de una definición clara del desenlace que va a ser estudiado, incluyendo por ejemplo sistemas de diagnóstico clínico, resultados de laboratorio y otros métodos a utilizar. Los investigadores, además, deben detallar los criterios de elegibilidad, tales como: rango de edad, localización geográfica de los *casos* (clínica, hospital o estudios basados en una población); se deberían reunir los datos de **casos de incidencia** más que de **casos prevalentes** (51), y considerar también cambios del patrón diagnóstico que puede ocurrir en el tiempo, por ejemplo, el diagnóstico reciente es más consistente, que el obtenido en periodos iniciales.

**2.- Grupo control:** este grupo debe proporcionar el terreno basal de la exposición esperada en el grupo de **casos y controles** que se está estudiando, y debería estar libre de enfermedad o desenlace, pero a la vez, debe ser representativo de la población de riesgo, que eventualmente podría convertirse en **casos**. La selección de los controles debe ser independiente de la exposición que se está investigando. Un ejemplo hipotético sería un estudio **de casos y controles** con drogas anti-inflamatorias (AINES), para la prevención del cáncer (CA) de colon y recto. El estudio mediría el uso previo de AINES por los pacientes admitidos al hospital con (casos) y sin

(controles) CA de colon y recto; si el grupo *control* proviene de un servicio de reumatología, pudiera esto ser considerado como un sesgo, ya que los individuos con artritis usan en forma más frecuente los AINES que la población general. Tal nivel alto de antiinflamatorios en el grupo control va a afectar el cálculo de la razón de ventaja u OR, que probablemente será espuriamente baja, ya que los AINES reducen el riesgo de CA en el grupo *control*, es decir que si el investigador no selecciona el grupo *control* independiente de la exposición, va a dar como resultado un sesgo en cualquier dirección (ver figura 3b) (51). También están los estudios de casos y controles con el sesgo de selección que es introducido por la forma en la cual los participantes son escogidos en un estudio. Los investigadores pudieran reducir el sesgo de selección por minimizar el juicio en el proceso de su escogencia, por ejemplo, si el grupo de *casos* incluye todos los individuos afectados en una región geográfica específica, el grupo *control* podría escogerse en forma aleatoria de la población general de la misma área de selección de los *casos*; un estudio de *casos y controles* de este tipo sería la evaluación del uso de anticonceptivos orales y el CA de mama de todas las mujeres de edad entre los 20- 54 años diagnosticadas recientemente y que viven en 8 diferentes áreas geográfica de Estados Unidos. Un excelente grupo control (aunque no siempre factible) serían las mujeres de la misma edad seleccionados en forma aleatoria a través del discado telefónico y de las mismas áreas geográficas sin CA de mama (52).

#### **c.- Medidas de información de la exposición:**

En los estudios de *casos y controles* los participantes podrían no recordar con precisión la exposición ocurrida especialmente en aquellas que han acontecido mucho tiempo atrás, además, los *casos* a menudo recuerdan más la exposición a los factores de riesgo a diferencia de los *controles*; esta diferencia de recordar la exposición es lo que se llama *sesgo de información, de recordación o Recall* (49). Por ejemplo, en el estudio de cáncer de mama y el uso de anticonceptivos orales (52), el investigador pregunta a las participantes por la exposición previa a los anticonceptivos orales, y las mujeres con el cáncer de mama podrían recordar más que los controles, ya que conocen que esta podría ser la causa de su cáncer, y así identificarían claramente el anticonceptivo ingerido como factor de riesgo del cáncer de mama, por lo que recordarían la ingesta de esta hormona más fácilmente que el grupo *control*, a quienes se le dificultaría más el recordar si lo han ingerido. Este Sesgo de Recall o de

rellamado generado por la exagerada relación entre los anticonceptivos y el cáncer de mama no es fácil de eliminar, una forma de evitar este sesgo, es tratar de que los investigadores que recogen los datos, desconozcan si los sujetos son casos o controles (53).

#### d.- Control para las variables de confusión.

Un factor de confusión ocurre cuando el investigador concluye falsamente que una exposición particular es la causa y que está relacionada a la enfermedad, sin haber realizado ningún ajuste para otros factores que están interviniendo y que son también conocidos como factores de riesgo para esta enfermedad en particular y por tanto, asociados a la exposición. Los estudios de **casos y controles** necesitan corregir los sesgos de las variables de confusión, sesgo que puede ser tratado en la fase de diseño del estudio al restringir o *parear los casos con los controles*. Pero el investigador generalmente prefiere manejar este sesgo en la fase de análisis de los datos con técnicas analíticas, tales como regresión logística o estratificación de las variables por la técnica de Mantel-Haenszel (48, 49, 53).

Los estudios de casos y controles estudian los factores de riesgo de una enfermedad en particular, permitiendo de esta manera, estudiar los problemas de salud que requieren un abordaje relativamente rápido, como es el estudio de enfermedades con más de un agente etiológico causal. Permiten comparar un factor sospechoso o factor de riesgo de exposición en un grupo que ya tuvo el desenlace (caso) con respecto a un grupo que no lo ha presentado (control), y de esta manera poder examinar un sin número de factores de riesgo o de protectores (23).

### III.- Estudios experimentales

Los estudios experimentales pueden a su vez ser estudios no aleatorizados o cuasi- Experimentales y Estudios antes-después (o pre-post), estos se describen a continuación:

#### III. A.- Estudios no aleatorizados o cuasi-experimentales:

Son estudios de evaluación o de intervención sin asignación aleatoria. En algunos estudios experimentales a veces no se escoge la muestra en forma aleatorizada en relación a su exposición, un

ejemplo de estos estudios es la estrategia de tratamiento o de prevención, aquí en lugar de usar técnicas aleatorizadas, el investigador utiliza a menudo otros métodos tales como la asignación alternada (54). Así son los estudios de The US Preventive Service Task Force (54) y Canadian Task Force on the Periodic Health Examination (55), los cuales están catalogados como un estudio clase II -1 (ver tabla 1) con menos rigor científico que los estudios aleatorizados, pero sin embargo son estudios analíticos. La ventaja de estos estudios es que incluyen grupo de controles recurrentes y tienen la precisión en catalogar los desenlaces para ambos grupos, sin embargo no están exentos de sesgo ya que no fueron aleatorios

Los estudios cuasi-experimentales tienen varias particularidades: 1.- Son estudios de intervención en humanos donde no se puede manipular la exposición; 2.- Como en cualquier experimento hay una variable de 'exposición' y de 'respuesta' y una hipótesis a contrastar, pero no hay aleatorización de los sujetos a los grupos de intervención, ni al grupo control; 3) No se puede garantizar que los grupos comparados sean equivalentes en los otros aspectos además de la exposición e intervención, por lo que la validez interna (que se refiere a si el estudio mide lo que realmente debe medir) del estudio este comprometida.

Su indicación es el uso de vacunas en una población expuesta a un agente tóxico, así como el estudio de componentes nutricionales en personas expuestas al riesgo de déficit nutricional.

#### IIIB.- Estudios antes-después (o pre-post):

Estos estudios se caracterizan porque cada individuo se compara consigo mismo, es decir, él es su mismo control. Ejemplo de este tipo de estudios es la evaluación de la eficacia de la cirugía de cataratas en un grupo consecutivo de pacientes, que se evalúan antes y después de la intervención, y otro ejemplo es el impacto de la normativa de restricción de consumo de tabaco en lugares públicos y determinación del número de fumadores antes y después de introducir la normativa (7).

#### IIIC.- Estudios experimentales clínicos aleatorizados o patrón de oro (RCT)

Los experimentos clínicos aleatorizados (RCT) son un tipo especial de ensayo clínico en el cual la asignación a la exposición o intervención es

a

¿Como saber si un tratamiento o intervención es o no eficaz ?

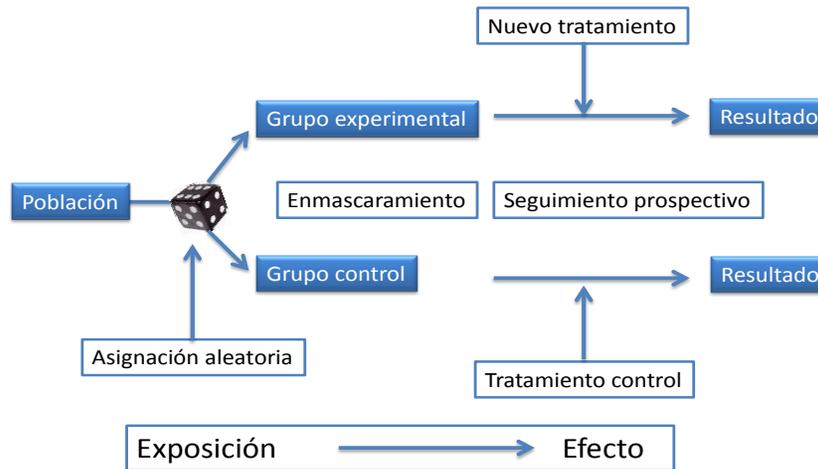
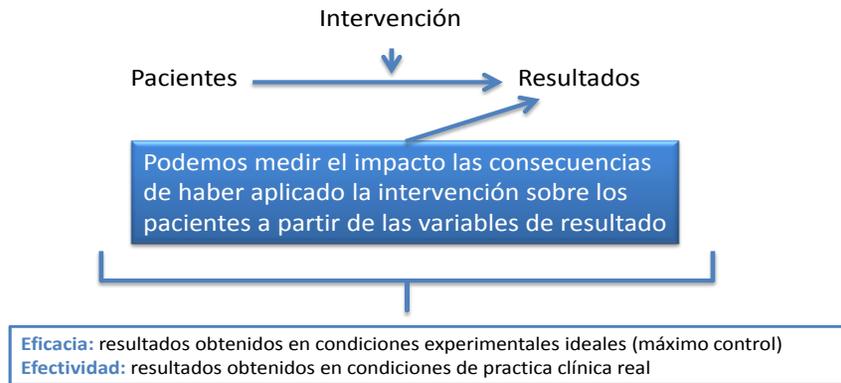


Figura 4. Estudios experimentales clínicos Aleatorizados o Patrón de oro. 4a Eficacia y efectividad de un estudio. 4b Ensayo clínico aleatorizado y controlado

determinado por aleatorización o por puro chance. A través de estos estudios se evita el sesgo de selección y de confusión. Este diseño se aproxima a un experimento controlado sobre la base científica, se asemeja a un estudio de cohorte en varios aspectos con la importante excepción de que en este caso, el investigador asigna la o las exposiciones (ej. dar un tratamiento u exposición) en forma aleatoria (ver figura 1a). Esta asignación al azar permite confiar en que la única diferencia entre los grupos de estudio, sería quienes van a recibir la intervención y quienes no la van a recibir, y por lo tanto, cualquier diferencia entre los grupos al final del estudio, es atribuida a la intervención aplicada (inferencia causal). Son diseños elegantes, pero pueden tener sesgo aunque muy bajo como cualquier otro tipo de estudio, sobre todo en la determinación del desenlace y cuando no es

apropiadamente implementado. Una de sus fortalezas es que elimina el sesgo de confusión en ambos grupos: los conocidos y los desconocidos. En conclusión, si estos estudios se aplican apropiadamente son estadísticamente eficientes, libres de sesgo y útiles para examinar los efectos (ver figuras 4a y 4b). Ejemplo de estos estudios son los grandes estudios de intervención multicentrico, aleatorizados, que se practican en diversos países usando diferentes tipos de intervención o tratamiento en comparación con un grupo sin intervención, con tratamiento placebo o que reciben un tratamiento tradicional que ha sido aplicado anteriormente, para saber si el nuevo tratamiento o intervención es más efectivo que el placebo, o el tratamiento tradicional o el grupo sin tratamiento.

Estos estudios también tienen sus limitaciones, como es la validez externa, es decir, que se puedan o no generalizar sus resultados a otras poblaciones que son diferentes a las del estudio. Si los RCT son apropiadamente realizados tienen buena validez interna, ya que miden lo que realmente se quiere medir, pero no gozan de *validez externa* que se asocia con la extensión que tiene un resultado obtenido y su generalización a otras poblaciones. Otra limitación de estos estudios de RCT es que incluyen solo voluntarios que aprueban un proceso de “screening” antes de ser incluidos en el estudio, por lo tanto, aquellos que son voluntarios en el estudio son totalmente diferentes de aquellos que no lo son. Además son Estudios muy costosos y no pueden ser usados en algunos estudios donde hay exposición a sustancias dañinas (toxina, bacterias u otras noxas), por razones éticas (53).

Los estudios experimentales aleatorizados están indicados cuando se quiere determinar si las modificaciones en una variable independiente (la cual se encuentra bajo el control del observador) como sería el medicamento que se va a estudiar o una intervención que se va a aplicar, asignada al azar, puede modificar algún desenlace (variable dependiente o variable desenlace) (23). Este estudio constituye el primer paso para la investigación de una sustancia o medicamento nuevo en el hombre. También es usada para la investigación que es efectuada en seres humanos, con el fin de determinar o confirmar los efectos clínicos, farmacológicos, y/o demás efectos farmacodinámicos, y/o de detectar las reacciones adversas de un nuevo medicamento.

En la Caja 1a se resumen la jerarquía de la evidencia científica en donde los experimentos clínicos aleatorizados y los metaanálisis ocupan la mejor evidencia científica de todos los tipos de estudios y en la caja 1b se evidencia los niveles de evidencia en la investigación clínica. Ver también figura 1a

**IV.-Revisión sistemática de la literatura y metanálisis.**

Es un análisis estadístico cuantitativo de los resultados de estudios separados, que han sido obtenidos y examinados de orígenes diferentes y han conducido a un resumen cuantitativo estadístico de sus resultados. Los metaanálisis tienen un componente cualitativo (Ej. clasificación de los estudios de acuerdo a determinadas características capaces de influenciar

los resultados tales como su diseño, calidad de los datos, así como ausencia de sesgo y estado de obtención de los datos, si fueron completos o parciales) y un componente cuantitativo (Ej. extracción y análisis de la información numérica, resumen de la efectividad de los tratamientos) (56).

Este estudio se usa como un estimador preciso de la magnitud del efecto y de la variación del mismo efecto en diferentes poblaciones estudiadas, así su indicación es cuando se quieren explorar las causas de variación (heterogeneidad) entre estos diferentes estudios, de intervención sobre la enfermedad y la salud, así como sus riesgos basales (23). También en estos estudios de metaanálisis se resume en forma válida y precisa la dirección y magnitud de los resultados de múltiples estudios primarios.

**V.-Estudios de análisis económico.**

Permiten llevar a cabo un análisis cuantitativo de los costos y de los beneficios entre diferentes alternativas existentes para el abordaje de un problema clínico, por lo que se resume en una razón



NIVEL DE EVIDENCIA A	Datos derivados de múltiples Ensayos Clínicos Aleatorizados o Metaanálisis
NIVEL DE EVIDENCIA B	Datos derivados de Simple Ensayos Clínicos Aleatorizados o Estudios no Aleatorizados
NIVEL DE EVIDENCIA C	Consenso de Opinión de Expertos y/o Pequeños Estudios, Estudios Retrospectivos o de Casos y Controles, Estudios Transversales y Series de Casos

Caja 1. La jerarquía de la evidencia científica

cuyo denominador son los desenlaces y cuyo numerador son los costos, es decir, la razón de costo-efectividad; y se puede expresar como costo por unidad de efecto en la salud o en beneficio económico neto, tanto si la consecuencia como los costos son llevados en unidades monetarias. Los análisis de costo-efectividad comparan los costos de diferentes métodos para obtener la misma efectividad, y los análisis de costo- beneficio valoran los beneficios en la salud en unidades monetarias y la comparan con los costos de la intervención (23).

Estos estudios económicos se indican cuando se quiere conocer el Costo-Beneficio, Costo-Utilidad y Costo-Efectividad de las diferentes intervenciones aplicadas a los individuos y a una población.

#### VI.- Estudios de farmacoepidemiología y farmacovigilancia.

La Farmacoepidemiología es la rama de la epidemiología que evalúa el uso y el efecto de medicamentos en un número grande de pacientes, por lo que su finalidad es la evaluación de la seguridad de los medicamentos. La Farmacovigilancia es cuando los estudios se realizan después de que la medicina ha sido lanzada al mercado. Se definen las diferentes fases que se sigue en la clínica para evaluar los medicamentos. Los experimentos clínicos aleatorizados son el pilar fundamental para la evaluación de la eficacia y efectividad de un medicamento, sin embargo no son la mejor opción para evaluar los efectos secundarios, especialmente si son poco frecuentes; en estas condiciones, los estudios observacionales analíticos son de gran utilidad. Sin embargo, dada la falta de aleatorización, es imprescindible evitar sesgos y controlar el efecto de factores de confusión para obtener resultados válidos. Estos estudios son los que permiten establecer una relación causal entre efectos adversos y medicamentos (23). La indicación es conocer la efectividad, farmacodinamia, distribución y toxicidad de las diferentes sustancias y medicamentos que se administran a la población e individuos.

Como todos los estudios que se han expuesto anteriormente tienen diferentes formas de evaluar los desenlaces o las medidas de desenlaces o de eventos, se realizará una revisión de estas medidas de desenlaces de los eventos.

#### VII. Formas de medidas del desenlace.

La identificación y la cuantificación del desenlace es ampliamente utilizado, sin embargo esta terminología es sumamente complicada para los investigadores y sus lectores, ya que por ejemplo el término tasa o "rate" (como la tasa de mortalidad materna) ha sido con mucha frecuencia mal usada en los artículos de las revistas científicas y textos a través de varias décadas, ya que a menudo es usada en forma intercambiables con la de la proporción y la razón (7). En la figura 5a se presenta una clasificación y definición de estos términos (6) y en la figura 5c un resumen de formulas útiles para el calculo del desenlace. A continuación se tratará de analizarlos uno a uno:

#### VIIA.-Proporción.

Es a menudo utilizado como sinónimo de tasa pero a diferencia de ésta, la *proporción* no tiene el componente en el tiempo, pero similar a la tasa, la *proporción* tiene el numerador incluido en el denominador (57), es generalmente expresado en porcentaje, y el numerador y el denominador tienen la misma unidad, por lo que al dividirse queda eliminada unidad de medida. Así, en esta expresión queda una dimensión sin cantidad, es decir un número sin unidad. Un ejemplo de proporción es la prevalencia identificada como un 27% de riesgo para tuberculosis, este número indica cuantos pacientes de la población están a riesgo de esta condición, en un momento particular (27%), ya que aquí no está involucrada la participación de nuevos casos en un tiempo determinado, y la prevalencia es más propiamente considerada como una proporción que como una tasa. Finalmente, es importante mencionar que ambas, la tasa y la *proporción* son consideradas como razones, pero lo opuesto no es verdadero. En algunas razones el numerador no está incluido en el denominador, por ejemplo en la razón de mortalidad materna, que incluye mujeres que murieron de causas relacionadas al embarazo en el numerador, sobre las mujeres con partos de nacidos vivos, en el denominador usualmente, 100.000; no todas las mujeres incluidas en el numerador son incluidas en el denominador, por ejemplo mujeres que murieron de embarazos ectópicos no podrían ser tomadas como partos de nacidos vivos por lo cual aquí está la diferencia de razón y tasa o "rate".

**VII B. Tasa.**

Es la medida de la frecuencia de un evento en la población, tal y como se muestra en la figura 5a. El numerador (aquellos con el desenlace o evento de la tasa debe estar contenido en el denominador (que comprenden todos aquellos con el riesgo del evento o desenlace). Aunque todas las razones se caracterizan por un numerador y un denominador, la tasa o "rate" tiene dos características que la identifica como son: el tiempo y un multiplicador. La tasa o "rate" indica el tiempo durante el cual el evento ocurre y tiene un multiplicador común de base de 10, produciendo así un número en el tiempo. Un ejemplo de esta es la **tasa de incidencia**, indicando el número de nuevos casos de una enfermedad que ocurren en una población a riesgo sobre un intervalo de tiempo, por ejemplo la tasa de 10 casos de cáncer por 100.000 personas al año

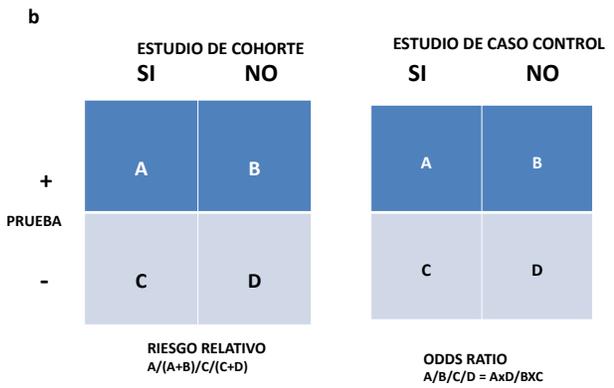
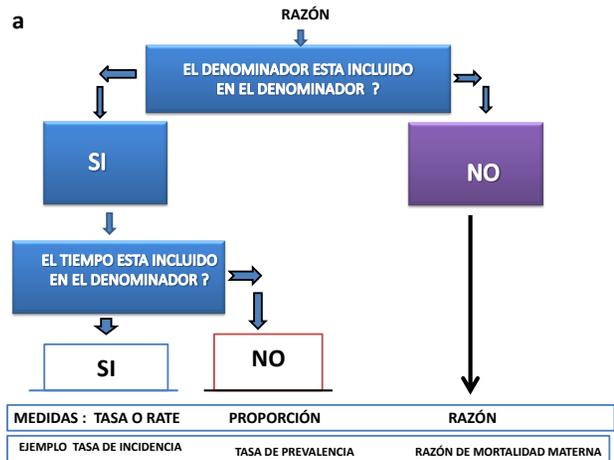
**VII C. Razón.**

Es el valor obtenido por dividir un número entre otro (58), estos dos números el numerador y el denominador pueden estar o no relacionados. Basados en las características y su relación entre del numerador y el denominador, la Razón a su vez puede dividirse en dos grupos: 1.- Aquellos en el cual el numerador está incluido en el denominador la cual puede a su vez considerarse como **Tasa o "Rate"** y Proporción 2.- En aquellos donde el numerador no está incluido en el denominador como es la razón de mortalidad materna ver figura 5a

**VIII. Medidas de asociación.**

Los tipos de medidas usadas para definir una asociación entre la exposición y el evento o desenlace dependen del tipo de dato. Para datos con variables categóricas el riesgo relativo (RR) y la odds ratio (OR) o razón de ventaja o chance, son las más comúnmente usadas y estas describen la relación entre la exposición y el desenlace o evento resultante. A continuación se discuten:

**Riesgo relativo (RR).** También llamado razón de riesgo, muy útil y se refiere a la frecuencia de eventos que ocurren en el grupo expuesto dividido sobre la frecuencia de eventos en el grupo no expuesto. Si la frecuencia de eventos es la misma en ambos grupos, el riesgo será igual a la unidad,



**c**

	Presente	Ausente
Grupo Intervenido	a	b
Grupo Control	c	d

- Tasa de eventos en el control=  $c/(c + d)$
- Tasa de eventos en el grupo intervenido= $a/(a+b)$
- Reducción de riesgo absoluto (RRA):  $(c / c+d) - (a / a+b)$
- Riesgo relativo (RR):  $(a / a+b) / (c / c+d)$
- Reducción de riesgo relativo (RRR):  $1 - RR$
- Odds ratio (OR):  $(a / b) / (c / d)$
- Número necesario para tratar (NNT):  $(1 / RRA) \times 100$

**Figura 5.5a** Algoritmo para diferenciar la tasa, proporción y razón 5b: En el estudio de caso control. La odds ratio puede ser usada para aproximarse al riesgo relativo sobre la asunción de que la enfermedad es rara. 5c. Fórmulas útiles en los desenlaces.

indicando que la asociación de eventos en ambos grupos es la misma. Por contraste, si el evento o

desenlace es más frecuente en el grupo expuesto que en el no expuesto, el riesgo será mayor a la unidad, esto implica que existe un aumento del riesgo asociado en el expuesto e inversamente si la frecuencia de eventos o enfermedad en el grupo expuesto es menor con relación al no expuesto luego el riesgo relativo será menor que la unidad, lo cual implica un efecto protector de la exposición. El **RR** se utiliza en los estudios de cohortes, esta razón de riesgo es definida como la razón de la incidencia de enfermedad en el grupo expuesto dividido por la incidencia de enfermedad en el grupo no expuesto (ver figura 5b). El RR puede ser calculado en los estudios de cohortes como son por ejemplo el estudio del Corazón de Framingham donde los sujetos con cierta exposición tal como hipertensión, hipercolesterolemia fueron seguidos prospectivamente para saber los eventos cardiovasculares en sujetos con o sin exposición. La incidencia de eventos cardíacos en los sujetos con y sin exposición era luego usada para calcular el RR y determinar si la exposición era un factor de riesgo en la producción de estos eventos. (37, 39, 54).

**Razón de chance o ventaja o razón de productos cruzados u odds ratio (OR).** La OR tiene un significado diferente según sea el tipo de estudio. En estudios de caso control, se utiliza como medida de asociación, e indica el chance de exposición en el grupo de casos o con la enfermedad, dividido entre el chance de exposición en el grupo control. Como se describe arriba, los sujetos son seleccionados sobre la base del estado de la enfermedad en el estudio de casos y controles, por lo tanto no es posible calcular la frecuencia o tasa de desarrollo de una enfermedad dada que no se conoce la presencia o la ausencia de la exposición, así la OR es a menudo usada como una aproximación del riesgo relativo en los estudios de casos y controles. Ejemplo de ello, es un estudio de casos y controles realizado para evaluar la relación de la ingesta de azúcar artificial y el cáncer de la vejiga. La razón de chance o de ventaja (odds) de azúcar artificial consumida en los casos y controles, fue usada para calcular la razón de ventaja u odds ratio y así determinar si la azúcar artificial estaba asociada con el cáncer de vejiga. Sobre la asunción de que esta enfermedad es considerada que es bastante rara (CA de vejiga), la razón de ventaja da un estimado estable no sesgado del riesgo relativo (figura 5b). También la razón de ventaja es usada en los estudios de casos y controles anidado dentro de un estudio de cohorte también se aproxima al riesgo relativo aun cuando la asunción de la enfermedad rara no es mantenida. Si en los estudios de los casos y controles tienen la misma

OR o razón de chance de tener el evento en los expuestos a la exposición, y en los no expuestos entonces la OR será igual a unidad, lo cual indica que no tiene ningún efecto. Si los casos tienen mayor chance de eventos en el grupo expuesto a la exposición que los no expuestos o controles, luego la OR será mayor de la unidad, lo que implica un riesgo mayor asociado a la exposición, similarmente si la OR es menor de la unidad indica un efecto protector de la exposición.

La OR puede ser calculada también en los estudios transversales, así como los de cohorte y en los experimentos clínicos aleatorizados o RCT. Aquí la OR o razón de ventaja de eventos es la razón a favor del desenlace en el expuesto frente al no expuesto. De la misma manera la OR es utilizada en los metaanálisis, en donde tenemos reunidos muchos estudios los cuales se totalizan en forma de OR total. Sin embargo hay que hacer la aclaración de que la OR no indica el Riesgo Relativo (RR), cuando la proporción del desenlace es mayor del 5 al 10% , por lo tanto este término tiene poca relevancia clínica o significado cuando la tasa de incidencia es alta (57).

La OR en los estudios de casos y controles, es definida como el chance de que ocurra o haya ocurrido un evento o una enfermedad en el grupo expuesto al riesgo dividido, sobre el chance de que dicho evento o enfermedad no haya ocurrido en el grupo no expuesto o grupo control (ver figura 5a). Como se describió anteriormente, los sujetos son seleccionados sobre la base de la enfermedad en los estudios de casos y controles, por lo tanto no es posible calcular la frecuencia de desarrollo de la enfermedad dado que no sabemos si hay la presencia o la ausencia de exposición. Así la OR es a menudo usada para aproximarse al riesgo relativo en estudio de casos y controles en el cual la frecuencia de la enfermedad es menor al 5%.

En la figura 5b podemos observar que si la enfermedad es rara, tal que A es mucho menor que B y C también es mucho menor a D entonces  $A/(A+B)$  se aproxima a  $A/B$  y  $C/(C+D)$  se aproxima a  $C/D$ , en esta situación el riesgo relativo es igual a  $(A/B)/(C/D)$  el cual al desarrollar esta expresión nos resulta  $(A \times D)/(B \times C)$  que es igual a la OR.

La razón de ventaja o chance es un concepto probabilístico, íntimamente relacionado con la probabilidad siendo el cociente de la probabilidad (p) de que un evento suceda con respecto a la probabilidad de que este evento no suceda (1-p) resultando que la OR de un evento es igual a  $p/(1-p)$ . Este cociente, se puede expresar como un número

entero tal como "Oportunidad" o ventaja que son observado en los juegos de azares tal como obtener 1 en 6 al lanzar un dado, pero para fines técnicos la división se puede realizar para alcanzar un número real positivo dando este cociente  $1/6 = 0.166$ . También la razón de oportunidad o ventaja son el cociente de no-ocurrencia a ocurrencia de un evento. Si el cociente de ocurrencia de una enfermedad es  $1/10 = 0,1$  (10%) que es igual en chance a 1 en 9 o lo que es lo mismo al chance  $1/9=0,11$ , por lo tanto el cociente de no ocurrencia tendrá una probabilidad de  $9/10=0,9$  (90%) y el chance de no ocurrencia será de  $9/1 = 9$ .

Existen otras medidas como: 1) **Riesgo absoluto**. El RR y la OR no permiten una medida de riesgo para compararla con el estándar o control en forma absoluta Sin embargo algunas veces es deseable conocer el riesgo absoluto. Por ejemplo un 40% de aumento del riesgo en enfermedad cardiaca debido a una particular exposición, no nos permitirá saber la probabilidad que la exposición en un paciente individual conduzca a la enfermedad cardiaca. 2) **Reducción del riesgo atribuible (RRA) o diferencia de riesgo (DR)**. Es una medida absoluta de riesgo y esta representa por el exceso de riesgo de enfermedad en aquellos expuestos tomando en consideración la frecuencia basal de la enfermedad. El riesgo atribuible es considerado y definido como la diferencia entre la tasa de incidencia de eventos del grupo expuesto frente al grupo no expuesto:  $DR \text{ O } RRA = RR \text{ EXPUESTO} - RR \text{ EN EL NO EXPUESTO}$ . 3) **El riesgo atribuible a las poblaciones** es usado para describir el exceso de frecuencia de la enfermedad en la población total estudiada de los individuos expuestos y los no expuestos que se atribuyen a la exposición. Esta medida es calculada por multiplicar el riesgo atribuible por la proporción de individuos expuestos en la población:  $RA \text{ POBLACIÓN} = RRA \text{ O } DR \times \text{proporción de expuestos en la población}$ . 4) **Número necesario de tratar (NNT)**. Es el número de pacientes que deberíamos tratar para prevenir un evento adverso o una muerte, enfermedad o una recaída y es a menudo usado para presentar los resultados en los experimentos clínicos aleatorizados Este NNT es el recíproco de la Reducción del riesgo absoluto o RRA o la DR y es igual a:  $NNT = 1/ RRA = 1/ (RRA \text{ Control} - RRA \text{ Expuesto o Tratado})$  este denominador es igual a la frecuencia o rata de eventos adversos absoluto en el grupo placebo menos la rate de eventos adversos absoluto en los pacientes tratados. También se puede representar así:  $100/RRA$  (donde el RRA está representado en %) o también  $1/RRA$  (cuando el RRA está representado como proporción).

Esta medida puede ser usada en estudios de intervención incluyendo grupos tratados y en grupos de prevención. El estimado para el NNT está sujeto a considerables error y es generalmente presentado con intervalos de confianza al 95% para que ser interpretado correctamente. 5) **Número necesario de daño (NNH)**. Es el número de pacientes que deberías ser expuesto a un factor de riesgo o tratados sobre un periodo específico de tiempo para que se produzca un efecto colateral o de daño en un paciente. En otras palabras ocurrencia de enfermedad, reacción adversa o recaída Un ejemplo seria si uno espera que 5 pacientes de 100 pacientes presenten fatiga como efecto colateral adverso cuando reciban un beta bloqueantes entonces uno debería de tratar 20 pacientes para causar un efecto colateral de fatiga luego el NNH es 20 que es igual  $100/ 5$ . Mientras menor es el NNH peor es factor de riesgo o el tratamiento que está recibiendo, es un factor de detrimento de los factores de riesgo o de un tratamiento recibido y es igual a  $1 / (RRA \text{ en el expuesto o tratado} - RRA \text{ en el no expuesto o no tratado})$  también es igual  $NNH = 1/\text{Aumento de RA}$  (Riesgo en el tratado- Riesgo en el placebo o no tratado)

En resumen el RRA nos da una buena apreciación del efecto en cuanto a su real magnitud, pero por tratarse de una medida absoluta sólo es aplicable al grupo en estudio que tiene ese riesgo basal. Y la RRA y la RRR tienen cualidades distintas y complementarias que nos permiten valorar mejor la magnitud del efecto de una intervención determinada y, por lo tanto, ambas merecen ser consideradas.

El NNT tiene la ventaja de darnos una idea más tangible y aplicable a la clínica respecto de la efectividad de un tratamiento, ya que nos entrega un valor en términos de pacientes y no solamente un número

#### IX.- Intervalos de confianza y niveles de investigación.

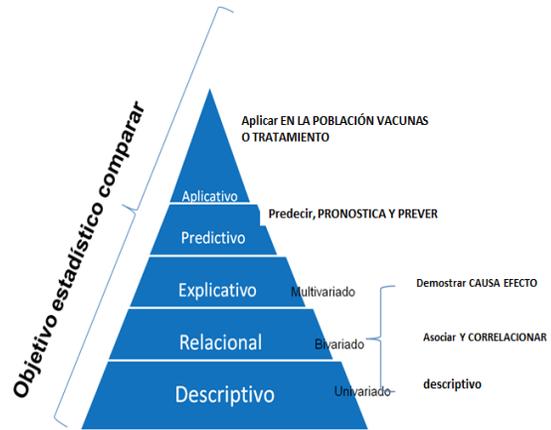
**Intervalos de confianza (IC)**. Para decidir sobre la efectividad de una intervención en un estudio, no basta con aceptar el estimador puntual (*point estimate*) del resultado del estudio, pues como recordará, si Ud. repite 100 veces el mismo experimento, las 100 veces obtendrá resultados similares, pero no iguales. En términos clínicos simples el IC de un estimador puntual es el intervalo dentro del cual caerá el estimador puntual la mayoría de las veces que se repita el experimento. Por convención el más

utilizado es el Intervalo de Confianza del 95 %, es decir, el intervalo dentro del cual estará el resultado 95 veces de cada 100 experimentos. El IC es por tanto la forma de establecer la precisión del resultado (estimador puntual). Siempre debe fijarse en la amplitud del intervalo: los intervalos más estrechos nos dan mayor precisión, los intervalos demasiado amplios nos dejan más incómodos, así debe tener presente además que mientras más amplitud se evidencie en los IC, menor precisión existe en los resultados y viceversa. Pues son resultados poco precisos. Es así como para un mismo resultado de RR, nuestra seguridad (precisión) en la interpretación depende del IC, además de dar alguna idea de la relevancia clínica del resultado más allá de la significación estadística de este. Los IC reflejan la precisión de un resultado de un estudio y el rango de valores para la variable, tal como para la proporción, RR, OR, que tienen una probabilidad especificada por el intervalo de contener el valor verdadero de la población entera, de donde la muestra ha sido extraída. Aunque el 95% de IC son los más comúnmente usados, otros tal como 90 % y el 99% pueden también ser utilizados (39). Para una RR o OR al 95 % el cual no incluye a la unidad, permite decir que la diferencia es significativa a un nivel de significación del 0,05 o al 5%, (57)

**Niveles de investigación.** Sería necesario en este momento de la revisión tal como lo señala Dr. Supo en su sitio web de hablar de los niveles de la investigación clínica la cual la podríamos esquematizarla como al imaginamos como una escalera de 6 peldaños, el tránsito a través de estos peldaños es lo que se denomina líneas o niveles de investigación como es mostrado en la caja 2, y que podríamos definirlo de la manera creciente de cada peldaño así (60):

**1.- Exploratorio:** Se plantean cuando no existe un cuerpo teórico abundante que ilumine el estudio de un fenómeno observado; y los resultados que se obtengan sean un aporte al reconocimiento e identificación de los problemas. No hay preguntas que conduzcan a problemas precisos, se exploran áreas problemáticas. Se trata de una investigación cualitativa; por lo que no se requiere de manejo estadístico.

**2.- Descriptivo:** Describe fenómenos sociales o clínicos en una circunstancia temporal y geográfica determinada. Desde el punto de vista cognoscitivo su



Caja 2. Niveles de investigación.

finalidad es describir y desde el punto de vista estadístico su propósito es estimar parámetros. La estadística consiste en estimar frecuencias y/o promedios y otras medidas univariadas. Ej. Los estudios de frecuencia de la enfermedad: Incidencia y Prevalencia.

**3.- Relacional:** No son estudios de causa y efecto; porque las pruebas estadísticas solo demuestran dependencia entre diferentes eventos; aquí podemos encontrar los estudios de asociación sin relación de dependencia, y las correlaciones espurias. La estadística es bivariada, podemos hacer asociaciones y medidas de asociación; correlaciones y medidas de correlación. Ej. Chi Cuadrado y R de Pearson.

**4.- Explicativo:** Su finalidad es explicar el comportamiento de una variable en función de otra(s); aquí se plantea una relación de causa-efecto, y tiene que cumplir otros criterios de causalidad (Bradford Hill); requiere de control tanto metodológico como estadístico. La estadística multivariada; tiene por finalidad descartar asociaciones aleatorias, casuales o espurias entre la variable independiente y dependiente. Ej. Chi 2 de Mantel - Haenszel.

**5.- Predictivo:** Se encarga de la estimación probabilística de eventos generalmente adversos, como puede ser las complicaciones de la enfermedad, la mortalidad, etc. La línea investigativa debe haber pasado previamente por los otros niveles. Se aplican un conjunto de técnicas estadísticas. Ej. La validación de una prueba diagnóstica requiere: Alfa de Cronbach, Índice Kappa, ANOVA, Curvas ROC.

## PRO Y CONTRA DE LOS ESTUDIOS DE PREVALENCIA O DE CORTE TRANSVERSAL

- |   |   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Fortalezas</b></li> <li>• Permiten estimar simultáneamente la frecuencia de la enfermedad y la exposición o la probabilidad que una persona expuesta presente la enfermedad</li> <li>• Puede estudiarse múltiples enfermedades simultáneamente</li> <li>• Son mas corto y económicamente mas baratos que los estudios longitudinales</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Debilidades</b></li> <li>• Se estudian los casos prevalentes (pueden no ser representativos de todos los pacientes con la enfermedades al no incluirse los rápidamente letales)</li> <li>• No se puede establecer la secuencia temporal de las variables estudiadas</li> <li>• Difícil de separar los factores de riesgos con los factores pronósticos</li> </ul> |
|---|---|

## PRO Y CONTRA DE LOS ESTUDIOS OBSERVACIONALES

- |  |   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FORTALEZAS</b></li> <li>• Puntos finales duros clínicamente importantes y posibles</li> <li>• Cohortes grandes que permiten la recolección de eventos infrecuentes</li> <li>• Población no seleccionada de pacientes consecutivos - generalizables a todos los pacientes</li> <li>• Reclutamiento Rápido</li> <li>• Muy baratos</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>DEBILIDADES</b></li> <li>• Factores de confusión imposible de ajustar por modelos estadísticos complejos</li> <li>• Calidad de los datos no son tan buenos</li> <li>• Variables faltantes - por selección no deseable</li> <li>• Monitoreo limitado</li> <li>• Análisis estadísticos avanzados y multivariable lo cual son difícil de comprender</li> </ul> |
|--|---|

## PRO Y CONTRA DE LOS ESTUDIOS EXPERIMENTALES ALEATORIZADOS

- |  |  |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FORTALEZAS</b></li> <li>• Estándar de oro para los ensayos clínicos comparativos</li> <li>• Puntos finales de importancia clínica - puntos finales duros posibles</li> <li>• Elimina las diferencias basales entre los grupos o no son distinguibles</li> <li>• Datos de alta calidad con un monitoreo apropiado</li> <li>• Se le adjudican los eventos</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>DEBILIDADES</b></li> <li>• Muy caro</li> <li>• Necesitan largo tiempo para planearlos y completarlos</li> <li>• Población altamente seleccionada</li> <li>• A menudo provienen de centro de estudios seleccionados</li> <li>• A menudo son financiados por industria - por lo cual solamente estudios económicos podrían ser realizados</li> <li>• A menudo los puntos finales son sustituto como por ejemplo revascularización de la lesión blanco versus angina o infarto del miocardio</li> </ul> |
|--|--|

**Caja 3.** Resumen sobre las ventajas y debilidades de los estudios más importantes en la literatura médica y científica

la vida cotidiana o a controlar situaciones prácticas. Puede ser programática o no programática, de manera que enmarca a la innovación técnica, artesanal e industrial como la propiamente científica.

Las técnicas estadísticas apuntan a evaluar el éxito de la intervención, como medidas de impacto sobre los principales indicadores de salud: tasas, coberturas, rendimiento, etc.

## X. Conclusiones.

Comprender qué clase de estudio ha sido realizado sería un prerrequisito para poder evaluar y comprender los artículos de una investigación. La investigación clínica y epidemiológica puede ser dividida en OBSERVACIONAL Y EXPERIMENTAL (en la caja 3 se resumen ventajas y desventajas de cada uno de los estudios) Los estudios observacionales como son los estudios descriptivos que es un acercamiento inicial a los nuevos eventos y condiciones. Esos estudios generalmente enfatizan la características de nuevas enfermedades o valoran el estado de salud de una comunidad. La administración de la salud usados en los estudios descriptivos es una tendencia a monitorizar y los planes para los recursos de la salud. En contraste, los epidemiólogos y los clínicos generalmente utilizan los reportes descriptivos para investigar las pistas de la causa de las enfermedades generando hipótesis. Los estudios observacionales son ulteriormente categorizados en aquellos sin o con grupo de comparación. Solo los estudios con grupos de comparación o grupo control permitirán a los investigadores evaluar la posible asociación causal y de aquí surgen los estudios analíticos como son los estudios de casos y controles y los estudios de cohortes un hecho que a menudo es olvidado o ignorado por los investigadores. Desenlaces o eventos dicotómicos de los estudios deberían ser reportados como medidas de asociación como son las proporciones, las tasas y las razones, así como sus riesgos relativos, con sus intervalos de confianza; las cuales son a menudo más informativas que las pruebas de hipótesis con valores arbitrarios de  $p$  menor de 0,05 que no tienen bases en medicina científica y deberían ser rechazados y solo aceptarlos si tienen su intervalo de confianza. Los reportes de los estudios de cohorte y casos controles deberían identificar y describir los posibles efectos de sesgos y el investigador debería también medir y controlar los posibles factores de confusión

Por último en esta revisión nos permite saber que los estudios experimentales son una de las mejores evidencias de los estudios científicos y en esta categoría tenemos a los estudios no aleatorizados y los aleatorizados (RTC), estos últimos son los estudios de standard de oro de todos estos estudios científicos, con sus diferentes varianzas.

También en la parte final de la revisión se trata de explicar en forma detallada los **niveles de investigación** que le da una orientación al investigador de cuales son las líneas de investigación en el campo científico.

Por lo tanto los beneficios de esta revisión son múltiples como es la utilidad de conocer la clasificación de los diseños, permitirle a los individuos que van a hacer investigación la mejor elección de un diseño

apropiado; así como también para aquellos que leen artículos de investigación, darle el peso apropiado a los datos que se recogen y las conclusiones que se obtienen de estos diseños, y de esta manera apoyar o reforzar o no los datos que son apropiados y sólidos, para poder estimular la formulación de hipótesis y realización de nuevos trabajos científicos.

### Agradecimientos

Especial agradecimiento a la Dra. Mariela Paoli Valeri, por la revisión crítica del manuscrito.

### Referencias

1. Tatum HJ, Beltran RS, Ramos R, Van Kets H, Sivin I, Schmidt FH. Immediate postplacental insertion of GYNE-T 380 and GYNE-T 380 postpartum intrauterine contraceptive devices: randomized study. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175: 1231-5. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
2. Silver RK, Helfand BT, Russell TL, Ragin A, Sholl JS, MacGregor SN. Multifetal reduction increases the risk of preterm delivery and fetal growth restriction in twins: a case-control study. *Fertil Steril* 1997; 67: 30-3. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
3. Garg SK, Chase HP, Marshall G, Hoops SL, Holmes DL, Jackson WE. Oral contraceptives and renal and retinal complications in young women with insulin-dependent diabetes mellitus. *JAMA*. 1994; 271: 1099-102. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
4. Berenson AB, Chacko MR, Wiemann CM, Mishaw CO, Friedrich WN, Grady JJ. A case-control study of anatomic changes resulting from sexual abuse. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182: 820-31. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
5. Hennekens CH, Buring JE. Epidemiology in medicine. Boston: Little, Brown and Company, 1987. [[Google scholar](#)]
6. Crimes DA, Schutz KF. An Overview of Clinical research: The Lay of the Land. *Lancet* 2002; 359:57-61. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
7. Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady D, Hearst N, Newman RB, eds. Designing clinical research: an epidemiologic approach, 2nd edn. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2011. [[Google scholar](#)]
8. Kelsey JL, Whittemore AS, Evans AS, Thompson WD. Methods in observational epidemiology, 2nd eds. New York: Oxford University Press, 1996. [[Google scholar](#)]
9. Feinstein AR. Clinical epidemiology: the architecture of clinical research. Philadelphia: WB Saunders Company, 1985. [[Google scholar](#)]
10. Schulz KF, Chalmers I, Grimes DA, Altman DG. Assessing the quality of randomization from reports of controlled trials published in obstetrics and gynecology journals. *JAMA* 1994; 272: 125-8. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
11. Funai EF, Rosenbush EJ, Lee MJ, Del Priore G. Distribution of study designs in four major US journals of obstetrics and gynecology. *Gynecol Obstet Invest* 2001; 51: 8-11. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
12. Israni R. Medpage Tools Guide to Biostatistics. Medpage today 2010. Com: 1-11.
13. Cates WJR, Smith JC, Rochat RW, Patterson JE, Dolman A. Assessment of surveillance and vital statistics data for monitoring abortion mortality, United States, 1972-1975. *Am J Epidemiol* 1978; 108: 200-6. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
14. Hennekens CH, Buring JE. Epidemiology in medicine. Boston: Little, Brown and Company, 1987. [[Google scholar](#)]
15. Lilienfeld AM, Lilienfeld DE. Foundations of epidemiology, 2nd edn. New York: Oxford University Press, 1980 [[Google scholar](#)]
16. Hager WD, Eschenbach DA, Spence MR, Sweet RL. Criteria for diagnosis and grading of salpingitis. *Obstet Gynecol* 1983; 61: 113-4. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
17. Wiesenthal AM, Ressler M, Caston SA, Todd JK. Toxic shock syndrome, I: clinical exclusion of other syndromes by strict and screening definitions. *Am J Epidemiol* 1985; 122: 847-56. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
18. Anon. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1992; 41: 1-19. [[PubMed](#)]
19. Ainsleigh HG. Beneficial effects of sun exposure on cancer mortality. *Prev Med* 1993; 22: 132-40. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
20. Schenken JR. Hepatocellular adenoma: relationship to oral contraceptives? *JAMA* 1976; 236: 559. [[PubMed](#)] [[Google scholar](#)]
21. Anon. Pneumocystis pneumonia: Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1981; 30: 250-2 [[PubMed](#)]
22. Foege WH. Smallpox eradication in west and central Africa revisited. *Bull World Health Organ* 1998; 76: 233-5. [[PubMed](#)]
23. Ruiz Álvaro M, Morillo Luis E.Z. Epidemiología Clínica Investigación Clínica Aplicada. Segunda reimpression. Agosto -2006. Editorial Medica International LTDA.
24. Friedman GD. Cigarette smoking and geographic variation in coronary heart disease mortality in the United States. *J*

- Chronic Dis* 1967; **20**: 769–79. [PubMed] [Google scholar]
25. Gilaberte Y., Aguilera J., Carrascosad JM., Figueroa FL., Romaní de Gabriel J. y E. Nagore E. Revision. La vitamina D: evidencias. *Actas Dermosifiliogr.* 2011; 102:572-88
  26. Seeley, J.R. 1994. Muerte por Cirrosis de hígado y precio de las bebidas alcohólicas. En: Buck, C., Llopis, A. Nájera, E. y Terris, M. (Recopiladores). Op. cit., pp. www.ecologiahumana.mda.cinvestav.mx
  27. Rothman KJ. *Modern epidemiology.* Boston: Little, Brown and Company, 1986
  28. Centerwall BS. Television and violence: the scale of the problem and where to go from here. *JAMA* 1992; **267**: 3059–63. [PubMed] [Google scholar]
  29. Austin DF, Karp S, Dworsky R, Herderson BE. Excess leukemia in cohorts of children born following influenza epidemics. *Am J Epidemiol* 1977; **101**: 77-83 [PubMed] [Google scholar]
  30. Tough SC, Greene CA, Svenson LW, Belik J. Effects of in vitro fertilization on low birth weight, preterm delivery, and multiple birth. *J Pediatr* 2000; **136**: 618–22. [PubMed] [Google scholar]
  31. Bider D, Livshitz A, Tur Kaspa I, Shulman A, Levron J, Dor J. Incidence and perinatal outcome of multiple pregnancies after intracytoplasmic sperm injection compared to standard in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 1999; **16**: 221–6. [PubMed] [Google scholar]
  32. Steegers-Theunissen RP, Zwertbroek WM, Huisjes AJ, Kanhai HH, Bruinse HW, Merkus HM. Multiple birth prevalence in The Netherlands: impact of maternal age and assisted reproductive techniques. *J Reprod Med* 1998; **43**: 173–9. [PubMed] [Google scholar]
  33. Dunn A, Macfarlane A. Recent trends in the incidence of multiple births and associated mortality in England and Wales. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1996; **75**: F10–9. [PubMed] [Google scholar]
  34. Anon. Update: trends in AIDS incidence, deaths, and prevalence—United States, 1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997; **46**: 165–73. [PubMed]
  35. Silverman WA. Memories of the 1953–54 Oxygen Trial and its aftermath: the failure of success. *Control Clin Trials* 1991; **12**: 355–8. [PubMed] [Google scholar]
  36. Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I. Smoking and dementia in male British doctors: prospective study. *BMJ* 2000; **320**: 1097–102. [PubMed] [Google scholar]
  37. Crimes D. A., Schutz K. F. Cohort studies: Marching towards outcomes. *Lancet* 2002; **359**: 341-5 [PubMed] [Google scholar]
  38. Whittemore AS, Harris R, Itnyre J. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies, II: invasive epithelial ovarian cancers in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am J Epidemiol* 1992; **136**: 1184–203. [PubMed] [Google scholar]
  39. Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady D, Hearst N, Newman RB, eds. *Designing clinical research: an epidemiologic approach*, 2nd ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 2011. [Google scholar]
  40. Sackett DL. Bias in analytic research. *J Chron Dis* 1979; **32**: 51–63. [PubMed] [Google scholar]
  41. Seman LJ, DeLuca C, Jenner JL, Cupples LA, McNamara JR, Wilson PW, Castelli WP, Ordovas JM, Schaefer EJ. Lipoprotein(a)-cholesterol and coronary heart disease in the Framingham Heart Study. *Clin Chem* 1999; **45**: 1039–46. [PubMed] [Google scholar]
  42. Hannaford PC, Kay CR. The risk of serious illness among oral contraceptive users: evidence from the RCGP's oral contraceptive study. *Br J Gen Pract* 1998; **48**: 1657–62. [PubMed] [Google scholar]
  43. Levgur M, Duvivier R. Pelvic inflammatory disease after tubal sterilization: a review. *Obstet Gynecol Surv* 2000; **55**: 41–50. [PubMed] [Google scholar]
  44. Hennekens CH, Buring JE. *Epidemiology in medicine.* Boston: Little, Brown and Company, 1987. [Google scholar]
  45. Bland JM, Altman DG. Regression towards the mean. *BMJ* 1994; **308**: 1499. [PubMed] [Google scholar]
  46. Kelsey JL, Whittemore AS, Evans AS, Thompson WD. *Methods in observational epidemiology*, 2nd edn. New York: Oxford University Press, 1996. [Google scholar]
  47. Rothman N, Cantor KP, Blair A, Bush D, Brock JW, Helzlsouer K, Zahm SH, Needham LL, Pearson GR, Hoover RN, Comstock GW, Strickland PT. A nested case-control study of non-Hodgkin lymphoma and serum organochlorine residues. *Lancet* 1997; **350**: 240–4. [PubMed] [Google scholar]
  48. Schutz, K.F., Crimes D.A., Case Control studies :Research inverse. *Lancet* 2002; **359**: 431-34 [PubMed] [Google scholar]
  49. Kelsey JL, Whittemore AS, Evans AS, Thompson WD. *Methods in observational epidemiology.* New York: Oxford University Press, 1996. [Google scholar]
  50. Lew JF, Swerdlow DL, Dance ME, et al. An outbreak of shigellosis aboard a cruise ship caused by a multiple-antibiotic-resistant of shigella flexneri. *Am J Epidemiol* 1991; **134**: 413-20
  51. Schlesselman JJ, Schneiderman MA. Case-control studies: design, conduct, analysis. *J Occup Med* 1982. **24**: 879 [Google scholar]
  52. Stadel BV, Rubin GL, Webster LA, Schlesselman JJ, Wingo PA. Oral contraceptives and breast cancer in young women. *Lancet* 1985; **2**: 970–3. [PubMed] [Google scholar]
  53. Lindefors-Harris BM, Eklund G, Adami HO, Meirik O. Response bias in a case-control study: analysis utilizing comparative data concerning legal abortions from two independent Swedish studies. *Am J Epidemiol* 1991; **134**: 1003-8 [PubMed] [Google scholar].
  54. Lilienfeld AM, Lilienfeld DE. *Foundations of epidemiology*, 2nd edn. New York: Oxford University Press, 1980.
  55. US Preventive Services Task Force. *Guide to clinical preventive services*, 2nd edn. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1996.
  56. Canadian Task Force on the Periodic Health Examination. *The Canadian guide to clinical preventive care.* Ottawa: Minister of Supply and Services Canada, 1994.
  57. Porta M, *A dictionary of epidemiology.* Edited for the International Epidemiological Association. 5th ed. Sander Greenland Oxford University press 2008. [Google scholar]
  58. Sackett DL, Deeks JJ, Altman DG. Down with odds ratios!. *Evidence based medicine* 1996; **1**: 164–6. [Google scholar]
  59. Sterne JA., Smith GD. Sifting the evidence: What's wrong with significance tests? *BMJ* 2001; **322**: 226-31
  60. Supo J. Videos de clases de análisis de datos epidemiológicos en la web. <http://www.bioestadistica.com/page/> y [www.seminariosdeinvestigación.com](http://www.seminariosdeinvestigación.com) 2012

**Como citar este artículo:** Donis JH, Tipos de diseños de los estudios clínicos y epidemiológicos. *Avan Biomed* 2013; **2**: 76-99

## Tumor sólido pseudopapilar de páncreas. Presentación de un caso reportado en Hospital Universitario de Los Andes, Mérida-Venezuela

### (Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas. A report in the Hospital Universitario de Los Andes, Mérida-Venezuela)

Naisbet Ortega-Vásquez <sup>1</sup>✉, Melisse Milano <sup>2</sup>, Ana Valentina Rojas-Esquerre <sup>1</sup>, Estrella Uzcategui <sup>3</sup>, Carlos Gonzalez-Torres <sup>3</sup>, Pierina Petrosino-Tepedino <sup>2</sup>, Asmiria De Sotolongo <sup>2</sup>, Elymar Barreto <sup>1</sup>, Julio Tabares <sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Estudiante de la Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela. <sup>2</sup> Anatomía Patológica, Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Mérida-Venezuela <sup>3</sup> Servicio de Cirugía General, Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes. Mérida-Venezuela.

[CASO CLÍNICO]

Recibido: 23 de Agosto de 2012. Aceptado: 19 de Diciembre de 2012.

#### Resumen

El tumor sólido pseudopapilar de páncreas es una neoplasia de bajo grado de malignidad, de etiología incierta y relativamente raro con una incidencia de 0.2 a 2.7% entre los tumores de páncreas exocrino. Se presenta con mayor frecuencia en mujeres jóvenes, siendo muy raro en varones, y existen pocos casos de mortalidad asociados a éste tumor. Pueden encontrarse incidentalmente o dar síntomas abdominales inespecíficos. Presentamos el caso de paciente femenina de 16 años de edad, quien consultó por saciedad temprana y dolor abdominal tipo cólico en epigastrio e hipocondrio derecho. Se realizó endoscopia digestiva superior punción con aguja guiada (PAF) guiada por ultrasonido endoscópico de lesión quística en cola de páncreas, con hallazgos compatibles con tumor sólido pseudopapilar de páncreas. Se realizó Pancreatectomía córporo-caudal con estudio de biopsia, los cuales confirmaron el diagnóstico preoperatorio. El tumor sólido pseudopapilar pancreático incluye entre sus manifestaciones clínicas dolor abdominal, sensación de plenitud o saciedad temprana, masa abdominal, náuseas y vómitos, entre otras. La tomografía axial computarizada puede revelar masa heterogénea grande y encapsulada. El diagnóstico definitivo se realiza con el estudio histopatológico y el tratamiento de elección es la cirugía, la cual por sí sola tiene un nivel elevado de curación.

#### Palabras clave

*Tumor sólido pseudopapilar, dolor abdominal.*

#### Abstract

Solid pseudopapillary tumor of the pancreas is a neoplasm of low malignant, of uncertain etiology and relatively rare with an incidence of 0.2 to 2.7% between exocrine pancreatic tumors. It occurs most often in young women and is very rare in men, and there are few cases of mortality associated with this tumor. May be found incidentally or give nonspecific abdominal symptoms. We report the case of a female patient aged 16, who consulted with early satiety and cramping abdominal pain in epigastrium and right hypochondrium. Upper gastrointestinal endoscopy was performed and an endoscopic ultrasound guided fine needle aspiration of the cystic lesion was performed, with findings consistent with pancreatic solid pseudopapillary tumor. Pancreatectomy was performed porated-flow with biopsy study, which confirmed the preoperative diagnosis. Solid pseudopapillary tumor pancreatic includes among its clinical manifestations abdominal pain, fullness or early satiety, abdominal mass, nausea and vomiting, among others. Computed tomography may reveal large encapsulated heterogeneous mass. The definitive diagnosis is made by histological study and treatment of choice is surgery, which alone has a high level of healing.

#### Keywords

*Solid pseudopapillary tumor, abdominal pain.*

## Introducción

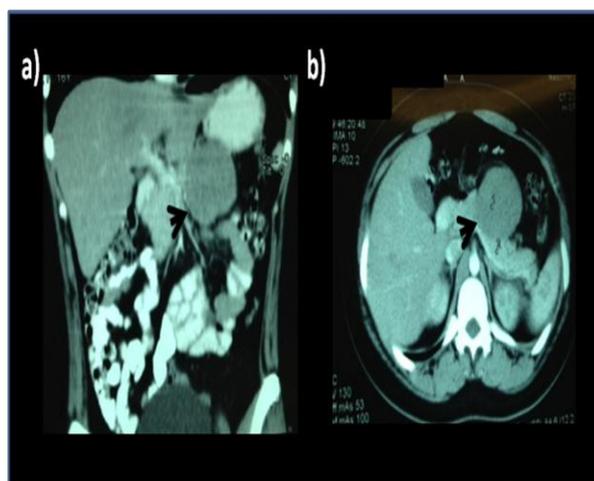
En el páncreas, tanto exocrino como endocrino, pueden desarrollarse diversos tipos de tumores, tanto benignos como malignos. (1) La mayor parte de los tumores del páncreas exocrino, son neoplasias glandulares sólidas y malignas, a las que se designan con el término de carcinoma de páncreas. No obstante, algunos de ellos son quísticos, en cuyo caso pueden ser lesiones benignas, limítrofes, o malignas que representan el 5% de todas las neoplasias pancreáticas. (2) En 1970, Hamoudi et al informaron de un tumor asintomático de la cabeza del páncreas en una niña de 12 años de edad, tratado mediante extirpación radical y evolución satisfactoria; hicieron notar las características microscópicas del tumor, y la ausencia de diferenciación exocrina y endocrina, propusieron un origen ductal y para describirlo acuñaron el término “neoplasia epitelial papilar del páncreas”. El primer informe de este tumor fue de Frantz en 1959, lo llamó tumor papilar del páncreas, benigno o maligno, y estableció que podía ser más bien un cáncer en opinión del patólogo. (2,3) En 1981, Kloppel y colaboradores reportaron un total de 5 casos. Para 1999, Lam y colaboradores realizaron una revisión retrospectiva de la bibliografía y sumaron 452 casos publicados. (3) En 1996, la Organización Mundial de la Salud (OMS) nombró la patología como “tumores pseudopapilares del páncreas”, de acuerdo con la clasificación internacional de tumores del páncreas exocrino.

Se presenta un caso de tumor pseudopapilar de páncreas diagnosticado en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes Mérida; por ser ésta una neoplasia pancreática benigna de muy baja incidencia a nivel mundial, con escasos reportes en nuestro país.

## Caso clínico

Se describe el caso de una paciente femenina de 16 años de edad, natural y procedente de Mérida, Venezuela, que presentó dolor abdominal en epigastrio e hipocondrio derecho tipo cólico, motivo por el cual fue referida a consulta de gastroenterología. Al examen físico, se encontró en buenas condiciones generales, abdomen con ruidos hidroaéreos presentes, blando, depresible y doloroso a la palpación en epigastrio e hipocondrio derecho, sin visceromegalias. Los exámenes de laboratorio se encontraron dentro de los parámetros normales. El

Ecosonograma abdominal se describió una lesión ocupante de espacio (LOE) hipocogénica (patrón sólido) de borde neto, bien definido de aproximadamente 59 x 51 mm en epigastrio y mesogastrio, entre pared posterior de estómago y cuerpo y cola de páncreas, reportándose como: leiomioma gástrico vs. tumor de cola de páncreas. En la Tomografía Axial Computarizada (TAC) abdominal se identificó LOE de 5x6cm, redondeado, de bordes bien definidos con captación de contraste endovenoso, que parece hacer cuerpo con el páncreas, con pérdida de los planos de clivaje con la pared posterior e inferior de la cámara gástrica. (Fig.1a y 1b)

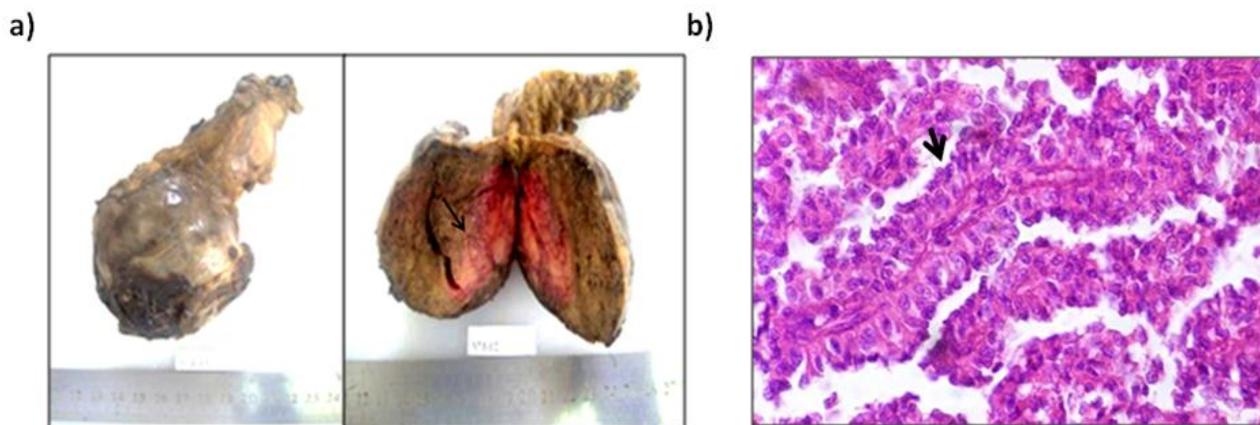


**Figura 1. a)** Muestra TAC abdomino-pélvica Corte coronal, mientras que la **b)** TAC abdomino-pélvica Corte Sagital. En ambos casos las flechas señalan la LOE en el cuerpo del páncreas

Se realizó Endoscopia digestiva superior y ultrasonido endoscópico con punción con aguja fina guiada por ultrasonido endoscópico en la que se evidenció una lesión quística y sólida en cuerpo de páncreas, de aproximadamente 60x60 mm de eje transversal mayor, redonda, de bordes bien definidos, con múltiples tabiques y quistes internos con algunas áreas sólidas, bien separada de la pared posterior del estómago y de los vasos esplénicos, sin invasión de los mismos, sugiriendo una neoplasia sólida papilar de páncreas con componente quístico. Los hallazgos citológicos e histológicos fueron compatibles con diagnóstico de tumor sólido pseudopapilar de páncreas, el cual fue confirmado con Inmunohistoquímica.

Se decidió practicar resección quirúrgica de la tumoración y pancreatomectomía corporo-caudal. El estudio histopatológico describió neoplasia constituida por células monótonas dispuestas en masas sólidas con extensas áreas de patrón pseudopapilar y espacios quísticos. El reporte anatomopatológico concluyó un Tumor Pseudopapilar de páncreas. (Fig. 2a y 2b).

exploración abdominal. Los estudios de laboratorio, tanto bioquímico como marcadores tumorales, suelen ser normales. (4) Es frecuente que el diagnóstico se haga de forma incidental al valorar el abdomen con un ultrasonido o con Tomografía Axial Computarizada (TAC). Puede manifestarse como una masa (60%), encontrarse incidentalmente al examen físico (10%) o



**Figura 2. a)** Muestra lesión nodular de 7x6 cm con superficie de corte sólida, blanco-amarillenta con múltiples hendiduras. **b)** Muestra neoplasia de bajo potencial maligno constituida por masas sólidas con áreas de patrón pseudopapilar y espacios quísticos, señalada por la flecha. Tinción con hematoxilina-eosina (200X).

## Discusión

El Tumor pseudopapilar de páncreas es un tumor relativamente raro que ocurre con una incidencia de 0.2 a 2.7% de los tumores de páncreas exocrino. Aparece principalmente en mujeres (95%) con edad promedio de 20 años. (2, 5) En un estudio realizado en el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de Nueva York-EEUU, titulado "Tumor sólido pseudopapilar de páncreas: enigma quirúrgico" reportaron un total de 24 casos entre enero de 1985 a julio de 2000 de los cuales 20 eran pacientes femeninas y 4 masculinos con edades promedio de 39 años.

La predominancia de las mujeres como portadoras de este tipo de tumor, podría estar relacionada con la existencia de receptores de progesterona, o como ha sido reportado por otros autores, estaría asociado a la relación existente entre el páncreas y los arcos genitales durante la embriogénesis, lo que determinaría que las células tumorales podrían derivar del epitelio celómico y del rete del ovario (6,7).

Los pacientes con tumor pseudopapilar de páncreas generalmente no presentan ningún síntoma. Si la lesión es pequeña no existen anomalías en la

curar con dolor (25%). La obstrucción biliar es rara, y el crecimiento por lo general es lento.

El estudio imagenológico comprende: La ecografía abdominal donde se describe una masa sólida, sólida-quística o quística, única sin tabicaciones, con calcificaciones en su interior, rodeada de una cápsula bien definida; la TAC, que lo describe como una gran masa sólida, sólida-quística o quística generalmente mayor de 8 cm, capsulada, con calcificaciones internas y/o capsulares, con áreas necrohemorrágicas (hipodensas) y áreas sólidas papilares (hiperdensas) que desplazan estructuras vecinas (8,9), con vía biliar y conducto pancreático fino; (10) esta última tiene una exactitud diagnóstica de un 60%. (9) Debido a que con estas características es muy difícil diferenciarlo de los otros tumores quísticos del páncreas, en más de un 50% de los casos el diagnóstico preoperatorio es incierto, planteándose como diagnósticos diferenciales los pseudoquistes y las neoplasias quísticas mucinosas (cistoadenomas y cistoadenocarcinoma).

Es una masa única, que puede estar adherida al bazo, generalmente con diámetro promedio de 10,5 cm, vascularizado, encapsulado y con márgenes lobulados, bien definidos. En su interior presenta

degeneración hemorrágica quística, con calcificaciones intratumorales (11).

El diagnóstico preoperatorio se puede realizar mediante una punción con aguja fina del quiste, siendo característico la presencia citológica de estructuras pseudopapilares, acidófilas con células PAS (+) y gránulos citoplasmáticos resistentes a la diastasa (12).

Macroscópicamente se caracterizan por ser tumores grandes, solitarios, redondeados y bien delimitados del páncreas redundante. La superficie de corte es lobulada pardo clara con áreas sólidas alternando con espacios quísticos; en ocasiones predominan las áreas quística y pueden confundirse con un pseudoquiste pancreático o con otros tumores pancreáticos quísticos (2).

Al microscopio se observan células epiteliales cuboidales, con abundante citoplasma claro y núcleos relativamente claros con nucléolos pequeños, las masa tumorales muestran necrosis y hemorragias y las células se disponen en masas sólidas, a menudo formando estructuras papilares; en las zonas más sólidas, las células forman espacios pseudoquísticos ocupados por material amorfo y compacto PAS (+). Hay escasas atipias celulares y ausencia virtual de actividad mitótica; el estroma es altamente vascular, con focos mixomatosos. Hacia la periferia están delimitados por una banda delgada de tejido fibroso, y

dentro de la masa tumoral puede haber pequeños focos de tejido pancreático acinar y conductos pancreáticos remanentes (2).

Al realizar el análisis inmunohistoquímico se puede encontrar positividad a vimentina, enolasa neuronal específica, a-1-antitripsina, a-1-antiquimiotripsina, CD10 y CD56 en más de 90 % de los casos (13).

El manejo de este tumor es fundamentalmente quirúrgico, y tiene por objetivo la resección completa del tumor. La existencia de metástasis no es rara y compromete principalmente al hígado; sin embargo, su resección está indicada debido a que incluso en estos casos se observa alta sobrevida. En general los pacientes poseen un buen pronóstico, reportándose sobrevidas que superan el 90% a 5 años. (12) Tang, reportó una sobrevida de 97% en una serie de 36 pacientes resecados en el Memorial Sloan Kettering Center, serie que incluyó 7 pacientes con metástasis hepáticas. (11) Igual resultado se observa en una revisión que incluyó 718 pacientes reportados en la literatura. (13) Otros estudios reportan una sobrevida a 4 y 20 años es de 100 y 85% respectivamente. La cirugía paliativa también reporta buenos resultados con sobrevida mayor a 10 años

## Referencias

- Robbins SL. Patología estructural y funcional: El páncreas. 6ta ed. McGraw-Hill interamericana 2002.
- Hurtado AH, Cortés ET. Tumores quísticos. En: Herrera M, Campuzano M, Uscanga L. Páncreas. 2ª ed. México: McGraw-Hill; 2000:
- Álvarez-Pertuz H, Poblete-Otero F, Arana-Sáenz A, Hernández-Ramírez K, Villegas-Bermúdez D. Tumor de Frantz-Gruber, un tumor sólido pseudopapilar del páncreas poco frecuente. Acta Méd Costarric. 2011; 53: 151-3 [\[Google Scholar\]](#)
- Campuzano M. Páncreas: Patología de los tumores de la encrucijada duodenopancreatobiliar. McGraw-Hill 2000
- Martin RC, Klimstra DS, Brennan MF, Conlon KC. Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: a surgical enigma? Ann Surg Oncol. 2002; 9: 35-40. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Salvia R, Bassi C, Festa L, Falconi M, Crippa S, Butturini G, Brighenti A, Capelli P, Pederzoli P. Clinical and biological behavior of pancreatic solid pseudopapillary tumor: Report on 31 consecutive patients. Surg Oncol. 2007; 95: 304-10. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Kosmahl M, Seada LS, Jänig U, Harms D, Klöppel G. Solid pseudopapillary tumor of the pancreas: its origin revisited. Virchows Arch. 2000; 436: 473-80. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Zhang H, Liang TB, Wang WL, Shen Y, Ren GP, Zheng SS. Diagnosis and treatment of solid pseudopapillary tumor of the pancreas. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2006; 5:454-8. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Dong DJ, Zhang SZ. Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: CT and MRI features of 3 cases. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2006; 5:300-4. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Huang HI, Shih SC, Chang WH, Wang TE, Chen MJ, Chan YJ. Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas: clinical experience and literature review. World J Gastroenterol. 2005; 11: 1403-9. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Frago R, Fabregat J, Jorba R, García-Borobia F, Altet J, Serrano MT, Valls C. Solid pseudopapillary tumors of the pancreas: diagnosis and curative treatment. Rev Esp Enferm Dig. 2006; 98:809-16. [\[PubMed\]](#) [\[Google Scholar\]](#)
- Venturelli FM, Carrasco CL, Del Pozo ML, Cárcamo CI, Felmer OE, Ibaceta MC, Leonelli AV. Tumor sólido-pseudopapilar del páncreas. Presentación de 3 casos clínicos Rev Gastroenterol Peru. 2011; 31: 72-6. [\[PubMed\]](#)
- De Aretxabala X, Rencoret G, Maluenda F, Fernandez C, Csendes A. Tumor sólido pseudopapilar del páncreas: caso clínico. Rev Chilena de Cirugía 2008; 60: 241-5. [\[Google Scholar\]](#)

**Como citar este artículo:** Ortega-Vásquez N, Milano M, Rojas-Esquerre AV, Uzcategui E, Gonzalez-Torres C, Petrosino-Tepedino P, De Sotolongo A, Barreto E, Tabares J, Tumor sólido pseudopapilar de páncreas. Presentación de un caso reportado en Hospital Universitario de Los Andes, Mérida-Venezuela. *Avan Biomed* 2013; 2: 100-3

## Eversión vesical completa a través de una fístula vesicovaginal (Complete bladder eversion through vesicovaginal fistula)

Jhoan Aragón-Charry<sup>1</sup>, Eduardo Reyna-Villasmil<sup>1</sup>✉, Joel Santos-Bolívar<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Servicio de Obstetricia y Ginecología, Maternidad "Dr. Nerio Belloso", Hospital "Dr. Urquinaona", Maracaibo - Venezuela.

[CASO CLÍNICO]

Recibido: 31 de Diciembre de 2012. Aceptado: 03 de Abril de 2013.

### Resumen

La eversión vesical completa es rara. Se presenta el caso de una eversión de vejiga urinaria a través de una fístula vesicovaginal acompañada de prolapso útero-vaginal concurrente. Se trata de paciente de 70 años que presentó una tumoración compatible con un prolapso vaginal grado IV y una tumoración edematosa, pegajosa y piriforme por delante del prolapso compatible con la vejiga con un orificio en la pared anterior de la vagina a través del cual la mucosa de la vejiga estaba evertida, procediendo al reposicionamiento y corrección manual de la eversión para luego ser corregida quirúrgicamente.

### Palabras clave

*Eversión vesical completa, Fístula vaginal, Prolapso vaginal.*

### Abstract

Complete bladder eversion is rare. A case of bladder eversion through vesicovaginal fistula accompanied with concomitant uterovaginal prolapse is presented. A 70 year-old patients presented a tumor compatible with vaginal prolapse type IV and an edematous, sticky and piriform tumor ahead of prolapse compatible with bladder with an orifice on anterior wall of vagina through bladder mucosa was everted, proceeding to reduction and manual correction of eversion and then was surgical corrected.

### Keywords

*Complete bladder eversion, Vaginal Fistula, Vaginal prolapse.*

### Introducción

La eversión vesical completa es rara. Solo unos pocos casos han sido reportados que ocurren en mujeres mayores, junto con el prolapso útero-vaginal, posterior al parto y la eversión a través de una fístula vesico-vaginal (1). Se presenta el caso de una eversión de vejiga urinaria a través de una fístula vesico-vaginal acompañada de prolapso útero-vaginal concurrente.

### Caso clínico

Se trata de paciente de 70 años, 8 gestas, 8 paras, quien acudió a consulta por presentar con síntomas de incontinencia urinaria y dos grandes masas que sobresalían por la vagina de 2 años de evolución. La paciente negaba antecedentes de intervenciones quirúrgicas o radioterapia. Al examen físico se observó la presencia de una tumoración de 12 x 8 x 8 centímetros compatible con un prolapso vaginal

grado IV (histerocele) y una tumoración edematosa, pegajosa, piriforme de aproximadamente 5 centímetros de diámetro por delante del prolapso compatible con la vejiga de la que se observaba el fondo, cuerpo y ambos orificios ureterales con un orificio de 1 x 1 centímetro en la pared anterior de la vagina a través del cual la vejiga estaba evertida (figura 1), lo cual fue confirmado por la inserción de una sonda de Foley. Se procedió al reposicionamiento y corrección de la eversión. Se realizó la cistoscopia donde se observó la fistula vesicovaginal por encima del trigono vesical, intentándose la corrección de la lesión, lo cual fue imposible. Sin embargo, se logró la cateterización de los uréteres con catéteres doble J. Se realizó la biopsia del tracto fistuloso que presentó resultados negativos para neoplasias.

Seis semanas después de la presentación inicial, la paciente fue sometida a una cirugía combinada abdominal y vaginal. Se realizó la vía abdominal se utilizó para realizar la histerectomía abdominal total y salpingooforectomía bilateral y facilitar el abordaje vaginal. La fístula fue corregida por vía vaginal con cierre de la cúpula vaginal, posterior fijación de epiplón entre la pared vaginal y la pared posterior de la vejiga. La paciente fue dada de alta a los 4 días del post-operatorio y el catéter urinario fue retirado a los 10 días.



**Figura 1.** En la presente imagen se observa la eversión completa de la vejiga junto con prolapso vaginal grado IV. Obsérvese la coloración distintiva de ambas estructuras, con un rosado pálido para el útero contrastando con una coloración roja edematosa de la vejiga, descansando ventralmente al útero.

La paciente se ha mantenido asintomática 5 meses después de la cirugía, sin problemas de incontinencia urinaria y con un patrón miccional normal.

## Discusión

La eversión vesical a través de la fístula vesico-vaginal es rara y su patogénesis es desconocida. El envejecimiento, la obesidad y la multiparidad pueden ser las posibles causas de la eversión vesical completa (2). El prolapso útero-vaginal junto a la laxitud del piso pélvico se asocia a esta condición (3). Existe el reporte de un caso en el cual se pudo demostrar la presencia de un adenocarcinoma en la pared engrosada de la vejiga urinaria (4). En el presente caso, la debilidad previa y laxitud del piso pélvico junto con la existencia del prolapso útero-vaginal probablemente propiciaron la aparición del cuadro clínico.

Existen cuatro tipos de eversión vesical: a) eversión del divertículo de la vejiga; b) eversión exclusiva de la mucosa de la vejiga; c) eversión parcial de todas las capas de parte de la pared vaginal; y d) eversión total de todas las capas de la pared vesical a través de la uretra o de la fístula vesico-vaginal (5). El manejo de los tipos uno y dos es sencillamente la escisión de la mucosa redundante. Las eversiones parciales son tratadas con reducción trans-uretral junto a cualquier procedimiento para evitar prolapso total como la citospexia (3). La forma más rara y compleja de tratar es la eversión vesical completa.

La multiparidad y la menopausia son factores bien conocidos de prolapso uterino, pero no para eversión vesical. La patología uretral y vesical, que incluye infecciones, cáncer y trauma son las principales responsables de la eversión vesical. La deprivación estrogénica durante la menopausia está asociada con disminución de la elasticidad de las paredes de la vejiga y la uretra, disminución del tono y la presión vesical y marcada reducción del flujo sanguíneo en el plexo vascular de las porciones submucosas de la vejiga y la uretra (6). Todos los casos reportados de eversión, al igual que el presente caso, estaban asociados a incontinencia urinaria, lo que se traduce que la patología vesical y uretral puede ser un factor predisponente importante para la eversión vesical (3). De igual forma, La cateterización crónica en mujeres menopáusicas es un factor de riesgo razonable para la eversión vesical. Las complicaciones más frecuentes

asociadas a la cateterización vesical a largo plazo son la bacteriuria asintomática o sintomática, incrustaciones e irritación de los tejidos de la uretra y la vejiga.

Durante el examen físico se debe determinar si la eversión es de la mucosa, parcial o completa. El prolapso de la mucosa puede ser bastante llamativo pero no debe confundirse con la eversión total. El manejo ideal es la escisión de la mucosa redundante. Las reducciones parciales pueden ser reducidas externamente pos abordaje trans-uretral. La eversión completa es confirmada por la visualización del fondo, cuerpo, trigono y orificios uretrales. Al igual que la paraquimosis, mientras mayor es la duración de la eversión, mayor es el edema y la dificultada para completar exitosamente la reducción. No se han descrito la estrangulación y necrosis de la vejiga (3).

Karolin y col. (5) analizaron diez casos de eversión vesical completa con o sin prolapso uterino total concurrente. Describieron dos mecanismos para la eversión en el prolapso vaginal, el primero es la ampliación del meato urinario, el cual puede producir el desplazamiento de la base de la vejiga y la uretra posterior del hueso púbico; el segundo es que el prolapso vaginal pueda causar obstrucción de la micción lo cual produce aumento de la presión, lo cual puede iniciar el proceso de eversión de la vejiga a través de la uretra o predisponer a la formación de fístulas (3). La evaluación de cuatro casos de eversión vesical junto con el prolapso vaginal total demostró que en todos los casos tenían factores uretrales predisponentes como el uso prolongado de catéteres uretrales, relaciones sexuales a través de la uretra e infecciones urinarias o locales cerca de la uretra (4).

Bhadari y col. (7) describieron un caso causado por la presencia de una caja metálica en la vagina por seis meses. La paciente presentó hidronefrosis bilateral sin insuficiencia renal y se corrigió por vía vaginal. Rao y col. (8) describieron un caso de prolapso masivo de la vejiga a través de una gran fístula vesicovaginal causado por un carcinoma de células escamosas de la vejiga. Extirparon la vejiga y se realizaron la ureterosigmoidostomía.

Tomlinson (9) reporto un caso en una embarazada posterior a un parto vaginal difícil. Inmediatamente antes del parto, se observó la eversión vesical a través de una fístula vesicovaginal en la línea media con lesión de la uretra proximal. El

prolapso vaginal fue reducido y la fístula fue reparada exitosamente por capas. El retraso en el tratamiento puede llevar a complicaciones graves como la insuficiencia renal. Algunos informes han mencionado la aparición de eversión transuretral que ocurre durante el parto (1). Junto en el presente caso, existen pocos reportes como complicación de fístula vesico vaginal (10).

La reducción transuretral externa parece ser el procedimiento más exitoso cuando se realice el diagnóstico en forma temprana y el edema es limitado. Si esta es exitosa, se debe colocar un catéter de Foley con un balón grande (3). Si se practica un abordaje supra-púbico, se puede realizar la tracción hacia la parte superior, el trigono debe ser cateterizado con sondas uretrales. Una vez que la vejiga es colocada en posición anatómica, se debe considerar la fijación de esta a los músculos psoas o a la pared abdominal anterior. Posterior se debe realizar la cirugía de corrección del prolapso de cualquier órgano pélvico para evitar una nueva eversión. Se recomienda la realización de la cistoscopia para confirmar las características normales de la vejiga y el paso de orina a través de los orificios uretrales (5).

En el presente caso se decidió realizar el abordaje combinado debido a que se consideró la fístula como compleja. La primera parte por vía abdominal intraperitoneal para la extirpación de los órganos pélvicos que provocaron el prolapso, para facilitar la corrección de la fístula por vía vaginal, y permitir la fijación de la vejiga a las estructuras abdominales y evitar que se produjera una nueva eversión y se fijó al epiplón como tejido de interposición. Luego la segunda parte fue la cirugía vaginal, en la cual se hizo el cierre de la cúpula vaginal y la corrección de la fístula. Esta técnica ya ha sido descrita y utilizada por Banerjee y col. (2).

Aunque la eversión vesical junto con el prolapso vesico-uterino no tiene un mecanismo obvio, la patología uretral y vesical representa un papel significativo en su aparición, junto con otros factores como el aumento de la presión intraabdominal, el envejecimiento y la multiparidad.

## Referencias

1. Acharya AM, Mishra DR. Complete eversion and prolapse of bladder following pulling out of a Foley catheter concurrent with uterine prolapse. *Indian J Urol.* 2007; 23: 474-5. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
2. Banerjee S, Fusey SS. Vesicovaginal fistula with bladder eversion: a rare complication of third degree cervical descent. *J Obstet Gynaecol Can.* 2006; 28: 160-1. [[PubMed](#)]
3. Mastropietro MA, Clark MH, Hale DS.. Transurethral bladder eversion concurrent with uterovaginal prolapse. *Obstet Gynecol.* 2002; 99(5 Pt 2):921-5. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
4. Kim YH, Sung DJ, Cho SB, Chung KB, Cha SH, Park HS, Um JW. Complete eversion and prolapse of bladder concurrent with primary adenocarcinoma. *Br J Radiol.* 2006;79: e8-11. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
5. Kalorin CM, Belarmino J, Mian B, De E. Complete eversion of the urinary bladder: presentation, review, and algorithm for management. *Obstet Gynecol.* 2009;113 (2 Pt 2):496-501. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
6. Nichols DH. Vaginal prolapse affecting bladder function. *Urol Clin North Am.* 1985; 12: 329-38. [[PubMed](#)]
7. Bhandari M, Kalla VK, Rao KL. Transvaginal inversion of urinary bladder after concealment of box in vagina. *Urology.* 1983; 21: 508-9. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
8. Mukherjee K, Goswami B. Complete inversion of the urinary bladder through a vesicovaginal fistula. *Int J Gynaecol Obstet.* 1980; 18: 255-7. [[PubMed](#)]
9. Tomlinson AJ, Watson AJ. Acutely inverted bladder through a vesicovaginal fistula: a complication of prolonged labour. *Br J Urol.* 1997;80: 154. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

**Como citar este artículo:**  
 Aragón-Charry J, Reyna-Villasmil E, Santos-Bolívar J. Eversión vesical completa a través de una fístula vesicovaginal. *Avan Biomed* 2013; 2: 104-7.

#### Instrucciones a los autores

Se aceptan solamente artículos inéditos relacionados con cualquier aspecto de las ciencias biomédicas. Todo trabajo que se desee publicar debe enviarse a la Revista utilizando el correo electrónico: [avanbiomed.idic@gmail.com](mailto:avanbiomed.idic@gmail.com), el mismo debe distribuirse en (4) archivos diferentes identificados de la siguiente manera:

- **Carta al Editor:** debe contener el nombre de todos los autores y sus respectivos correos electrónicos, título del trabajo, descripción corta del trabajo detallando el impacto de los resultados obtenidos, conflictos de interés, el tipo de artículo (Revisiones, estado actual del problema, Artículos originales, Casos clínicos, Cartas al editor, Comunicaciones rápidas o noveles) y el área (Ciencias Básicas ó Clínicas).
- **Manuscrito:** compuesto por el cuerpo del trabajo en el siguiente orden: primera página con el título, autores con sus direcciones institucionales, e información del autor de correspondencia; segunda con el resumen; tercera página con el resumen en inglés; cuarta página con el cuerpo del trabajo; referencias; y la última página con las leyendas de las figuras debidamente identificadas. El trabajo puede ser publicado en idioma Inglés o Español. Debe incluir los datos del autor de correspondencia: dirección completa, número telefónico, número de fax, y correo electrónico. El Resumen y Abstract debe ser entre 250 palabras, incluyendo un máximo de 10 palabras clave.
- **Tablas:** las cuales se enumeran según orden de aparición en números arábigos, en formato sencillo (sin color). Cada una de las tablas debe tener un título breve, y si es necesario aclaratorias se deben hacer como notas al pie de página de la misma. Las unidades de medidas y estadísticas deben ser debidamente identificadas.
- **Figuras:** en formato TIFF de 200 – 300 dpi en resolución CMYK (para impresión). Cada figura ocupa una página del archivo, y la leyenda de ellas deben estar contenidas en el manuscrito.

Los documentos y las tablas deben ser enviados como archivo WORD 2003 compatible (.DOC). Las figuras deben ser enviadas como archivo POWERPOINT 2003 (.PPT). En caso de utilizar figuras, fotos o tablas de una fuente externa, debe ir acompañada de la respectiva carta de autorización de uso.

Tipos de publicación y distribución:

- **Artículo Original:** la primera página debe incluir: Título, en español y en inglés (máximo 20 palabras), Autores con sus afiliaciones, título corto (máx. 55 caracteres) y la dirección del autor de correspondencia. Seguido del Resumen (250 palabras máx.) y palabras clave (máx. 10), Abstract (250 palabras máx.) y keywords (máx. 10), Introducción, Metodología, Resultados, Discusión, Agradecimientos, Referencias, y Leyenda de Figuras. Número máximo de palabras del manuscrito sin referencias: 5.000. En Metodología, debe incluir una cláusula de aprobación por el comité de ética correspondiente, cuando aplique. Máximo 5 figuras y/o fotos y 2 tablas.
- **Artículo de Revisión y "estado actual del problema":** la primera página debe incluir: Título, en español y en inglés (máximo 20 palabras), Autores con sus afiliaciones, título corto (máx. 55 caracteres) y la dirección del autor de correspondencia. Seguido del Resumen (250 palabras máx.) y palabras clave (máx. 10), Abstract (250 palabras máx.) y keywords (máx. 10), Manuscrito, Agradecimientos, Referencias, y Leyenda de Figuras. Número máximo de palabras del manuscrito sin referencias: 5.000. Máximo 5 figuras y/o fotos y 2 tablas.
- **Casos Clínicos:** la primera página debe incluir: Título, en español y en inglés (máximo 20 palabras), Autores con sus afiliaciones, título corto (máx. 55 caracteres) y la dirección del autor de correspondencia. Seguido del Resumen (250 palabras máx.) y palabras clave (máx. 10), Abstract (250 palabras máx.) y keywords (máx. 10), Introducción, Caso Clínico, Discusión, Reconocimiento, Referencias, Leyenda de Figuras. En Metodología, debe incluir una cláusula de aprobación por el comité de ética correspondiente. Número máximo de palabras del manuscrito sin referencias: 3.000. Máximo 2 figuras y/o fotos y 1 tabla Se aceptan fotos con edición de la cara del paciente (pixelado ó barra sobre los ojos).
- **Comunicaciones Rápidas:** la primera pagina debe incluir: Título en inglés y español (máx. 20 palabras), autores con sus afiliaciones, título

corto (máx. 55 caracteres) y la dirección del autor de correspondencia. Seguido del Resumen (150 palabras máx.) y palabras clave (máx. 5), Abstract (150 palabras máx.) y 5 keywords, Introducción, Metodología, Resultados, Discusión, Agradecimientos, Referencias, y Leyenda de las Figuras. Los resultados y discusión pueden combinarse. Número máximo de palabras del cuerpo del manuscrito que incluye: Resumen o abstract, Introducción, Metodología, Resultados, Discusión y Agradecimientos, es de 2.500. En Metodología, debe incluir una cláusula de aprobación por el comité de ética correspondiente. Máximo 3 figuras y/o fotos y 1 tablas.

- **Cartas al editor** manuscrito de máximo 1.000 palabras y sus referencias.

#### Referencias:

Las referencias bibliográficas se citan de acuerdo a orden de aparición utilizando números Arábigos entre Paréntesis, por ejemplo: (1). A la hora de escribir la referencia se utiliza el formato Vancouver tomando en consideración que se deben incluir todos los autores, y el nombre de la revista debe ser abreviado acorde con el sistema adoptado por el Index Medicus, según los ejemplos anexos:

#### Revistas:

1. Petteersen FO, Torheim EA, Dahm AE, Aaberge IS, Lind A, Holm M. An exploratory trial of cyclooxygenase type 2 inhibitor in HIV-1 infection. *J Virol* 2011; 85:6557-66.

#### Libros:

2. Berrueta L, Goncalves L, Salmen S. Respuesta inmune frente a virus, 1era Ed. Mérida: CODEPRE-ULA, 2005.

#### Sitio web:

3. McCook A. Pre-diabetic condition linked to memory loss [internet]. 2010 [cited 2010 Apr 14]. Available from: <http://prevent.com/ns.htm>.

#### Declaración de los autores y transferencia de derechos

Los autores de un manuscrito aceptado para publicación en la revista deben descargar el formato Word de la **declaración de la autoría** y la **transferencia de derechos de autor**. Los autores del manuscrito deben firmar el documento confirmando la originalidad del mismo, la participación de cada uno de los autores firmantes, las condiciones éticas del trabajo, financiamiento, y que no ha sido publicado en otra revista. En el caso de la transferencia de derechos de autor, el autor de correspondencia, en nombre de todos los autores, firma el formulario de transferencia de derechos de autor Los documentos deben ser llenados, firmados y enviados por correo electrónico a la revista: [avanbiomed.idic@ula.ve](mailto:avanbiomed.idic@ula.ve) ó [avanbiomed.idic@gmail.com](mailto:avanbiomed.idic@gmail.com).

#### Sistema de arbitraje

Todos los trabajos sometidos a la Revista son enviados a arbitraje, siempre y cuando cumpla con las normas editoriales mínimas, por lo que en una primera fase los manuscritos serán revisados por el comité editorial a fin de determinar si esta dentro del alcance de la revista y cumple con las normativas de la revista. Una vez aprobado por el comité editorial será enviado a revisores externos, con experticia en el área, quienes determinarán de manera anónima, si el manuscrito es: 1) aceptado sin correcciones, 2) aceptable con correcciones menores, 3) aceptable con correcciones mayores y amerita nueva evaluación por el revisor o 4) rechazado. El arbitraje para los Trabajos Originales, Revisiones, Reporte de Casos Clínicos y Comunicaciones Rápidas es realizado por al menos dos (2) expertos en el área. Los árbitros tienen un plazo de tiempo no mayor a 15 (quince) días hábiles para enviar su respuesta. Si las opiniones de dos de los árbitros coinciden, el Comité Editorial puede aceptar la respuesta de dos árbitros; en caso de discrepancia se pueden consultar árbitros adicionales. Las opiniones de los árbitros, así como la autoría de los trabajos, son estrictamente confidenciales. Los autores reciben las opiniones completas de los árbitros consultados. La Revista da un plazo no mayor a dos (2) meses a los autores, para responder punto por punto las opiniones de los árbitros y realizar las modificaciones sugeridas; estas últimas deben ser resaltadas en el texto a fin de facilitar la evaluación de los revisores. Si éstos toman más tiempo del estipulado el trabajo es rechazado o considerado como nuevo.

### Instructions for authors

The Journal will only allow original articles to be published, which have to relate with any aspect of biomedical sciences. Every research that wishes to be published first has to be sent to the magazine using the following email: [avanbiomed.idic@gmail.com](mailto:avanbiomed.idic@gmail.com); the work has to be distributed in four (4) different files, as follow:

- **Letter to the editor:** should provide authors name and email, manuscript title, short description of the article highlighting the obtained results, main points, kind of article (Review articles and state of the art, original articles, case reports, letters to the editor, Short communications, novel) and the area of research (Basics or Clinical Science)
- **Manuscript:** composed by the body work in the following order: first page with the title, authors with their institutional directions and information of correspondence of the author; second page with the abstract; third page with the abstract in Spanish, fourth page with the body work; references; and the last page with the figure legends properly identified. The article can be published in English as well as in Spanish. It must include the information of the corresponding author: complete address, phone number, fax number and email. The abstract and the Spanish abstract must have 250 words, including up to 10 keywords.
- **Tables:** which are numerated according to order of apparition in Arabic numbers, in simple layout (without color). Each one of the tables must have a proper, and if it's necessary, any commentaries must be added as a foot note of the same page. The measurement units and statistics have to be properly identified.
- **Figures:** in layout TIFF of 200 – 300 dpi on CMYK resolution (for printing). Each figure occupies one page of the file, and the legend of this must contained the manuscript.

The documents and the tables have to be sent as a file WORD 2003 compatible (.DOC). The figures must be sent as a file POWERPOINT 2003 (.PPT). In case of using figures, pictures or tables of a external source, must be accompanied by the authorization letter of use.

Types of publication and distribution:

- **Original article:** the first page should include the title in English and Spanish (not to exceed 20 words), the running title (not to exceed 54 characters), the name of each author, each author's affiliation and the correspondence authors, Abstract in English and Spanish and keywords (max 10), Introduction, Methodology, Results and Figure legends. Manuscript maximum number of words without references: 5.000. In Methodology, it must include an approbation clause for the committee of correspondent ethic when it applies. Figures or pictures: Up to 5. Table: 3.
- **Review articles and state of the art:** the first page should include the title in English and Spanish (not to exceed 20 words), the running title (not to exceed 54 characters), the name of each author, each author's affiliation and the correspondence authors, Abstract in English and Spanish and keywords (max 10), Manuscript, Summary, Acknowledgments, References and Figures legend. Manuscript maximum words without references: 5.000. Maximum of 5 figures and pictures and 2 tables.
- **Case reports:** the first page should include the title in English and Spanish (not to exceed 20 words), the running title (not to exceed 54 characters), the name of each author, each author's affiliation and the correspondence authors, Abstract in English and Spanish and keywords (max 10), Introduction; Clinic case, Discussion, Acknowledgment, References; Figure legends. The Methodology, most include the approbation clause from the correspondent ethic committee. The Manuscript maximum word numbers without references: 3.000. Maximum of 2 figures and pictures and 1 table. Pictures of the patient with face edition will be accepted (pixed or with black bars covering the eyes).
- **Short communications:** the first page should include the title in English and Spanish (not to exceed 20 words), the running title (not to exceed 54 characters), the name of each author, each author's affiliation and the correspondence authors, Abstract in English and Spanish and keywords (max 10), Introduction, Results, Discussion;

Methodology, Acknowledgement, References and Figure Legends. The Manuscript maximum word numbers without references: 2.500. The Methodology must include an approbation clause from the correspondent ethic committee. Up to 3 figures or pictures and one table.

- **Letters to the editor** Manuscript maximum words: 1.000; and references.

#### References:

The Bibliographic references will be cited in order of apparition using Arabic numbers between parenthesis, for example: (1). The writing style should be according to the Vancouver Format having in consideration that it must include every author. The journal name should be abbreviated according to the system adopted by Index Medicus. For example

#### Journals:

1. Pettersen FO, Torheim EA, Dahm AE, Aaberge IS, Lind A, Holm M. An exploratory trial of cyclooxygenase type 2 inhibitor in HIV-1 infection. *J Virol* 2011; 85:6557-66.

#### Books:

2. Berrueta L, Goncalves L, Salmen S. Respuesta inmune frente a virus, 1era Ed. Mérida: CODEPRE-ULA, 2005.

#### Web site:

3. McCook A. Pre-diabetic condition linked to memory loss [internet]. 2010 [cited 2010 Apr 14]. Available from: <http://prevnt.com/ns.htm>.

### Author's declaration and Copyright transfer

The authors of a accepted manuscript for publication in this journal must access to the following links **Author's declaration** and **copyright transfer** to download the Word format. All authors must sign the author's declaration to confirm its originality, their participation in the elaboration process, the ethic conditions of the work, financing, and that it hasn't been published elsewhere. The copyright transfer must be signed for the correspondent author. The documents must be filled, signed and sent to the journal via email: [avanbiomed.idic@ula.ve](mailto:avanbiomed.idic@ula.ve) or [avanbiomed.idic@gmail.com](mailto:avanbiomed.idic@gmail.com).

### Arbitrage system

Every article that wishes to be published in the journal must be sent by the arbitrage and has to have the minimum editorial requirement, so that in a first phase, the manuscripts will be reviewed by the editorial committee to establish if is within the scope and fulfills with the standards of the journal. Once approved by the editorial board, the manuscript will be sent to external reviewers with expertise in the area, who anonymously determine if the manuscript is: 1) accepted without corrections, 2) acceptable with minor corrections, 3) acceptable with major corrections and warrants further evaluation by the reviewer or 4) rejected. Arbitration to the original papers, reviews, reports of clinical cases and rapid communication is performed by at least two (2) experts in the area. The arbitrage for the Original Article, Revisions for the clinical cases and fast communications will be done by at least 2 experts in the area. The arbiters will have a period of time of 15 working days to send their response. If the opinions of two of them matches, the Committee Editorial may accept the response of two arbitrators, in case of discrepancy, it may need to consult additional referees. The opinions of the referees and authorship of the work are strictly confidential. The authors will receive full views of the referees consulted. The journal will provide two (2) months for the authors to reply to the referees acknowledgement and make the suggested changes, that must be highlighted on the text in order to facilitate the assessment of the reviewers. If they take longer than stated, the work will be rejected or considered new.

Avances en Biomedicina se asegurará de que los editores, revisores y autores sigan rigurosamente las normas éticas internacionales durante el proceso de arbitraje y publicación.

Avances en Biomedicina sigue el Código de normas de conductas éticas: [Code of Conduct | Committee on Publication Ethics: COPE](#) publicado por el Comité de Ética para las Publicaciones científicas.

Todos los trabajos que no estén acordes con estas normas, y si se revela mala praxis en cualquier momento, incluso después de la publicación, serán eliminados de la revista. Los manuscritos sometidos a Avances en Biomedicina serán sometidos a un proceso de revisión por pares doble ciego y de verificación por plagio, fabricación de resultados, falsificación (manipulación de los datos existentes de investigación, tablas o imágenes) y la utilización indebida de personas o animales en la investigación. Avances en Biomedicina se reserva el derecho a utilizar en cualquier fase del proceso de publicación software de detección de plagio para evaluar los documentos sometidos y publicados.

De conformidad con estas normas:

**Los editores deben:** 1) Utilizar métodos de revisión por pares que mejor se adapte a la revista y la comunidad de investigación. 2) Asegurarse de que todos los manuscritos publicados han sido revisados por evaluadores calificados. 3) Alentar la originalidad de las propuestas y estar atentos a la publicación redundante y plagios. 4) Asegúrese de seleccionar revisores apropiados. 5) Alentar a los revisores que comentan sobre las cuestiones éticas y la posible mala conducta de investigación planteado por las presentaciones. 6) Publicar instrucciones a los autores claras. 7) Fomentar un comportamiento responsable y desalentar la mala praxis.

**Los autores deben:** 1) Plantearse trabajos conducidos de una manera ética y responsable, y debe cumplir con todas las normativas

vigentes. 2) Presentar sus resultados de forma clara, honesta y sin falsificación o manipulación. 3) Describir los métodos de manera clara para que sus resultados pueden ser reproducidos por otros investigadores. 4) Cumplir con el requisito de que el trabajo presentado es original, no es plagiado, y no ha sido publicado en otra revista. 5) Asumir la responsabilidad colectiva de los trabajos presentados y publicados. 6) Divulgar las fuentes de financiación y los conflictos de interés pertinentes cuando existe.

**Los revisores deben:** 1) Informar a los editores de la posible mentira, la falsificación, la mala praxis o la manipulación inapropiada de los resultados. 2) Argumentar con precisión las razones por las cuales se rechazó un manuscrito. 3) Cumplir con los tiempos acordados para la entrega de las revisiones. 4) Llevar a cabo revisiones objetiva, evitando críticas personales al autor. 5) Identificar y proponer las publicaciones clave de la investigación no citados por los autores.

## Publication Ethics & Malpractice Statement

Advances in Biomedicine will ensure that editors, reviewers and authors strictly follow international ethical standards during the peer-reviewed and publication process.

Advances in Biomedicine follows the code of ethical conduct rules: [Code of Conduct | Committee on Publication Ethics: COPE](#): published by the Ethics Committee for Scientific Publications.

All work not in accordance with these rules, and if malpractice is revealed at any time, even after the publication will be removed from the journal. Manuscripts submitted to Advances in Biomedicine will undergo a double-blind peer review process, check for plagiarism, fabrication of results, falsification (manipulating existing research data, tables or pictures) and misuse of people or animals in research. Advances in Biomedicine reserves the right to use at any stage of the publishing process software to detect plagiarism.

In accordance with these rules:

**Editors must:** 1) Using peer review methods best suited to the journal and the research community. 2) Ensure that all manuscripts are revised by qualified and appropriate reviewers. 3) Encourage the originality of the proposals and be aware of plagiarism and redundant publication. 4) Encourage reviewers to comment on the ethical issues and possible research misconduct raised by the presentations. 5) Publish clear instructions for authors. 7) Encourage responsible behavior and discourage malpractice.

**Authors must:** 1) Conducted work with ethical and responsibility, and shall comply with all regulations. 2) Present results clearly, honestly and without falsification or manipulation. 3) Describe the methods clearly so that their results can be reproduced by other researchers.

4) Meet the requirement that the work submitted is original, not plagiarized, and has not been published in another journal. 5) Assume collective responsibility of the papers presented and published. 6) Disclose the sources of funding and conflicts of interest relevant when there.

**Reviewers must:** 1) Inform the editors of the possible fabrication, falsification, malpractice or improper handling of the results. 2) Arguing precisely why a manuscript was rejected. 3) Comply with the agreed time for delivery of reviews. 4) Undertake reviews objective, avoiding personal criticism to the author. 5) Identify and propose key research publications not cited by the authors.



Avances en Biomedicina  
Publicación Oficial del Instituto de Inmunología Clínica  
Mérida-Venezuela  
Volumen 2(2), May-Ago 2013  
Copyright: © ULA 2013  
Depósito Legal: PPI201102ME3935  
ISSN: 2244-7881

Depósito Legal: PPI201102ME3935

ISSN: 2244-7881

Repositorio Institucional de la Universidad de Los Andes

URL: <http://erevistas.saber.ula.ve/biomedicina>



## Tabla de contenido

### EDITORIAL

#### 50-52 **Crisis financiera y educación universitaria**

Jesús Alfonso Osuna C.

### ARTÍCULOS ORIGINALES

#### 53-59 **Expresión y purificación del antígeno preS1/2 y su utilidad en el estudio de la patogenicidad de la infección por el virus de la hepatitis B**

*Expression and purification of preS1/2 antigen and its usefulness in the hepatitis B virus pathogenesis study*

*Masyelly Rojas, Juan Camilo Valencia-Molina, Daniela Montes-Berrueta, Gery Rosmary Ruiz-Carrillo, Leidith Berrueta-Carrillo, Darrell L Peterson, Lisbeth Berrueta, Siham Salmen*

#### 60-67 **Frecuencia cardíaca y movimientos fetales posterior a la administración de betametasona para maduración pulmonar fetal**

*Fetal heart rate and movements after betamethasone administration for fetal lung maturity*

*Yolima Ruiz-Lopez, Keibis Jiménez-Castillejo, Eduardo-Reyna Villasmil, Duly Torres-Cepeda, Joel Santos-Bolivar, Jhoan Aragon-Charris, Jorly Mejia-Montilla, Nadia Reyna-Villasmil*

#### 68-75 **Acoplamiento molecular y actividad antibacteriana de las tioureas (R,R)-N,N'-bis(1-ciclohexiletil)tiourea y (R,R)-N,N'-bis(1-feniletil)tiourea.**

*Molecular docking and antibacterial activity thioureas (R,R)-N,N'-bis(1-cyclohexylethyl)thiourea and (R,R)-N,N'-bis(1-phenylethyl)thiourea*

*Fabian Martínez-Flores, José Jaime Vázquez-Bravo, Juan Saulo González-González, Julio Hernández-Rosas, Veronica Castro-Bear, Oscar Zuñiga-Lemus*

### REVISIONES Y ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

#### 76-99 **Tipos de diseños de los estudios clínicos y epidemiológicos**

*Types of clinical and epidemiologic study designs*

*José H Donis H*

### CASOS CLÍNICOS

#### 100-103 **Tumor sólido pseudopapilar de páncreas. Presentación de un caso reportado en Hospital Universitario de Los Andes, Mérida-Venezuela**

*Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas. A report in the Hospital Universitario de Los Andes, Mérida-Venezuela*

*Naisbet Ortega-Vásquez, Melisse Milano, Ana Valentina Rojas-Esquerre, Estrella Uzategui, Carlos Gonzalez-Torres, Pierina Petrosino-Tepedino, Asmiria De Sotolongo, Elymar Barreto, Julio Tabares*

#### 104-107 **Eversión vesical completa a través de una fístula vesicovaginal**



Avances en Biomedicina  
Publicación Oficial del Instituto de Inmunología Clínica  
Mérida-Venezuela  
Volumen 2(2), May-Ago 2013  
Copyright: © ULA 2013  
Depósito Legal: PPI201102ME3935  
ISSN: 2244-7881

*Complete bladder eversion through vesicovaginal fistul  
Jhoan Aragón-Charry, Eduardo Reyna-Villasmil, Joel Santos-Bolíva.*

- 108 **INSTRUCCIONES A LOS AUTORES**
- 109 **INSTRUCTIONS FOR AUTHORS**
- 110-111 **ÉTICA DE LAS PUBLICACIONES & DECLARACIÓN DE MALA PRAXIS/ PUBLICATION ETHICS & MALPRACTICE STATEMENT**