



INVESTIGACIÓN ORIGINAL

EXACTITUD DE LA ACTIVIDAD DE LA TELOMERASA PARA EL DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN MUJERES CON PATOLOGÍA CERVICAL EN ARMENIA, COLOMBIA, 2007

The accuracy of telomerase activity for diagnosing
human papilloma virus in females having cervical
pathology in Armenia, Colombia, 2007

*Bayron Manuel Ruiz-Hoyos, MD, MSc¹, Nelsy Loango-Chamorro, Lic. MSc²,
Patricia Landázuri, MSc, PhD³*

Recibido: marzo 6/12 – Aceptado: septiembre 24/12

RESUMEN

Introducción: el cáncer de cérvix es un problema mundial de salud pública, con cerca de 500.000 casos diagnosticados anualmente, 68.000 de ellos en América Latina. En Colombia es la neoplasia maligna ginecológica más mortal y la segunda en incidencia después del cáncer de mama. La tasa de falsos negativos de la citología de cérvix es de 20-40%, lo que explica los casos presentes en la población oportunamente tamizada; la tipificación del virus del papiloma humano (VPH) y la actividad de la telomerasa son estudios promisorios en el diagnóstico temprano.

Objetivo: determinar la exactitud de la actividad de telomerasa al compararla con la PCR para el VPH 16 o 18 en cérvix de mujeres con patología cervical.

Materiales y métodos: estudio de exactitud diagnóstica ensablado en un corte transversal, en 102 mujeres con sospecha de patología cervical que consultaron al Centro de Salud de primer nivel de atención de la Universidad del Quindío en 2007. Se evaluó la sensibilidad y especificidad de la telomerasa y la sensibilidad y especificidad de la PCR del VPH para lesión preneoplásica del cérvix.

Resultados: la prevalencia de VPH 16 y 18 fue del 23,5 y 29% respectivamente. La sensibilidad de la telomerasa para el virus 16 fue del 93% con una especificidad del 39%. La sensibilidad de la telomerasa para el virus 18 fue del 96% con una especificidad del 37%.

Conclusiones: la telomerasa surge como una prueba diagnóstica promisoriosa para la detección de los virus VPH 16 y 18.

Palabras clave: citología, papilomavirus, telomerasa.

¹ Grupo de Estudio en Parasitología Molecular. Ginecoobstetra. Magíster en Educación. Docente Programa de Medicina, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. bruiz58@yahoo.com.mx

² Grupo de Investigación en Enfermedades Cardiovasculares y Metabólicas. Licenciada en Biología. Magíster en Ciencias Biomédicas. Docente Programa de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. neloango@uniquindio.edu.co

³ Grupo de Investigación en Enfermedades Cardiovasculares y Metabólicas. Doctora en Biología. Docente Programa de Medicina, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. plandazu@uniquindio.edu.co

ABSTRACT

Introduction: Cervical cancer is a worldwide public health problem, around 500,000 cases being diagnosed annually (68,000 in Latin-America). It is the most mortal malign gynaecological neoplasia in Colombia and is the second in terms of incidence after breast cancer. The rate of false negatives for cervical cytology is 20-40%, thereby explaining the cases present in the population undergoing early screening; human papilloma virus (HPV) typing telomerase activity represents a promising study regarding early diagnosis.

Objective: Determining the accuracy of telomerase activity by comparing it to PCR for HPV 16 or 18 in the cervix of females having cervical pathology.

Materials and methods: This was a diagnostic test design accuracy study assembled using a cross-sectional involving 102 women suspected of having cervical pathology who had consulted the Universidad del Quindío first level Health Centre during 2007. Telomerase sensitivity and specificity were evaluated, as was PCR sensitivity and specificity for HPV for cervical pre-neoplastic lesions.

Results: HPV 16 prevalence was 23.5% and 29% for HPV 18. Telomerase sensitivity was 93% for HPV 16 (39% specificity) and 96% for HPV 18 (37% specificity).

Conclusions: Telomerase was seen to be a promising diagnostic test for detecting HPV 16 and 18.

Key words: Cytology, papillomavirus, telomerase.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de cérvix es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, y en Colombia es la neoplasia maligna ginecológica de mayor mortalidad y la segunda en incidencia después del cáncer de mama (1). No obstante la disponibilidad de la citología del cuello uterino para la detección del cáncer de cérvix como un método sensible, específico, económico, no invasivo y de fácil realización (2), sigue siendo alta la morbimortalidad por la enfermedad (3), por lo que actualmente se indaga

por la utilidad de marcadores complementarios a la citología, de los cuales el más utilizado es la tipificación del virus del papiloma humano (VPH) (4, 5) por la relación causal entre los diversos tipos del VPH y el cáncer de cérvix, confirmada en varios estudios (6-8). La evidencia muestra que los tipos 16 y 18 son los más relacionados con la lesión cervical preneoplásica o el cáncer, y que estos tipos se encuentran en el 70% de los casos (2, 9).

Uno de los mecanismos por los cuales el VPH genera alteraciones preneoplásicas y cáncer de cuello uterino es la inducción de la actividad de telomerasa (6, 9, 10), razón por la cual también se ha propuesto la determinación de la actividad de la enzima en lesiones intraepiteliales cervicales y cánceres invasivos como método de detección y seguimiento de dichas lesiones (9, 11). La telomerasa es una ADN polimerasa que facilita la estabilidad de los telómeros (porciones terminales de los cromosomas), evitando la apoptosis y promoviendo la inmortalización celular (12), se ha encontrado relación directa entre la expresión de la actividad de la telomerasa y la severidad de la lesión cervical (9). En nuestro país no se han publicado estudios sobre el particular. El objetivo de este estudio es investigar la exactitud de la tipificación del VPH y la actividad de telomerasa, asociadas, en el tamizaje de lesiones precancerosas del cérvix en mujeres del Quindío.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio de exactitud diagnóstica ensamblado en una investigación de corte transversal. Se incluyeron mujeres remitidas para consulta de patología cervical con indicación de colposcopia de acuerdo con el criterio del médico remitente, que consultaron en el periodo enero-diciembre de 2007 al Centro de Salud de primer nivel de la Universidad del Quindío, el cual atiende pacientes de régimen contributivo, subsidiado y estudiantes universitarios. Se realizó un muestreo consecutivo incluyendo todas las usuarias que aceptaron voluntariamente participar en el estudio y que firmaron el consentimiento informado. A partir de un universo de

204.602 mujeres susceptibles de toma de citología en el Quindío, de un 3% esperado de reportes de citología anormal (6.138 mujeres), una prevalencia de 60% de resultados positivos de lesión cervical confirmados por anatomía patológica, se calculó una muestra de 155 mujeres.

Procedimiento

Previo sensibilización del personal de salud de los hospitales municipales y de la Secretaría de Salud de Armenia sobre los objetivos y las expectativas del estudio, se solicitó que las pacientes con resultados anormales de citología fueran remitidas con indicación de colposcopia al Centro de Salud de la Universidad.

A cada paciente se le realizó colposcopia según el protocolo de la Federación Internacional de Colposcopia y Patología Cervical (13), posteriormente se tomó muestra de raspado exo y endocervical con citocepillo, biopsia de cérvix con equipo de radiofrecuencia y de endocérvix con cureta de Novak. Las muestras fueron enviadas el mismo día al laboratorio de Bioquímica y Genética de la Universidad, donde se almacenaron en congelación hasta su procesamiento.

Las muestras fueron sometidas a los siguientes procedimientos:

a) *Aislamiento de ADN*: la extracción de ADN se hizo utilizando el estuche comercial Wizard Genomics (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante.

b) *Ensayo para establecer la longitud telomérica*: 2,5 μ g ADN por muestra, los fragmentos de ADN se resolvieron en un gel de agarosa al 0,8%. El gel se corrió a 20 V por 25 horas. Southern Blotting: con membrana de nylon cargada positivamente con buffer alcalino NaOH. Hibridización: con sonda telomérica marcada con digoxigenina se realizó la detección por quimioluminiscencia con lumiphos 530. Cálculo de la longitud telomérica: se estimó como el cálculo de la longitud telomérica promedio; se midió el grado de acortamiento y la señal de intensidad telomérica a partir del análisis

densitométrico. Actividad telomerasa: se utilizó el método "TRAP" (Telomere Repeat Amplification Protocol) con un kit comercial (Eliza Telomerase Detection Kit ARC Químicos). Se estableció un punto de corte de 20 TPG (Total de Productos Generados): un valor ≥ 20 fue interpretado como positivo, y un valor < 20 como negativo.

c) *Detección del virus del papiloma humano tipos 16 y 18*: detección específica de los VPH tipos 16 y 18 (120 y 172 pb, respectivamente) por PCR, con cebadores específicos para las regiones E6 y E7.

d) *Procesamiento de los especímenes de patología*: las muestras fueron fijadas en formol buferado al 10%, deshidratadas con alcoholes, aclaradas con xiloles, e incluidas en parafina, cortadas a espesor de 3 micras y coloreadas con hematoxilina-eosina para ser observadas en microscopio de luz.

Cada paciente fue citada para entrega y explicación de resultados por parte del ginecoobstetra investigador; a las que lo ameritaron, por resultados compatibles con lesión de alto grado, se les remitió al Hospital Departamental Universitario de tercer nivel San Juan de Dios de Armenia, a consulta de oncología ginecológica.

Se midieron las siguientes variables: edad, actividad de telomerasa (alta o baja), tipificación de VPH 16 y 18; los resultados de las citologías incluidas y de la biopsia endocervical y exocervical, los cuales se agruparon en lesiones de alto grado frente a lesiones de bajo grado y resultado normal. Se analizó la prevalencia de los tipos de VPH, la distribución de frecuencias para los resultados de citología y la patología, y se hizo una comparación entre resultados de la actividad de telomerasa con los resultados de la tipificación del VPH, y los de la tipificación del VPH con los resultados de la biopsia de cuello uterino. Se calculó la sensibilidad y la especificidad de la telomerasa y el VPH para lesión epitelial. El manejo de información y análisis estadístico se hizo con el programa SPSS.

Aspectos bioéticos. El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad Ciencias de la Salud de la Universidad del Quindío. Todas

las participantes diligenciaron de manera voluntaria un consentimiento informado y una encuesta demográfica básica. Se explicaron las implicaciones del resultado a las pacientes que presentaron lesiones intraepiteliales de alto grado, se discutieron con ellas las alternativas de tratamiento y se dio el manejo pertinente acordado de manera conjunta, remitiendo las que lo ameritaron al nivel superior, en forma oportuna.

RESULTADOS

Se incluyeron 102 mujeres con edad promedio de 36 años (rango 17-71). La prevalencia de VPH 16 fue del 23,5% (24/102) y de VPH 18 fue del 29% (30/102); 13 pacientes tuvieron ambos virus (12,7%). Exceptuando un diagnóstico de lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG), los

resultados de las muestras de endocérnix fueron negativos para patología cervical. Todas las muestras de endocérnix presentaron actividad de telomerasa, el 70,6% de las mujeres tenía actividad de telomerasa elevada en la muestra de endocérnix tomada con cureta, y 43,1% en la muestra tomada con citocepillo.

La LEIBG fue la más frecuentemente diagnosticada (54%). La prevalencia de lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG) fue del 19%; la prevalencia de los diferentes resultados de la citología y la patología se muestra en la tabla 1.

La evaluación de desempeño operativo de la actividad de telomerasa en las muestras de endocérnix en comparación con la tipificación del VPH por PCR evidenció una sensibilidad de 0,93 para telomerasa y VPH 18, y de 0,96 para el VPH 16 (tablas 2 y 3).

Tabla 1.
Relación resultado de citología / biopsia de exocérnix

Citología	Resultado de biopsia exocervical						Prevalencia
	Normal	Cervicitis	LEIBAG	LEI AG	CA <i>in situ</i>	Total	
Normal*	0	3	2	1	0	6	0,06
ASC-H	0	1	1	0	0	2	0,02
ASC-US	7	8	17	1	2	35	0,34
AGUS	0	0	2	0	0	2	0,02
LEIBG	1	5	32	5	1	44	0,43
LEIAG	1	0	2	5	5	13	0,13
Total	9	17	56	12	8	102	

* Seis pacientes fueron remitidas a colposcopia con resultado de citología negativo para lesión epitelial, sin embargo, en respeto al criterio médico de remisión fueron incluidas en el estudio.

Tabla 2.
Características operativas de la actividad de telomerasa para el VPH 18

PVH 18	(+)	(-)	Total
Telomerasa \geq 20 TPG	28	44	72
Telomerasa $<$ 20 TPG	2	28	30
Total	30	72	102

Sensibilidad: 0,93.
Especificidad: 0,39.

Tabla 3.
Características operativas de la actividad de telomerasa para el VPH 16

VPH 16	(+)	(-)	Total
Telomerasa \geq 20 TPG	23	49	72
Telomerasa $<$ 20 TPG	1	29	30
Total	30	78	102

Sensibilidad: 0,96.

Especificidad: 0,37.

La evaluación de la tipificación del virus VPH 18 o 16, al compararlo con los reportes agrupados de biopsia, mostró una sensibilidad del 45% y una especificidad de 74% para VPH 18, y una sensibilidad del 45% y especificidad del 81% para VPH 16 (tablas 4 y 5). Cuando se tomaron los resultados del VPH en paralelo (VPH 16 o 18) se encontró una sensibilidad del 63% y una especificidad del 65% (tabla 6).

DISCUSIÓN

En este estudio se determinó la actividad de telomerasa y se tipificó el VPH 16 y VPH 18 en muestras de mujeres con sospecha de patología cervical. El estudio mostró la presencia de VPH 16 en 23,5% y VPH 18 en 29% de las mujeres estudiadas. Nuestros resultados muestran una prevalencia para el VPH 16 inferior a la descrita en la literatura, para el VPH 18 fue similar a la encontrada por Junior *et al.* (14); sin embargo, otros autores describen prevalencias de VPH 18 menores a las descritas en la presente investigación (15, 16); todos los estudios coinciden en la presencia de estos y otros genotipos infecciosos en relación con lesiones precancerosas y cancerosas, lo cual es también demostrado por nuestros resultados (17). Por otra parte, la relación entre la presencia del VPH 16 o 18 con la actividad de telomerasa en las muestras de endocérnix mostró que el virus de alto riesgo se relaciona con mayor actividad de esta enzima (10); esta relación también ha sido demostrada experimentalmente en varios estudios en los que se describe que las oncoproteínas expresadas por los genes del VPH activan la expresión de la telomerasa (18, 19).

El estudio evidenció diferente actividad de telomerasa entre los dos tipos de muestras usadas, siendo mayor en las muestras de endocérnix tomadas con cureta que en las muestras tomadas con citocepillo; además de ser el primer informe para Colombia al respecto, este hallazgo refleja una diferencia que puede obedecer a una mejor calidad de la muestra tomada con cureta, relacionada con el número de células recogidas. Sin embargo, la diferencia en la calidad de la muestra de endocérnix obtenida con citocepillo respecto a la obtenida con cureta—a favor de esta última— es un reto para la posibilidad de considerar el estudio de la telomerasa como parte del tamizaje inicial, ya que implicaría tomar biopsia de endocérnix con cureta para garantizar un espécimen adecuado, aumentando los costos y las molestias a las usuarias. Aunque algunos estudios plantean la posibilidad de usar la actividad de telomerasa como apoyo en el proceso de tamizaje (11, 20), y demuestran actividad de telomerasa elevada en lesiones por VPH 16 y 18 (20), en nuestro estudio a pesar de tener una alta sensibilidad, la especificidad fue baja. Se requerirá validar estas observaciones en una nueva muestra de pacientes como marcador inicial de la infección por el virus.

Los resultados de las características operativas de la tipificación del VPH 16 o 18 para el diagnóstico de lesión intraepitelial de alto grado son acordes con la literatura, la cual establece una relación entre los tipos 16 y 18 con los cánceres del tracto reproductivo femenino (2, 9), más específicamente el VPH 16 (21, 22), confirmando que la tipificación del VPH de alto riesgo es un importante coadyuvante en la toma de conducta clínica en mujeres

Tabla 4.
Características operativas del VPH 18 para lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG) en muestras de biopsia de cérvix

VPH 18	LEIAG CA <i>in situ</i>	Normal LEIBG	Total
VPH 18 (+)	9	21	30
VPH 18 (-)	11	61	72
Total	20	82	102

Sensibilidad: 0,45.
Especificidad: 0,74.

Tabla 5.
Características operativas del VPH 16 para lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG) en muestras de biopsia de cérvix

VPH 16	LEIAG CA <i>in situ</i>	Normal LEIBG	Total
VPH 16 (+)	9	15	24
VPH 16 (-)	11	67	78
Total	20	82	102

Sensibilidad: 0,45.
Especificidad: 0,81.

Tabla 6.
Características operativas del VPH 18 o VPH 16 para lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG) en muestras de biopsia de cérvix

VPH 16 y 18	LEIAG CA <i>in situ</i>	Normal LEIBG	Total
VPH 16 o 18 (+)	12	29	41
VPH 16 o 18 (-)	7	54	61
Total	19	83	102

Sensibilidad: 0,63.
Especificidad: 0,65.

con citología anormal, principalmente en casos de atipias de significado indeterminado (ASCUS).

Nuestro hallazgo respecto al alto número de resultados de biopsia con reporte de LEIBG en las muestras de pacientes con citología de ingreso reportada como ASCUS (48,5% en el estudio) no está acorde con la literatura, que describe cifras de 24% (23), lo cual podría corresponder a una lectura

errónea de las muestras de citología que generan un inusual número de reportes de ASCUS, las cuales realmente debieron ser informadas como LEIBG.

Publicaciones recientes (24) reafirman el papel de la medición de la actividad de telomerasa en la detección temprana y monitorización de las lesiones cancerosas en general, y del cáncer de cuello uterino en particular.

CONCLUSIONES

La telomerasa surge como una prueba de utilidad en la detección de la infección por VPH, hallazgo que deberá ser validado con nuevos estudios con mayor tamaño de la muestra.

Agradecimientos. Los autores manifiestan su profundo agradecimiento al personal del Centro de Salud de la Universidad del Quindío por la colaboración en la captación, orientación y atención de las pacientes; al Instituto Seccional de Salud del Quindío por el apoyo económico para los reactivos y la remisión de las pacientes desde los diferentes centros de atención; a la doctora Ángela Liliana Londoño por su asesoría en el manejo de la información, y al personal del Laboratorio de Bioquímica y Genética de la Universidad del Quindío, por su diligencia en el procesamiento de las muestras.

REFERENCIAS

1. Ortiz R, Uribe CJ, Díaz LA, Dangond YR. Factores de riesgo para cáncer de cuello uterino. *Rev Colomb Obstet Ginecol* 2004;55:146-60.
2. Meijer CJLM, Walboomers JMM. Cervical Cytology after 2000: where to go? *J Clin Pathol* 2005;53:41-3.
3. Russell J, Crothers BA, Kaplan KJ, Zahn CM. Current cervical screening technology considerations: liquid based cytology and automated screening. *Clin Obstet Gynecol* 2005;48:108-19.
4. Amaya J, Restrepo S. Tamizaje para cáncer de cuello uterino ¿Cómo, desde y hasta cuándo? *Rev Colomb Obstet Ginecol* 2005;56:59-67.
5. Adams AL, Eltoun I, Roberson J, Chen J, Connolly K, Chhieng DC. Negative colposcopic biopsy after positive Human Papilloma Virus DNA testing: false positive HPV results or false negative histologic findings? *Am J Clin Pathol* 2006;125:413-8.
6. Turek L, Smith E. Genetic program of human papillomavirus infection and genital cancer. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* 1996;23:735-758.
7. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998;338:423-8.
8. Rincón O, Pareja L, Jaramillo S, Aristizábal B. Virus del Papiloma Humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja. *Rev Colomb Obstet Ginecol* 2007;58:202-12.
9. Riethdorf S, Riethdorf L, Schulz G, Ikenberg H, Jänicke F, Löning T, et al. Relationship between telomerase activation and HPV 16/18 oncogene expression in squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol* 2001;20:177-85.
10. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004;78:11451-60.
11. Nagai N, Oshita T, Murakami J, Ohama K. Semiquantitative analysis of telomerase activity un cervical cancer and precancerous lesions. *Oncol Rep* 1999;6:235-8.
12. Kyo S, Takakura M, Ishikawa H, Sasagawa T, Satake S, Tateno M, et al. Application of telomerase assay for the screening of cervical lesions. *Cancer Res* 1997;57:1863-7.
13. Farley J, McBroom JW, Zahn CM. Current techniques for the evaluation of abnormal cervical cytology. *Clin Obstet Gynecol* 2005;48:133-46.
14. De Lima SFL Jr., Fernandes MCM, Heráclio SA, de Souza PRE, Maia MMD. Prevalence of human papillomavirus genotypes: Comparison between three detection methods in patients of pernambuco, brazil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia* 2011;33:315-20.
15. Sukasem C, Pairoj W, Saekang N, Pombubpha H, Srichunrasami C, Pongtippan A, et al. Molecular epidemiology of human papillomavirus genotype in women with high-grade squamous intraepithelial lesion and cervical cancer: will a quadrivalent vaccine be necessary in Thailand? *J Med Virol* 2011;83:119-26.
16. Domínguez S, Sánchez RA, Victorio GB, Flores LDC, Trampe ÁL, Canseco LM, et al. Frecuencia genotípica del virus del papiloma humano en población general de la frontera sur de México. *Enf Inf Microbiol* 2011;31:6-10.

17. Galani E, Christodoulou C. Human papilloma viruses and cancer in the post-vaccine era. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:977-81.
18. Katzenellenbogen RA, Vliet-Gregg P, Xu M, Galloway DA. Cytoplasmic poly (A) binding proteins regulate telomerase activity and cell growth in human papillomavirus type 16 e6-expressing keratinocytes. *J Virol* 2010;84:12934-44.
19. Oh ST, Kyo S, Laimins LA. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: Induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *J Virol* 2001;75:5559-66.
20. García D, Schmitt M, Cid-Arregui A, Castillo M, Briceño I, Aristizábal F. Genotipificación del Virus del Papiloma Humano (VPH) en muestras de cepillados cervicales de pacientes de diferentes hospitales de Bogotá y evaluación de la concordancia de dos métodos basados en PCR. *Rev Colomb Obstet Ginecol* 2010;61:310-8.
21. Jarboe EA, Thompson LC, Heinz D, McGregor JA, Shroyer KR. Telomerase and human papillomavirus as diagnostic adjuncts for cervical dysplasia and carcinoma. *Hum Pathol* 2004;35:396-402.
22. Muñoz N, Castelisagué X, Berrington A, Grissmann L. El VPH en la etiología del cáncer humano. *Controversias en Ginecología y Obstetricia* 2008;2:3785-99.
23. Huertas S, Acosta J, Cabarcas M, Sánchez AY, Ricaurte O. Prevalencia de Lesión Escamosa Intraepitelial (LEI) y malignidad para las atipias escamosas de significado indeterminado (ASCUS) en población perteneciente a una aseguradora pública en Colombia 2004-2005. *Rev Colomb Obstet Ginecol* 2008;59:124-30.
24. Chen CH, Chen RJ. Prevalence of telomerase activity in human cancer. *J Formos Med Assoc* 2011;110:275-89.

Conflicto de intereses: ninguno declarado.

Financiación: investigación financiada por la Universidad del Quindío y aportes del Instituto Seccional de Salud del Quindío.